

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マウスにおける慢性毒性・発がん性併合試験

(毒性資料No. 原体-24)

試験機関：  
報告書作成年：1987年 [GLP対応]

検体純度：

供試動物：B6C3F1 系マウス 試験開始時4～5週齢  
試験開始時体重 雄 17～24g、雌 14～20g

投与期間：24カ月（1983年12月9日～1985年12月17日）

投与方法：検体を0、500、2500及び12500ppmの濃度で24カ月混餌投与した。

用量設定根拠：

試験群の構成を以下に示す。

発がん群	1群雌雄各52匹 対照群雌雄各84匹	・104週後に全生存動物屠殺
毒性群	1群雌雄各40匹。	・25週間投与後に各群雄10匹と雌5*匹を中間屠殺 ・52週間後に各群雌雄10匹を屠殺 ・79週間投与後に全生存動物を屠殺

\*当初の計画では10匹屠殺する予定であったが、25週間中間屠殺前の採血時に死亡例が多く発生したため、5匹の屠殺に変更した。

観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡率； 一般状態及び生死を、投与期間中1日2回観察した。さらに1週間に1回、全動物について触診を行った。

一般状態に、投与に関する変化は認められなかった。また触知可能な腫瘍の発生率に投与による影響はみられなかった。死亡率は発がん群、毒性群ともに投与による影響は認められなかった。発がん群における死亡率を以下に示す。

表1 発がん性試験群 死亡率(%)

投与群 (ppm)	0	500	2500	12500
雄	28.6%	26.9%	30.8%	21.2%
雌	14.3%	19.2%	23.1%	23.1%

体重変化； 体重は、最初の14週間は毎週、その後は2週間ごとに測定した。

投与群の体重増加量は、それぞれ投与開始から雄で64週間、雌で70週間、対照群と比較して統計学的に有意に低値であった。この変化は用量に関連しており、

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。

12500ppm群の雄雌の体重増加量はそれぞれ対照群の82%及び71%であった。500ppmでみられた差は10%以下(対照比:雄96%、雌93%)であり、毒性影響とはみなさなかつた。

発がん群における体重推移を以下に示す。

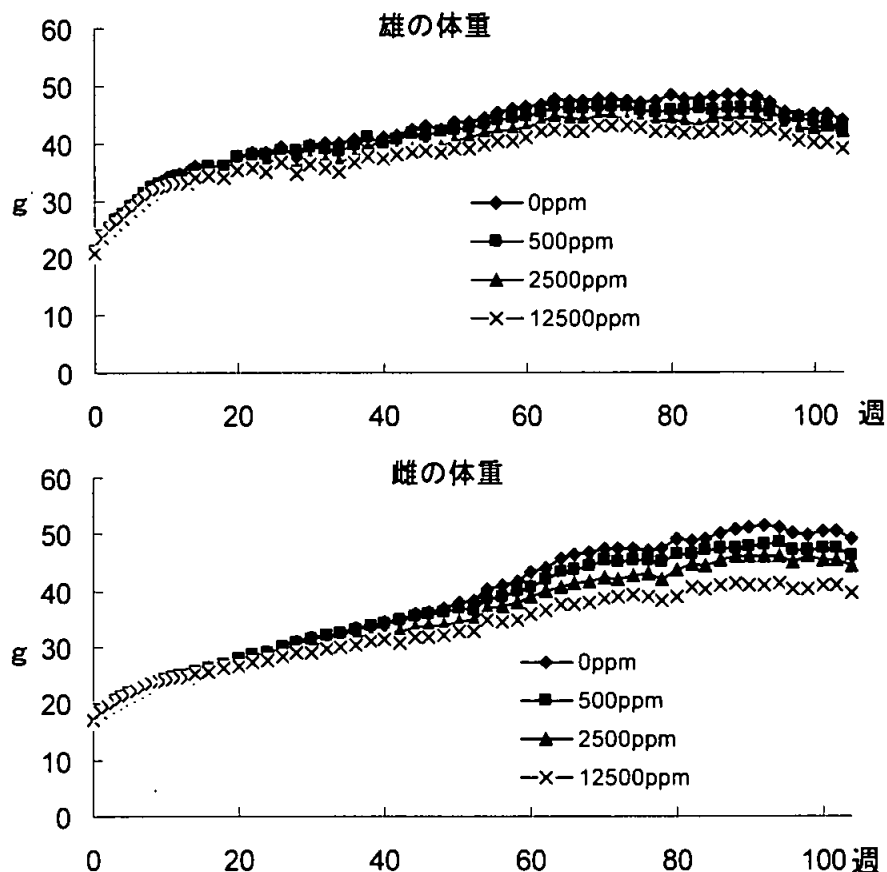


表2 体重増加量 (発がん群及び毒性群合算)

性別	雄				雌			
	0	500	2500	12500	0	500	2500	12500
投与量(ppm)	0	500	2500	12500	0	500	2500	12500
0~64/70週(g)* (対対照群%)	26.5 —	↓25.4 95.8	↓23.8 89.8	↓21.7 81.9	30.5 —	↓28.3 92.8	↓25.4 83.3	↓21.7 71.1
64/70~104週** (対対照群%)	-3.8 —	-3.8 100.0	-3.1 81.6	-3.3 86.8	1.6 —	1.6 100.0	1.6 100.0	0.3 18.8
0~104週 (対対照群%)	22.8 —	21.3 93.4	21.2 93.0	↓18.3 80.3	32.3 —	↓29.2 90.4	↓27.1 83.9	↓22.8 70.6

↓↑: P<0.05, ⇓⇑: P<0.01, ⇓⇑: P<0.001 (Studentのt-検定)

\*雄は0~64週、雌は0~70週、\*\*雄は64~104週、雌は70~104週

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。

摂餌量；摂餌量は毎週計算した。

2500ppm群及び12500ppm群雄の摂餌量は第30週以降、対照群に比較して僅かに（最大でも差は対照群の摂餌量の10%以内）減少した。雌投与群の摂餌量は、投与期間中を通じて対照群と差がなかった。

摂餌量及び投与濃度から算出した1日当たりの平均検体摂取量は、下表の通りである。

表3 検体摂取量（発がん群及び毒性群合算）

投与量 (ppm)		500	2500	12500
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	62.2	321.7	1617.7
	雌	73.6	384.4	1988.8

飲水量；第26、52、78及び104週の飲水量についてそれぞれ5日間、発がん群の各群雌雄各5ケージの飲水量を測定した。

投与による影響はみられなかった。

血液学的検査；投与開始前に雌雄各8例、24、49、77週目には毒性群から、及び102週目には発がん群の動物から選択した各群雌雄各10例について眼窩後静脈洞から採血し、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数、白血球数、好中球、リンパ球、好酸球、好塩基球、単球及び血小板数を測定し、さらに貧血の症状が見られた場合のみ網赤血球数を測定した。また、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球色素濃度(MCHC)は、計算により算出した。

統計学的に有意差の認められた変化を表4に示す。これらの変化のうち血小板の上昇が雄の全ての投与群、雌の500及び2500ppm群に認められたが、いずれの群でも102週には認められなかった。また、変化の程度に経時的な変化が認められず、用量との関連性も認められないことから、毒性影響とはみなさなかった。

これ以外の項目で認められた有意差は、いずれの変化も経時的に関連した変化としては認められず、対照群からの差は小さく、上昇あるいは下降も一定せず、投与に関連した変化とは考えられなかった。

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。

表4 血液学的検査結果（統計学的有意差の認められた項目）

性別	雄									雌						
	500			2500				12500		500	2500			12500		
投与群(ppm)	500			2500				12500		500	2500			12500		
検査週	24	49	77	24	49	77	102	24	49	77	24	24	77	102	24	
ヘモグロビン																↓96
赤血球数																↓95
MCHC	↑103															↑103
MCV	↓96			↓96				↑107	↓96							↑103
MCH								↑106	↓100							↑112
ヘマトクリット											↑102					
白血球		↑134			↑139			↓47	↑139			↑138				↓57
好中球													↓63			
球合計					↑138			↓62	↑133							
血小板数			↑133		↑113	↑136		↑119	↑118	↑160	↑115	↑117				

↓↑ : P<0.05, ↑↓ : P<0.01, ↑↓ : P<0.001 (Studentのt-検定)

血液生化学的検査；

投与開始前、24、51、78週目には毒性群から、及び103週目には発がん群の動物から、可能な限り血液学的検査に用いた動物と同じ動物を各群雌雄各10例選択し、眼窩後静脈洞から採血した。なお、採血前は一晩、飼料と水を与えなかった。以下の検査項目について測定を行った。

尿素、血糖(Glu)、アルカリホスファターゼ(ALP)、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)、総蛋白、電気泳動による蛋白分画〔アルブミン(A1b)、α1グロブリン(α1G1b)、α2グロブリン(α2G1b)、βグロブリン(βG1b)、γグロブリン(γG1b)、A/G比〕、総コレステロール(Cho)、ナトリウム(Na)、カリウム(K)、塩素(Cl)、カルシウム(Ca)、総ビリルビン(Bil)、無機リン(P)

表5に対照群と比較して統計学的有意差の認められた項目を示した。

統計学的に有意なChoの低下が2500ppm以上の雌雄で、雌では全測定期間、雄ではほとんどの測定時期にみられた。500ppmについても雄で51週のみ、雌では24週のみ有意な低下がみられたが、経時的な変化ではなく、また対照群からの差も小さいことから、毒性学的な意義はないものと考えられた。また、Gluの低下が2500ppm以上の雌のみで統計学的に有意差に認められた。一方、雄のGluには明白な影響は認められなかった。

これら2500ppm以上の雌雄でみられたCho及び雌でみられたGluの低下は、増体重抑制同様、全身的な低栄養に関連したものと考えられた。

その他の変化として、ALPの上昇が雌の12500ppm群で、また、ALAT及びASATの上昇が雄の12500ppm群では24週のみ、雌の2500及び12500ppm群ではいずれも51週のみみられた。これらは、軽微な肝臓への影響を示す可能性が示唆された。

上記以外の変化は、用量あるいは経時的な関連性もなく、あるいは対照群との差は小さく、毒性学的な意義は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。

表5 血液生化学的検査結果（統計学的有意差の認められた項目）

性別	雄											
	500ppm			2500ppm				12500ppm				
投与群	24	51	78	24	51	78	103	24	51	78	103	
ALP		↓ 86			↓ 78			↑ 131				
ALAT								↑ 200				
ASAT								↑ 166				
Glu			↑ 115				↑ 140		↓ 78			
尿素						↑ 116	↓ 78	↑ 138				
Cho		↓ 92			↓ 79		↓ 53		↓ 72	↓ 73	↓ 48	
Bil						↑ 150				↑ 150	↓ 75	
総蛋白					↓ 87		↓ 86		↓ 93			
Alb				↑ 106	↓ 78				↓ 89		↓ 85	
α1Glb				↓ 75	↓ 83							
βGlb							↓ 79					
Na			↑ 101			↑ 101				↑ 101		
K		↑ 109					↓ 93				↓ 93	
Cl		↓ 97				↑ 102	↑ 104		↑ 103	↑ 104	↑ 103	
Ca	↑ 107	↑ 104		↑ 114		↓ 94	↓ 88	↑ 114		↓ 92	↓ 90	
P		↑ 111							↑ 110	↓ 84		

性別	雌											
	500ppm				2500ppm				12500ppm			
投与群 (ppm)	24	51	78	103	24	51	78	103	24	51	78	103
ALP									↑ 115		↑ 153	↑ 227
ALAT						↑ 136				↑ 137		
ASAT						↑ 193				↑ 170		
Glu						↓ 69	↓ 83			↓ 65	↓ 66	↓ 81
尿素					↓ 84	↑ 110						
Cho	↓ 80				↓ 74	↓ 71	↓ 77	↓ 57	↓ 79	↓ 64	↓ 66	↓ 50
Bil		↓ 75				↓ 50		↓ 75		↓ 75	↓ 67	↓ 50
総蛋白		↓ 97			↓ 98	↓ 89				↓ 94	↓ 95	
Alb		↓ 89	↓ 92			↓ 84	↓ 92		↑ 108		↓ 87	
α1Glb	↑ 133											
α2Glb									↓ 88	↓ 89		
βGlb			↑ 122						↓ 85	↓ 92	↑ 122	
γGlb			↓ 67							↓ 80		
A/G比									↑ 136			
Na			↓ 98			↑ 101				↑ 101		↑ 101
K							↓ 93					
Cl		↑ 101	↑ 102	↑ 104	↑ 101	↑ 105		↑ 102	↑ 102	↑ 102	↑ 102	↑ 108
Ca		↓ 98	↓ 98			↓ 94	↓ 98			↓ 96		↓ 94
P								↑ 118				↑ 129

↓ ↑ : P<0.05, ↑ ↓ : P<0.01, ↑ ↓ : P<0.001 (Studentのt-検定)

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。

尿検査；血液生化学的検査に用いた動物について、同時期に採尿し、外観、尿量、pH、比重、グルコース、総蛋白、ケトン体、胆汁色素、ウロビリリン、還元物質、亜硝酸塩、及び潜血を検査した。

表6に対照群と比較して統計学的有意差の認められた項目を示す。

雄動物で尿比重が500ppm群の24週目、2500ppm群の51及び78週目、12500ppm群の78及び103週目に上昇した。しかし変化は僅少であり、用量に依存した程度の上昇はみられず、また、程度に経時的関連性もみられないことから、毒性学的に意味のある変化とは考えられなかった。

12500ppm群雄において78及び103週目に蛋白濃度が対照群に比較して高値を示したが、血液生化学的検査及び病理組織学的検査において、異常所見が認められていないことから、有害な影響とは考えられなかった。一方、雌では、12500ppm群の103週において蛋白濃度が対照群に比較して有意の低値を示したが、この群の個体別値は同時期の対照群値の範囲に入ることから、投与に関連したものとは考えられなかった。

表6 尿検査結果（統計学的有意差の認められた項目）

性別	雄						雌			
	500		2500		12500		12500			
検査時期(週)	24	51	51	78	51	78	103	51	78	103
尿量		↓75			↓50					
比重	↑101		↑101	↑101		↑101	↑101	↑101		
pH			↓95		↓95					
尿蛋白						↑229	↑278		↑101	↓15

↓↑：P<0.05, ↑↓：P<0.01, ↑↓：P<0.001 (Studentのt-検定)

臓器重量；26、52、79及び104週後の各剖検時に下記臓器重量を測定し対体重比も算出した。

副腎、脳（脳幹を含む）、心臓、腎臓、肝臓、肺、卵巣、下垂体（固定後）、脾臓、精巣、胸腺、子宮（頸部を含む）及び腫瘍

表7に対照群と比較して統計学的有意差の認められた項目を示す。

肝の実重量及び対体重比の増加が雄では12500ppm群、雌では2500ppm以上で統計学的有意差を伴って認められ、投与に関連したものと考えられた。一方、対体重比の上昇が2500ppm以上の雌雄の脳、同群雌の腎臓、脾臓、下垂体、心、12500ppm群の雌の副腎で統計学的有意差を伴ってみられ、これらの群における最終体重の低下に起因するものと考えられた。

卵巣実重量及び対体重比が12500ppm群で104週時に有意に低下したが、対応する病理所見を伴わず、毒性学的に意味のある変化とは考えられなかった。その他の変動は、用量との関連性がないか、経時的な関連性がなく、投与に関連した変化とは考えられなかった。

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。

表7 臓器重量（統計学的有意差の認められた項目）

性別		雄									
投与群 (ppm)		500			2500			12500			
検査時期 (週)		52	79	104	52	79	104	26	52	79	104
体 重					↓88	↓94	↓95		↓89	↓87	↓88
脳	対体重比					↑110			↑111	↑119	↑114
肺	実重量				↓65						↓92
肝	実重量							↑126			
	対体重比						↑120	↑127	↑122		
副腎	実重量	↑167									
	対体重比	↑177			↑175						
腎	実重量		↓84			↓82				↓83	↓91
下垂体	対体重比										↑119
精巣	対体重比				↑111		↑108				↑117
心	実重量					↓92					↓92
	対体重比			↑108						↑111	
胸腺	実重量										↓60

性別		雌									
投与群 (ppm)		500			2500			12500			
検査時期 (週)		79	104	26	52	79	104	26	52	79	104
体 重			↓94		↓86	↓84	↓91	↓82		↓84	↓72
脳	実重量			↓96							
	対体重比				↑117	↑119	↑110		↑120	↑141	↑121
肺	実重量							↑141			
	対体重比				↓71			↑149			
肝	実重量						↑125	↑120		↑117	↑140
	対体重比	↑111		↑115	↑114	↑134	↑135	↑126	↑130	↑163	↑168
副腎	対体重比								↑147	↑178	↑142
腎	対体重比				↑120	↑119			↑116	↑135	↑116
脾	対体重比				↑130				↑138		↑174
下垂体	対体重比				↑145	↑132			↑138	↑143	↑129
心	対体重比					↑115				↑133	↑116
卵巣	実重量										↓25
	対体重比									↑169	↓29
胸腺	実重量					↓57				↓43	
	対体重比									↓64	↓76
子宮	対体重比									↑157	

↓↑ : P<0.05    ↑↓ : P<0.01 Dunnett の検定

肉眼的病理学検査；

毒性群では投与期間中の切迫屠殺及び死亡動物と26、52週目の中間屠殺動物及び79週目の最終屠殺動物について検査を行った。発がん群では中間屠殺群は設定しなかったため、投与期間中の切迫屠殺及び死亡動物と104週終了時の最終屠殺動物の検査を実施した。

認められた肉眼所見は、いずれの検査時期においても所見の発現率が用量による影響がみられず、投与との関連性はないものと考えられた。

病理組織学的検査； 毒性群では、52週後に中間屠殺した全動物について、発がん群では、全動物について、副腎、大動脈弓、血液、脳（脳幹を含む）、盲腸、結腸、十二指腸、副睾丸、眼及び眼神経、胆嚢、ハーダー腺、心臓、回腸、空腸、腎臓、肝臓、肺（主気管支を含む）リンパ節（頸部、腸間膜、腫瘍のある部位）、乳腺、骨髄、食道、卵巣、膵臓、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺、坐骨神経、精嚢、骨格筋、皮膚、脊髄、脾臓、胸骨及び骨髄、胃（腺胃、角質部）、精巣、胸腺、甲状腺（上皮小体を含む）、気管、腫瘍、膀胱及び子宮（頸部を含む）について病理標本作製して検鏡した。非腫瘍性病変及び腫瘍性病変は発生頻度について後述の表に示した。

#### 非腫瘍性病変

毒性群、52週屠殺時： 肝臓において小葉中心性の肝細胞肥大が認められ、雄動物では発現率が用量に依存して増加した。しかし雌では雄ほど明確な変化は認められず、また、発がん群では認められなかったことから、投与との関連性は明確ではなかった。

発がん群（全動物）： 肝の門脈周囲の脂質様空胞化の発現率が500ppm 及び2500ppm 雌雄の投与群で増加したが、雌雄いずれも12500ppm 投与群においてはこの病変の発現率に有意差が認められないことから、これらの所見は毒性学的意義がないと考えられた。

また、2500ppm 及び 12500ppm 投与群雄では、分泌にかかわる精嚢膨脹の発現率が低下したことから、精嚢の機能低下が示唆されたが、精巣の機能低下に関連するその他の変化がいずれの検査項目でもみられず、毒性学的に意義があるものとは考えられなかった。

その他の変化は、用量との関連性がなく、検体投与とは関連しないものと考えられた。

#### 腫瘍性病変

毒性群、52週屠殺時： 投与に関連すると考えられる腫瘍の発生頻度の増加は認められなかった。

発がん群（全動物）： 投与に関連すると考えられる腫瘍の発生頻度の増加は認められなかった。

なお、各群における腫瘍動物数、腫瘍総数、悪性及び良性腫瘍数は表8のとおりであり、腫瘍の発生頻度に関して検体投与による影響はなかった。



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。

表8 腫瘍発生状況

性 別	雄				雌				
	投与群 (ppm)	対照群	500	2500	12500	対照群	500	2500	12500
検査動物数		84	52	52	52	84	52	52	52
腫瘍数	良性	39	22	17	27	24	31	19	13
	悪性	36	35	30	25	40	27	27	23
腫瘍総数		75	57	47	52	64	58	46	36
腫瘍動物数		39	36	28	30	30	36	28	27

以上の結果から、本検体をマウスに24カ月間飼料混入投与した結果、2500ppm以上の雌雄で増体重抑制、Choの低下が、雌の2500ppm以上でGluの低下がみられた。また、雌の12500ppmでALPの上昇、雌雄の12500ppm及び雌の2500ppmで一時的なALAT及びASATの上昇がみられた。肝臓実重量及び対体重比の増加が雄は12500ppmで、雌では2500ppm以上の群で認められた。

従って、無毒性量 (NOAEL) は、500ppm (雄 62.2mg/kg/日、雌 73.6mg/kg/日) であると判断された。また発がん性は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。

非腫瘍性病変 (1) 毒性群 52週屠殺動物

検査時期	臓器/所見	性別	雄				雌			
		投与量(ppm)	0	500	2500	12500	0	500	2500	12500
52週屠殺	検査動物数		10	10	10	10	10	10	10	10
	肝臓	検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10
		小葉中心性肝細胞肥大	0	4	7**	9***	0	1	4	2

\*: p < 0.05 \*\* : p < 0.01 \*\*\* : p < 0.001 Fisherの直接確率法

非腫瘍性病変 (2) 発がん群 途中死亡・切迫屠殺動物、104週最終屠殺動物

検査時期	臓器/所見	性別	雄				雌			
		投与量(ppm)	0	500	2500	12500	0	500	2500	12500
途中死亡・切迫屠殺	検査動物数		24	14	16	11	12	10	12	12
	腸間膜リンパ節	検査動物数	20	14	13	10	12	8	11	11
		リンパ過形成	4	2	1	0	1	1	0	1
		洞内赤血球、貪食細胞	4	5	4	3	2	2	0	0
	肝	検査動物数	23	14	15	11	12	9	12	11
		門脈周囲脂質様空胞化	1	2	1	1	2	1	1	2
	脾臓	検査動物数	20	14	15	10	10	10	11	12
		リンパ球集簇	0	1	0	0	1	1	1	3
		島細胞過形成	4	1	0	0	1	0	0	2
	前立腺	検査動物数	20	14	14	10	—	—	—	—
		リンパ球集簇	3	1	2	0	—	—	—	—
	唾液腺	検査動物数	23	14	16	11	12	10	12	12
		リンパ球集簇	8	5	5	0	6	5	2	6
	精囊	検査動物数	20	14	14	9	—	—	—	—
		分泌物による膨張	10	4	3	3	—	—	—	—
		分泌減少	1	2	5	4	—	—	—	—
	胃	検査動物数	18	13	15	9	9	9	11	11
		棘細胞症	2	2	2	0	1	0	1	0
	胸腺	検査動物数	9	7	8	6	4	7	8	11
		退縮	5	1	3	1	0	1	1	2
104週最終屠殺動物	検査動物数		60	38	36	41	72	42	40	40
	胆嚢	検査動物数	58	37	35	37	71	40	38	39
		リンパ球集簇	4	2	5	3	4	4	6	8
	腸間膜リンパ節	検査動物数	60	38	36	41	71	40	40	38
		リンパ過形成	18	9	3	6	7	1	7	11
		洞内赤血球、貪食細胞	46	17	16	22	8	7	3	3
	肝	検査動物数	60	38	36	41	72	41	40	40
		門脈周囲脂質様空胞化	4	19	9	2	28	27	34	22
	脾臓	検査動物数	60	38	36	41	72	42	40	39
		リンパ球集簇	5	2	1	4	16	4	2	6
		島細胞過形成	13	6	3	2	2	0	1	0
	前立腺	検査動物数	58	35	33	40	—	—	—	—
		リンパ球集簇	16	9	7	3	—	—	—	—
	唾液腺	検査動物数	60	38	36	41	72	42	40	40
		リンパ球集簇	45	21	14	15	40	22	20	17
	精囊	検査動物数	60	38	36	41	—	—	—	—
		分泌物による膨張	27	12	8	8	—	—	—	—
		分泌減少	3	6	2	0	—	—	—	—
	胃	検査動物数	60	38	36	41	72	42	40	40
		棘細胞症	11	1	3	0	7	2	1	3
胸腺	検査動物数	42	31	26	29	59	37	33	32	
	退縮	13	19	18	18	18	12	17	15	

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。

非腫瘍性病変 (3) 全動物

検査時期	臓器/所見	性別		雄				雌			
		投与量 (ppm)		0	500	2500	12500	0	500	2500	12500
全動物	検査動物数		84	52	52	52	84	52	52	52	
	胆嚢	検査動物数	71	45	46	42	78	45	48	45	
		リンパ球集簇	4	2	5	3	4	4	6	8*	
	腸間膜リンパ節	検査動物数	80	52	49	51	83	48	51	49	
		リンパ過形成	22	11	4*	6*	8	2	7	12*	
		洞内赤血球、貪食細胞	50	22*	10*	25	10	9	3	3	
	肝	検査動物数	83	52	51	52	84	50	52	51	
		門脈周囲脂質様空胞化	5	21***	10*	3	30	28*	35***	24	
	膵臓	検査動物数	80	52	51	51	82	52	51	51	
		リンパ球集簇	5	3	1	4	17	5	3*	9	
		島細胞過形成	17	7	3*	2**	3	0	1	2	
	前立腺	検査動物数	78	49	47	50	—	—	—	—	
		リンパ球集簇	19	10	9	3*	—	—	—	—	
	唾液腺	検査動物数	83	52	52	52	84	52	52	52	
		リンパ球集簇	53	26	19**	15***	46	27	22	23	
	精嚢	検査動物数	80	52	50	50	—	—	—	—	
		分泌物による膨張	37	16	11**	11**	—	—	—	—	
		分泌減少	4	8	7	4	—	—	—	—	
	胃	検査動物数	78	51	51	50	81	51	51	51	
		棘細胞症	13	3	5	0**	8	2	2	3	
	胸腺	検査動物数	51	38	34	35	63	44	41	43	
		退縮	18	20	21*	19	18	13	18	17	

\* : p < 0.05    \*\* : p < 0.01    \*\*\* : p < 0.001    Fisherの直接確率法

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。

腫瘍性病変 (1) 52週屠殺動物、途中死亡・切迫屠殺動物

検査時期	臓器/所見	性別		雄				雌			
		投与量 (ppm)	0	500	2500	12500	0	500	2500	12500	
52週屠殺	検査動物数		10	10	10	10	10	10	10	10	10
	ハーダー腺	検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		腺腫 (B)	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	肝	検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		肝細胞腺腫 (B)	0	0	1	0	0	0	1	1	0
		肝細胞癌 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	副甲状腺	検査動物数	6	5	9	8	6	7	7	7	7
腺腫 (B)		1	0	0	0	0	0	0	0	0	
途中死亡・切迫屠殺	検査動物数		24	14	16	11	12	10	12	12	
	副腎髄質	検査動物数	24	14	15	11	12	10	12	12	
		褐色細胞腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	ハーダー腺	検査動物数	24	14	16	11	12	10	12	12	
		腺腫 (B)	0	0	0	1	0	2	1	0	
	心 (心房)	検査動物数	24	14	16	9	11	10	12	12	
		脂肪肉腫 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0	
	心 (心室)	検査動物数	24	14	16	11	12	10	12	12	
		脂肪肉腫 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0	
	肝	検査動物数	23	14	15	11	12	9	12	11	
		A型結節 (B)	1	3	1	1	0	1	0	0	
		B型結節 (M)	3	5	4	4	1	0	0	0	
		血管腫 (B)	0	0	0	0	1	0	0	0	
		血管肉腫 (M)	0	1	0	0	0	0	0	0	
	肺	検査動物数	24	14	16	11	12	10	12	12	
		腺癌 (M)	0	0	0	1	0	0	0	1	
		腺腫 (B)	1	1	0	1	0	1	0	1	
	卵巣	検査動物数	—	—	—	—	12	10	12	12	
		間質細胞腫瘍 (B)	—	—	—	—	0	1	0	0	
		顆粒膜細胞腫 (B)	—	—	—	—	0	0	1	0	
	膵	検査動物数	20	14	15	10	10	10	11	12	
		腺癌 (M)	0	1	1	0	0	0	0	0	
		島細胞腺癌 (M)	0	0	0	0	1	0	0	0	
	下垂体	検査動物数	23	14	16	11	10	10	12	12	
		腺腫 (B)	0	0	0	0	1	2	0	1	
		腺癌 (M)	0	0	0	0	1	0	0	0	
	皮膚	検査動物数	24	14	16	11	12	10	12	12	
		線維肉腫 (M)	6	2	3	3	2	2	0	0	
		線維腫 (B)	1	0	0	1	0	0	0	0	
		血管腫 (B)	0	0	0	0	1	0	0	0	
	精巣	検査動物数	24	14	16	11	—	—	—	—	
		間質細胞腫 (B)	0	1	0	0	—	—	—	—	
	甲状腺	検査動物数	22	14	16	11	12	10	12	12	
腺腫 (B)		0	1	0	0	0	0	0	0		
大腿骨	検査動物数	—	—	—	—	—	1	—	—		
	骨肉腫 (M)	—	—	—	—	—	1	—	—		
造血組織	検査動物数	24	14	16	11	12	10	12	12		
	リンパ腫 (M)	8	5	3	4	6	8	9	6		
乳腺	検査動物数	6	1	3	1	10	10	12	11		
	腺癌 (M)	0	0	0	0	0	0	1	0		

\*: p < 0.05 \*\* : p < 0.01 \*\*\* : p < 0.001 Fisherの直接確率法

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。

腫瘍性病変 (2) 104週最終屠殺動物

検査時期	臓器/所見	性別		雄				雌			
		投与量 (ppm)	0	500	2500	12500	0	500	2500	12500	
104週最終屠殺動物	検査動物数		60	38	36	41	72	42	40	40	
	副腎皮質	検査動物数	60	38	36	40	71	42	40	40	
		腺腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	1	
	副腎髄質	検査動物数	60	38	35	40	69	41	40	40	
		褐色細胞腫 (B)	1	0	1	0	1	0	0	0	
		褐色細胞腫 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0	
	盲腸	検査動物数	60	38	35	41	71	42	40	40	
		平滑筋肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	1	0	
	ハーダー腺	検査動物数	60	38	36	41	71	41	40	40	
		腺腫 (B)	3	2	4	2	5	3	2	0	
	心 (心室)	検査動物数	60	38	36	41	72	42	40	40	
		血管肉腫 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0	
	空腸	検査動物数	60	36	36	41	72	41	40	40	
		腺癌 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0	
	肝	検査動物数	60	38	36	41	72	41	40	40	
		肝細胞腺腫 (B)	12	7	10	12	4	3	3	2	
		肝細胞癌 (M)	7	10	6	6	3	1	4	1	
		血管腫 (B)	0	0	0	1	0	0	0	0	
	肺	検査動物数	60	38	36	41	72	42	40	40	
		腺癌 (M)	1	2	2	0	4	1	1	1	
		腺腫 (B)	9	4	1	3	2	6*	3	1	
	脾	検査動物数	60	38	36	41	72	42	40	39	
		腺癌 (M)	0	0	0	0	1	0	0	0	
	下垂体	検査動物数	58	37	36	41	70	42	40	38	
		腺腫 (B)	0	0	0	0	5	9*	7	5	
		腺癌 (M)	0	0	0	0	1	0	0	0	
	皮膚	検査動物数	60	38	36	41	72	42	40	40	
		線維肉腫 (M)	1	2	2	2	1	0	0	1	
		線維腫 (B)	8	3	0*	3	0	0	0	1	
		乳頭腫 (B)	1	0	0	1	0	0	0	0	
		脂肪腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0	
		扁平上皮癌 (M)	0	0	0	1	0	0	0	0	
	脾	検査動物数	60	38	36	41	72	42	40	40	
		線維肉腫 (M)	0	0	1	0	0	0	0	0	
		血管肉腫 (M)	0	0	0	1	0	0	0	0	
	甲状腺	検査動物数	60	38	35	41	72	42	40	40	
		腺腫 (B)	2	0	0	1	1	1	0	1	
		腺癌 (M)	0	0	0	0	1	1	0	1	
	子宮頸管	検査動物数	—	—	—	—	71	40	40	40	
		平滑筋肉腫 (M)	—	—	—	—	1	1	0	0	
	子宮	検査動物数	—	—	—	—	72	42	40	40	
		平滑筋肉腫 (M)	—	—	—	—	2	0	0	0	
腺癌 (M)		—	—	—	—	0	0	1	0		
造血組織	検査動物数	60	38	36	41	72	42	40	40		
	リンパ腫 (M)	6	7	8	3	18	14	9	11		
乳腺	検査動物数	0	0	0	0	54	35	35	30		
	腺腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	0		
	腺癌 (M)	0	0	0	0	0	0	1	0		
包皮腺	検査動物数	16	6	12	7	—	1	—	1		
	腺腫 (B)	0	0	0	0	—	1	—	0		

\*: p < 0.05 \*\* : p < 0.01 \*\*\* : p < 0.001 Fisherの直接確率法

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。

腫瘍性病変 (3) 全動物

検査時期	臓器/所見	性別 投与量 (ppm)	雄				雌			
			0	500	2500	12500	0	500	2500	12500
全動物	検査動物数		84	52	52	52	84	52	52	52
	副腎皮質	検査動物数	84	52	52	51	83	52	52	52
		腺腫 (B)	04	0	0	0	0	0	0	1
	副腎髄質	検査動物数	84	52	50	51	81	51	52	52
		褐色細胞腫 (B)	1	0	1	0	1	0	0	0
		褐色細胞腫 (M)	1	0	0	0	0	0	0	1
	盲腸	検査動物数	75	48	47	47	78	46	49	47
		平滑筋肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	1	0
	ハーダー腺	検査動物数	84	52	52	52	83	51	52	52
		腺腫 (B)	3	2	4	3	5	5	3	0
	心 (心房)	検査動物数	84	52	52	50	82	52	52	52
		脂肪肉腫 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0
	心 (心室)	検査動物数	84	52	52	52	84	52	52	52
		血管肉腫 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0
		脂肪肉腫 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0
	空腸	検査動物数	76	47	48	48	79	44	50	52
		腺癌 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0
	肝	検査動物数	83	52	51	52	84	50	52	52
		肝細胞腺腫 (B)	13	10	11	13	4	4	3	2
		肝細胞癌 (M)	10	15	10	10	4	1	4	1
		血管腫 (B)	0	0	0	1	1	0	0	0
		血管肉腫 (M)	0	1	0	0	0	0	0	0
	肺	検査動物数	84	52	52	52	84	52	52	52
		腺癌 (M)	1	2	2	1	4	1	1	2
		腺腫 (B)	10	5	1	4	2	7*	3	2
	卵巣	検査動物数	—	—	—	—	83	52	52	52
		間質細胞腫瘍 (B)	—	—	—	—	0	1	0	0
		顆粒膜細胞腫 (B)	—	—	—	—	0	0	1	0
	膵	検査動物数	80	52	51	51	82	52	51	51
		腺癌 (M)	0	1	1	0	1	0	0	0
		島細胞腺癌 (M)	0	0	0	0	1	0	0	0
	下垂体	検査動物数	81	51	52	52	80	52	52	50
腺腫 (B)		0	0	0	0	6	11*	7	6	
腺癌 (M)		0	0	0	0	2	0	0	0	
皮膚	検査動物数	84	52	52	52	84	52	52	52	
	線維肉腫 (M)	7	4	5	5	3	2	0	1	
	線維腫 (B)	9	3	0	4	0	0	0	1	
	血管腫 (B)	0	0	0	0	1	0	0	0	
	乳頭腫 (B)	1	0	0	1	0	0	0	0	
	脂肪腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0	
	扁平上皮癌 (M)	0	0	0	1	0	0	0	0	
脾	検査動物数	79	52	51	52	84	52	52	52	
	線維肉腫 (M)	0	0	1	0	0	0	0	0	
	血管肉腫 (M)	0	0	0	1	0	0	0	0	
精巣	検査動物数	84	52	52	52	—	—	—	—	
	間質細胞腫 (B)	0	1	0	0	—	—	—	—	

\* : p < 0.05    \*\* : p < 0.01    \*\*\* : p < 0.001    Fisherの直接確率法

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。

腫瘍性病変（3）全動物 続き

検査時期	臓器/所見	性別	雄				雌			
			投与量 (ppm)	0	500	2500	12500	0	500	2500
全動物	甲状腺	検査動物数	82	52	51	52	84	52	52	52
		腺腫 (B)	2	1	0	1	1	1	0	1
		腺癌 (M)	0	0	0	0	1	1	0	1
	子宮頸管	検査動物数	—	—	—	—	82	50	50	49
		平滑筋肉腫 (M)	—	—	—	—	1	1	0	0
	子宮	検査動物数	—	—	—	—	84	52	52	52
		平滑筋肉腫 (M)	—	—	—	—	2	0	0	0
		腺癌 (M)	—	—	—	—	0	0	1	0
	大腿骨	検査動物数	1	—	—	—	84	52	52	52
		骨肉腫 (M)	0	—	—	—	0	0	1	0
	造血組織	検査動物数	84	52	52	52	84	52	52	52
		リンパ腫 (M)	14	12	11	7	24	22	18	17
	乳腺	検査動物数	6	3	3	1	64	45	47	41
		腺腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	0
		腺癌 (M)	0	0	0	0	0	0	2	0
	包皮腺	検査動物数	17	10	13	9	—	1	—	1
		腺腫 (B)	0	0	0	0	—	1	—	0

\* : p < 0.05    \*\* : p < 0.01    \*\*\* : p < 0.001    Fisherの直接確率法

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。

## (12) 繁殖性に及ぼす影響及び催奇形性

### ① ラットを用いた繁殖試験

(毒性資料No. 原体-25)

試験機関：

報告書作成年：1985年 [GLP対応]

(追加病理組織学的検査)1987年 [GLP対応]

検体の純度：

供試動物：Cr1:COBS:CD(SD)BR系ラット、

P世代は1群雌雄各32匹、

F1世代は雌雄各28匹、

F2世代は雌雄各24匹

P世代開始時6週齢、開始時体重 雄104~180g、雌94~146g

投与期間：P世代；6週齢からF1b児離乳時まで

F1世代；離乳時からF2b児離乳時まで

F2a世代；離乳時から90日間、F2b世代；離乳時から14日間

(試験期間：1984年2月28日 - 1985年2月22日)

投与方法：検体を0、500、2500及び12500ppmの濃度で混入した飼料を自由摂取させた。

なお対照群には無処理の飼料のみを投与した。

用量設定根拠；

交配・調整・選抜及び観察・検査項目：概要を後述の表にまとめた。

一般状態及び死亡率；全動物について、一般状態及び生死を毎日観察した。

摂餌量；生育期間及び哺育期間中に全動物について毎週測定し、摂餌効率も算出した。

飲水量；P、F1及びF2世代では、生育期間中の最初と最後の2週間に毎日測定した。F2b世代では生育期間の最初の2週間に毎日測定した。

体重変化；全動物について毎週測定した。

交配及び交尾の確認；交配は雌雄1対1で同居させ、翌朝に膣栓形成または膣垢中の精子の有無により、交尾を確認し、この日を妊娠0日として起算した。

繁殖性に関する指標；出産時に各母動物ごとに産児数、生存児数及び性別を調査し、外表異常を検査した。出生児動物について生死を毎日観察し、哺育0、4、8、12及び21日目に個体別体重及び生存児数を調べた。

交配、妊娠、出産及び哺育期間の観察に基づき、次の指標を算出した。



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。

$$\begin{aligned}\text{交尾率(\%)} &= \frac{\text{交尾を確認した雌動物数}}{\text{交配させた雌動物数}} \times 100 \\ \text{妊娠率(\%)} &= \frac{\text{妊娠母動物数}}{\text{交配させた雌動物数}} \times 100 \\ \text{出産率(\%)} &= \frac{\text{出産した母動物数}}{\text{交尾を確認した雌動物数}} \times 100\end{aligned}$$

上記3つの指標については、分娩後死亡した母動物は除いて算出した。  
また、以下の指標は各腹毎に算出し、この平均を示した。

$$\begin{aligned}\text{死産児率(\%)} &= \left( \frac{\text{各腹の死産児数}}{\text{各腹の出産児数}} \right) \times 100 \\ \text{哺育4日目の死亡率(\%)} &= \left( \frac{\text{各腹の哺育4日目までの死亡児数}}{\text{各腹の出産児数}} \right) \times 100 \\ \text{哺育8日目の死亡率(\%)} &= \left( \frac{\text{各腹の哺育8日目までの死亡児数}}{\text{各腹の出産児数}} \right) \times 100 \\ \text{哺育12日目の死亡率(\%)} &= \left( \frac{\text{各腹の哺育12日目までの死亡児数}}{\text{各腹の出産児数}} \right) \times 100 \\ \text{哺育21日目の死亡率(\%)} &= \left( \frac{\text{各腹の哺育21日目までの死亡児数}}{\text{各腹の出産児数}} \right) \times 100\end{aligned}$$

児動物の発育に関する指標；各世代の離乳前の全児動物について、正向反射、全正向反射、驚愕反応を達成するまでの時間及び出生後20日後に瞳孔反射を示す児動物の割合(%)を測定し、発育の程度を調べた。

臓器重量；試験終了時に雌雄の全生存親動物及びF1及びF2の児動物の各腹雌雄各1匹について、脳、胸腺、心、肺、肝、脾、腎、副腎、精巣、精嚢を含む前立腺(親動物のみ)及び卵巣の重量を測定し、体重比を算出した。

肉眼的病理検査；試験終了時に雌雄の全生存親動物、継代用に選抜されなかったF1a児動物、F1bの全児動物、生育用に選抜されなかったF2児動物及び生育後のF2児動物を対象として肉眼的病理検査を実施した。

病理組織学的検査；試験終了時のF1世代の全生存親動物及びF2a世代の全離乳児を対象とし、肺、肝、胸腺、脾、腎について実施した。

また、追加的にP世代及びF1a世代の対照群及び12500ppm群の成熟動物について、生殖器官(精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、卵巣、子宮、膈)を検査した。

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。

表1. 試験の概要

世代	期間(日)	作業手順	試験項目
P	<p>生育 (16週)</p> <p>1回目交配</p> <p>妊娠 (3週) F1a出産</p> <p>哺育 (3週)</p> <p>離乳</p> <p>生育(10日) 2回目交配(3週) 妊娠 (3週) F1b出産 哺育 (3週) 離乳</p>	<p>雌雄1対1で交配、 交尾は膣垢中の精子 の有無または膣栓で 確認。(妊娠0日)</p> <p>継代用に各群各腹か ら雌雄各1匹、合計雌 雄28匹を選抜</p> <p>(1回目交配に準じる)</p>	<p>一般状態、生死を毎日観察 摂餌量、体重を週1回測定、飲水 量を最初と最後2週間に測定 交配状況の観察 交尾前時間の測定、体重を週1回 測定</p> <p>体重を週1回測定</p> <p>出産状況の観察 出産児数、生存児数、死産児数、 外表面異常、性比、同腹生存児体 重を測定 親動物の体重、摂餌量を週1回測 定。哺育4, 8, 12及び21日目に 生存児数、児動物体重を測定 児動物発育程度を測定 継代用に選抜されなかった児動 物を屠殺、臓器重量測定、肉眼的 病理検査 (1回目交配に準じる) (1回目交配に準じる) (1回目交配に準じる) (F1aに準ずる) (F1aに準ずる) 親動物屠殺、臓器重量測定、肉眼 的病理検査 児動物屠殺、臓器重量測定、肉眼 的病理検査</p>
F1	<p>生育 (16週) 1回目交配(3週) 妊娠 (3週) F2a出産 哺育 (3週) 離乳 (3週)</p> <p>生育 (10日) 2回目交配(3週) 妊娠 (3週) F2b出産 哺育 (3週) 離乳</p>	<p>(P世代に準ずる)</p> <p>生育用に各群各腹か ら雌雄各1匹、合計雌 雄24匹を選抜</p> <p>(P世代に準ずる)</p> <p>(F2aに準ずる)</p>	<p>(P世代に準ずる) (P世代に準ずる) (P世代に準ずる) (F1aに準ずる) (F1aに準ずる) 生育用に選抜されなかった児動 物を屠殺、臓器重量測定、肉眼的 及び病理組織学的検査 (P世代に準ずる) (P世代に準ずる) (P世代に準ずる) (F1aに準ずる) (F1aに準ずる) 親動物を屠殺、臓器重量測定、 肉眼的及び病理組織学的検査 生育用に選抜されなかった児動 物を屠殺、臓器重量測定、肉眼的 及び病理組織学的検査</p>
F2	<p>F2a生育(90日)</p> <p>F2b生育(14日)</p>		<p>(P世代に準ずる) 生育期間終了時に生存動物屠殺 臓器重量測定、肉眼的病理検査 (P世代に準ずる) 生育期間終了時に生存動物屠殺 肉眼的病理検査</p>

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。

結果：

親動物

一般状態及び生死；親動物の死亡例が、下記の表に示す通り観察された。500ppm群でみられた死亡について、雄1例は用量に関連していないこと、雌2例では共通する所見が何ら見られず、検体に関連した所見が認められなかったことから、投与に関連したものとは考えられなかった。

その他の生存親動物では、一般状態に投与による影響はみられなかった。

表2. 途中死亡あるいは切迫屠殺動物の発生状況

試験群	対照群	500ppm		2500ppm		12500ppm	
P世代	死亡なし	・♂1匹死亡(試験開始29週後)		・♀(No. 221)死亡(2回目妊娠期間、妊娠22日目)		・♀(No. 237)死亡(2回目妊娠期間、妊娠22日目)	
		・♀1匹切迫屠殺(1回目交配期間18日目)				・♀(No. 235)切迫屠殺(2回目分娩後8日)	
死亡数		♂ 1	♀ 1	♂ 0	♀ 1	♂ 0	♀ 2
F1a世代	・♂1匹切迫屠殺(生後30日目)	・♀1匹死亡(生後33日目)		死亡なし		・♀(No. 459)切迫屠殺(1回目分娩3日後)	
						・♀(No. 479)死亡(1回目分娩8日後)	
						・♀(No. 474)死亡(2回目分娩0日後)	
						・♀(No. 478)死亡(2回目分娩0日後)	
死亡数	♂ 1  ♀ 0	♂ 0	♀ 1			♂ 0	♀ 4

申請者注) 数例の死亡が周産期に発生したことから、本検体と難産の関連性について検討した。難産は、妊娠期間の延長、分娩時間の延長、分娩困難及び異常分娩などを特徴とするが、上記の死亡例のうち、500ppm群の雌2例(P世代及びF1a世代)はいずれも、妊娠母動物ではなかったことから、本検体の妊娠あるいは分娩に対する影響の検討から除外した。2500ppm群の雌1例(No. 221)については、試験に用いた系統における難産の背景データとして、過去2試験で対照群に1例あるいは2例の難産を認めている。従って、No. 221はこの範囲内であること、また、同群の次世代で難産は認められていないことから、投与に関連した変化とは考えられなかった。

次に12500ppm群の死亡例については以下のとおりであった。P世代のNo. 235は2回目の妊娠期間中から後肢の麻痺を認め、体重が低下しており、2回目の分娩後、8日目に切迫屠殺した。この動物は剖検時に子宮内に胎児を認めず、子宮は拡張していた。F1a世代のNo. 479も正常に分娩したのち、8日後に死亡した。この例もまた、剖検時に子宮内に胎児を認められなかったため、これら2例については、分娩に何らかの異常があったとは考えられず、難産との関連性はないものと考えられる。

上記以外の12500ppm群のNo. 237、459、474及び478については、生存児を分娩していたものの、剖検時に子宮内に残余の胎児を認めた。これら4例のうち、No. 459は、分娩が2日間に亘ったが、その他の3例ではいずれも特記すべき一般状態の変化は認められなかった。

妊娠の維持及び分娩は、プロゲステロン及びエストロゲン等のホルモンにより調節

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。

されていることから、難産の原因のひとつとしては、これらホルモンのバランスの異常が考えられる。しかし、本検体を用いた試験結果から、ラットを用いた90日間混餌投与試験、ラットを用いた慢性・発がん性併合試験、及び本繁殖試験において、いずれの内分泌にかかわる臓器について重量に変化はなく、また病理組織学的検査においても所見は認められなかったことから、本検体が内分泌系に作用するものとは考えられなかった。

一方、後述するように、12500ppm群の母動物では重度の増体重抑制がみられ、この群における母動物の全身状態の悪化が明白であった。従ってこれらの周産期の死亡は、検体投与によるホルモンのバランス異常によるものではなく、最大耐量を超えた本投与量による母動物の全身状態の悪化に関連している可能性が示唆された。

摂餌量；交配前期間中の摂餌量について、以下に示すように雌雄の2500ppm以上の群で低下が認められた。摂餌効率に明白な差異はみられなかった。

表 3. 摂餌量(対照群を100としたときの割合)

世代	性別	雄			雌		
	(ppm)	500	2500	12500	500	2500	12500
P世代		98.6	89.2	88.7	101.1	95.1	90.7
F1a世代		94.3	92.0	90.7	99.5	85.6	85.6
F2a世代		95.8	93.3	87.2	101.2	93.7	96.3

P世代:交配前期間中の平均。F1a世代:交配前期間中の平均。F2a世代:哺育期間中の平均。

検体摂取量；各世代の摂餌量および投与濃度から検体摂取量を算出した。

表 4. 検体摂取量(mg/kg/日)

世代	性別	雄			雌		
	(ppm)	500	2500	12500	500	2500	12500
P世代		35.5	175.6	888.4	41.9	206.1	1041.5
F1a世代		38.8	198.4	1034.9	47.3	223.7	1168.0
F2a世代		42.9	211.3	1097.9	50.9	244.2	1316.0

P世代:交配前期間中の平均。F1a世代:交配前期間中の平均。F2a世代:哺育期間中の平均。

飲水量；検体投与による影響はみられなかった。

体重；生育期間中、2500ppm以上の雌雄群で増体重抑制がみられ特に雌で顕著であり、12500ppm群のP世代雌では最終体重が対照値の77%まで低下した。500ppm群では増体重抑制は認められなかった。

同様に妊娠期間中母動物の増体重抑制が2500ppm群以上の群で認められた。

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。

表5-1. 生育期間中の体重(対照群を100としたときの割合)

世代	試験群 (ppm)	P親世代		F1a世代		F2a世代		F2b世代	
		試験開始時(試験開始後0週)	剖検時(試験開始後30週)	生後3週	剖検時(生後33週)	生後3週	剖検時(生後17週)	生後3週	剖検時(生後6週)
雄	500	100	97	96	92	106	93	93	97
	2500	99	86	91	85	96	88	96	97
	12500	100	83	85	81	93	82	87	90
雌	500	99	90	97	94	102	95	96	99
	2500	99	87	91	82	92	88	100	96
	12500	100	77	86	79	84	86	88	86

表5-2. 妊娠中及び分娩後期間の体重(対照群を100としたときの割合)

世代	試験群 (ppm)	P母動物				F1a母動物			
		妊娠0日	妊娠20日	分娩0日	分娩21日	妊娠0日	妊娠20日	分娩0日	分娩21日
1回目交配	500	98	98	96	96	97	99	96	98
	2500	92	94	93	94	86	92	88	92
	12500	83	89	85	89	82	88	85	90
2回目交配	500	93	96	96	94	99	99	98	97
	2500	90	92	92	92	86	89	88	89
	12500	83	84	84	88	84	87	86	90

剖検、臓器重量及び病理組織学的検査；剖検時に投与に起因する変化は認められなかった。表6に示すように、臓器重量について、胸腺、肺、腎臓、肝臓の対体重比、及び前立腺実重量に変動が見られたが、いずれも、一世代の一方の性のみみられ、また関連した病理組織学的検査結果も認められないことから、検体投与との関連性はないものと考えられた。

病理組織学的検査において、F1a世代の12500ppm群の雌親動物に腎髄質集合管拡張、同群の雌雄に胸腺皮質の低細胞化がやや増加したが、その他の世代では認められないことから投与との関連性はないものと考えられた。その他の所見は認められなかった。

P世代及びF1a世代の生殖器官(精巣、精巣上体、精囊、前立腺、卵巣、子宮、膈)に検体投与による影響はみられなかった。

#### 繁殖性

交尾率、出産率、交尾成立までの期間、妊娠期間、総出産児数、生存児数、死産児率、児動物の性比について、表6及び表7に示すように、初回及び2回目の交配のいずれにおいても検体投与による影響は認められなかった。

#### 児動物

表7に示すように、2500ppm以上の群の児動物の体重は出生時から、哺育21日まで対照群に比べ低値であった。また、哺育期間の死亡率についても、F1a児動物、F2b児動物の12500ppm投与群で増加した。

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。

表面反射、驚愕反射、全正向反射及び瞳孔反射に、いずれの群においても投与による影響はみられなかった。

剖検時に投与に起因する変化は認められなかった。表7に示すように、臓器重量について、統計学的有意差が散見されたが、世代を通して共通して認められなかったため、投与に起因したものとは考えられなかった。病理組織学的検査において、投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

ジフルフェニカンをラットの各世代に混餌投与した結果、親動物に対する影響として、12500ppmの母動物で死亡の増加が認められた。また、2500ppm以上の群の雌雄で増体重抑制、摂餌量の低下が認められたことから、親動物に対する無毒性量は500ppm(P世代:雄35.5mg/kg/日、雌41.9mg/kg/日、F1a世代:雄38.8mg/kg/日、雌47.3mg/kg/日、F2a世代:雄42.9mg/kg/日、雌50.9mg/kg/日)と考えられた。

児動物に対する影響としては、出生時体重の低下、哺育期間中の増体重抑制が2500ppm以上で認められた。また、哺育期間中の死亡率の増加が12500ppm群でみられた。しかし児動物の発達の指標への影響はいずれの投与群でもみられなかった。従って児動物に対する無毒性量についても500ppm(P世代:雄35.5mg/kg/日、雌41.9mg/kg/日、F1a世代:雄38.8mg/kg/日、雌47.3mg/kg/日、F2a世代:雄42.9mg/kg/日、雌50.9mg/kg/日)と考えられた。

繁殖性に関する指標(交尾率、出産率、交尾成立までの期間、妊娠期間、総出産児数、生存児数、死産児率、児動物の性比)に影響はみられず、繁殖性に対する無毒性量は12500ppm(P世代:雄888.4mg/kg/日、雌1041.5mg/kg/日、F1a世代:雄1034.9mg/kg/日、雌1168.0mg/kg/日、F2a世代:雄1097.9mg/kg/日、雌1316.0mg/kg/日)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。

表6. 結果の概要 親動物及び児動物

世代		親 : P				児 : F1				親 : F1a				児 : F2				親 : F2a													
投与量 (ppm)		0	500	2500	12500	0	500	2500	12500	0	500	2500	12500	0	500	2500	12500	0	500	2500	12500										
動物数	雄	32	32	32	32	28	28	28	28	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24										
	雌	32	32	32	32	28	28	28	28	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24										
一般状態及び死亡		2500、12500ppm群で妊娠期間あるいは分娩後短期間に死亡がみられた。文中の表2参照。																													
生育期間中の食餌効率*	雄	6.0	6.0	6.6	6.9	5.4	5.5	5.8	6.0	5.6	5.8	6.2	6.1																		
	雌	10.3	10.9	11.8	14.3	9.3	9.3	9.4	9.9	8.8	9.2	9.5	9.7																		
交配成績	交尾率 (%)	a	100	100	96.9	96.9	92.9	96.4	89.3	96.2	/																				
		b	93.8	77.4	90.3	83.3	92.9	96.4	96.4	95.8																					
	妊娠率 (%)	a	100.0	96.8	96.9	90.6	92.9	89.3	85.7	84.6																					
		b	78.1	67.7	74.2	73.3	92.9	92.9	92.9	91.7																					
	出産率 (%)	a	100	96.8	100	93.5	100	92.6	96.0	88.0																					
		b	83.3	87.5	82.1	88.0	100	96.3	96.3	95.7																					
	交尾成立までの期間 (日)	a	3.0	3.0	3.0	2.0	2.0	3.0	2.0	2.5																					
		b	2.0	3.0	3.0	3.5	2.0	3.5	2.0	3.0																					
	妊娠期間 (日)	a	22.0	21.9	21.7	21.6	21.8	22.3	22.1	21.9																					
		b	22.1	22.1	22.2	22.0	21.7	21.8	21.7	21.8																					
	臓器重量	雄	脳体重比				↑103																								
			肺体重比					↑107	↑106	↑109																					
腎体重比									↑107	↑109	↑111	↑108																			
前立腺重量									↑111	↑110	↑112	↑115																			
雌		心体重比			↑104	↑105																									
		胸腺体重比	↓93	↓92	↓86																										
		肝体重比									↑112	↑114	↑120																		
		副腎重量				↑114																									
脾体重比							↓91	↓87																							
肉眼的病理検査		投与に起因すると考えられる所見は認められなかった。																													
#病理組織学的検査	腎髄質集合管拡張	雄					0/27	0/28	0/28	0/28	/																				
	雌						0/28	0/27	1/28	2/24																					
	胸腺皮質低細胞性	雄					0/27	0/28	0/28	4/28																					
	雌						0/28	0/27	0/28	6/24																					
児動物	出産児数	a	12.2	12.7	12.9	13.4	11.9	12.5	12.6	12.2	/																				
		b	12.4	12.9	12.3	11.2	13.3	13.5	13.0	13.2																					
	生存児数	a	12.2	12.7	12.8	13.1	11.8	12.3	12.4	12.1																					
		b	11.8	12.4	11.1	10.6	13.2	13.2	12.8	12.8																					
	死産児率 (%)	a	0.2	0.6	0.7	2.8	0.3	1.3	1.3	0.7																					
		b	4.2	3.3	8.9	4.8	0.8	2.6	1.5	3.6																					

↑ ↓ : p < 0.05, ↑ ↓ : p < 0.01 WILLIAM検定 a: 第1産児, b: 第2産児

交尾率 (%) = 交尾を確認した雌動物の最終生存数 / 交配させた雌動物数の最終生存数 (分娩後死亡母動物を除いた)

妊娠率 (%) = 妊娠母動物の最終生存数 / 交配させた雌動物数の最終生存数 (分娩後死亡母動物を除いた)

出産率 (%) = 出産した母動物の生存数 / 交尾を確認した雌動物の生存数 (分娩後死亡母動物を除いた)

\*食餌効率\* = 摂餌量の群平均 / 増体量の群平均

#病理組織学的検査の数字は 所見のみられた動物数 / 検査動物数を示す。

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。

表7. 結果の概要 児動物

世代			親:P 児:F1				親:F1a 児:F2					
投与量 (ppm)			0	500	2500	12500	0	500	2500	12500		
児動物	体重	出生時	a	6.0	5.9	↓5.7	↓5.2	5.8	5.8	5.6	↓5.4	
			b	6.1	5.9	↓5.8	↓5.7	5.9	5.8	5.8	↓5.4	
		哺育4日目	a	9.5	9.3	↓8.7	↓8.2	8.7	9.0	8.3	↓7.7	
			b	9.7	9.3	↓9.2	9.2	8.4	8.4	8.5	↓7.2	
		哺育8日目	a	15.3	15.4	↓14.2	↓13.5	14.9	15.1	13.9	↓12.9	
			b	15.8	15.4	↓15.3	↓14.9	13.6	14.0	13.4	↓11.4	
		哺育12日目	a	22.8	22.9	↓21.2	↓20.1	22.6	22.6	21.4	↓20.3	
			b	23.2	22.7	↓22.2	↓21.8	20.6	21.3	20.3	↓18.3	
		哺育21日目	a	43.8	42.7	↓38.0	↓34.8	43.3	42.4	↓39.0	↓36.0	
			b	45.8	43.7	↓40.9	↓38.4	39.3	40.4	↓36.5	↓35.3	
		死亡率 (%)	哺育4日目	a	2.2	3.3	3.7	↑7.3	5.1	4.3	3.4	6.3
				b	9.6	5.8	12.9	7.5	2.2	↓6.0	2.5	↑13.8
	哺育8日目		a	3.1	4.3	4.7	↑9.0	7.0	5.0	3.9	10.3	
			b	11.3	6.6	13.5	7.5	3.9	↑8.2	2.8	↑20.7	
	哺育12日目		a	3.1	4.5	4.9	↑10.5	7.3	5.3	3.9	11.8	
			b	11.8	7.4	14.4	7.5	5.3	9.0	3.9	↑23.9	
	哺育21日目		a	3.4	5.6	6.4	↑11.2	7.3	5.7	4.9	13.0	
			b	11.8	8.4	15.1	7.9	6.4	9.2	4.2	↑26.4	
	性比 (雄の%)	出生時	a	52.8	48.4	53.2	54.7	57.0	↓48.4	↓47.4	↓48.5	
			b	52.0	48.1	46.8	52.9	45.3	48.1	47.2	50.8	
		離乳時	a	52.7	47.7	54.2	55.3	58.5	↓48.6	↓48.3	51.0	
			b	52.9	48.7	46.7	50.9	45.6	49.8	47.4	50.5	
	発育程度	表面正向反射(日)	a	24.8	25.0	25.0	↑25.1	24.6	24.6	↑25.1	24.6	
			b	25.3	25.4	25.6	25.0	23.7	23.8	23.7	23.9	
驚愕反応(日)		a	34.6	34.5	34.7	34.9	34.8	35.0	↑35.2	↑35.5		
		b	34.5	34.5	34.6	34.4	34.8	34.6	35.0	↑35.6		
全正向反射(日)		a	36.8	36.9	36.9	37.0	37.4	37.4	37.5	37.6		
		b	36.8	36.8	37.1	36.8	37.7	37.8	37.8	38.2		
瞳孔反射(日)		a	100	100	100	100	99.7	100	99.6	98.1		
		b	99.7	100	100	99.6	100	99.7	100	98.8		
外表異常			ab	投与に起因すると思われる所見は認められなかった。								
臓器重量	雄	a	脾体重比			↓91	↓87			↓85	↓88	
			肝体重比								↑110	
		精巣体重比									↑110	
		b	脾体重比					↓81				
	精巣体重比						↑107					
	雌	a	脾体重比		↓91	↓89	↓86					
			胸腺体重比				↓83					
		b	肝体重比				↑106					
脾体重比					↓85	↓75						
肉眼的病理検査			a b	検体投与に起因すると思われる所見は認められなかった								
#病理組織学的検査	腎髓質集合管拡張 a	雄					0/25	0/20	0/24	1/19		
		雌					0/24	0/20	2/24	2/17		
	腎皮質尿管拡張 a	雄					0/25	0/20	0/24	2/19		
		雌					0/24	0/20	0/24	1/17		

↑ ↓ : p < 0.05, ↑ ↓ : p < 0.01 WILLIAM検定。a: 第1産児、b: 第2産児

#病理組織学的検査の数字は 所見のみられた動物数/検査動物数を示す。



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 ラットにおける催奇形性試験

(毒性資料No. 26)

試験機関：

報告書作成年：1984年[GLP対応]

検体純度：

供試動物：CrL:COBS:CD(SD)BR系雌ラット（8～9週齢）1群妊娠ラット25匹

投与期間：10日間投与（1984年2月10日～1984年2月28日）

投与方法：検体を0.25%tragacanth/0.2% Tween 80水溶液に懸濁し、50、500及び5000mg/kg/日の用量段階で妊娠6日目から15日目までの10日間、妊娠ラットに1日1回強制経口投与した。なお対照群には溶媒を同様に投与した。臍垢中の精子の存在あるいは臍栓の形成により交尾成立日を確認し、その日を妊娠0日目とした。

観察・検査項目：

母動物；一般状態及び生死を毎日観察し、妊娠1、3、6、10、14、17及び20日目に体重を測定した。また、妊娠1～2、3～5、6～9、10～13、14～16及び17～19日間の摂餌量を測定した。妊娠20日目に帝王切開し、黄体数、着床数、生存及び死亡・吸収胎児数を検査した。

生存胎児；性別、体重及び外表異常の観察を行った。各同腹児群の1/2の胎児については骨格標本作製し、骨格異常の有無を検査し、残りの胎児については内臓異常の有無を検査した。

結果：概要を表1及び表2に示した。

親動物の死亡はみられなかった。50mg/kg群の2例が妊娠16日に早産した。これらの動物は用量との関連性がないことから、偶発的なものと考えられ以降の計算から除外した。

一般症状として流涎及び褐色の被毛着色が全投与群で認められた。5000mg/kg群ではこれらの所見に加え、淡色の便が観察された。しかし、これらの変化は関連するその他の所見を認めないことから、毒性学的に意味のある変化とは考えられなかった。

妊娠6～20日の平均増体重が5000mg/kg群で僅かに低下したが、対照群との差異は小さく毒性影響とはみなさなかった。

摂餌量に投与による影響はみられなかった。

剖検においても、検体投与に関連した変化はみられなかった。

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。

表1. 体重の推移

投与量 mg/kg	動物 数	平均体重 (g)					平均増体重(g)
		妊娠6日	妊娠10日	妊娠14日	妊娠17日	妊娠20日	妊娠6~20日
対照群	19	223.6	246.1	273.7	299.9	344.6	121.0
50	21	218.4	238.9	264.7	289.1	329.8	111.4
500	20*	225.8	244.1	267.4	297.3	340.1	114.3
5000	22*	223.5	237.5	262.9	290.3	333.1	109.6

\*500及び5000ppm群の各1例は帝王切開時に吸収胚のみが認められたため、これらの動物は除いた。

帝王切開時、生存胎児の体重、性比に投与による影響はみられなかった。胎児の内臓検査において、5000mg/kg投与群での内臓異常を有する胎児の頻度は、対照群に比べてやや高い傾向がみられたが、認められた様々なタイプの異常の間にいかなる関連性もなく、この差は偶発的なものと考えられた。

骨格検査においても、特定の所見を有する胎児数が増加するようなことはなく投与による影響はみられなかった。

本検体は5000mg/kg/日を最高用量として投与した結果、母動物及び胎児に影響は認められなかった。従って親動物及び胎児に対するNOAELはともに5000mg/kg/日と考えられた。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。

表2 結果の概要

投与群 (mg/kg/日)		0	50	500	5000
1 群当たり動物数		25	25	25	25
親	一般状態	検体投与に関連した毒性影響はみられなかった。			
	死亡数 (率)	0/25 (0%)	0/25 (0%)	0/25 (0%)	0/25 (0%)
	妊娠数 (率)	19/25 (76.0%)	21/25 (91.3%)	20/25 (80.0%)	22/25 (88.0%)
	妊娠しなかった動物数	6	2	5	3
	早産母動物数	0	2	0	0
	生存児を認めない母動物数	0	0	1	1
動物 着床所見	検査親動物数 #	19	21	20	22
	黄体数 *	12.2	11.5	12.1	11.9
	着床数 *	11.3	10.5	10.2	10.2
	生存胎児数 *	10.5	9.8	10.3	9.9
	総死亡杯数 *	0.8	0.8	0.4	0.8
	初期吸収胚数 *	0.6	0.8	0.4	0.8
	後期吸収胚数 *	0.2	0.0	0.1	0.0
	着床前死亡率 (%) *	7.4	8.0	11.0	10.1
	着床後死亡率 (%) *	7.3	6.8	8.2	11.0
	胎児動物	生存胎児体重 (g)	3.49	3.40	3.54
性比(雄/雌)	0.98	0.96	1.22	0.90	
外表検査胎児数	199	205	195	207	
外表奇形を有する胎児数	2	2	0	2	
奇形: 肛門閉塞	1	0	0	0	
無尾	1	0	0	0	
臍ヘルニア	0	2	0	1	
口蓋裂	0	0	0	1	
内臓検査胎児数	98	99	97	102	
内臓奇形を有する胎児数	1	3	1	0	
奇形 部分的下大静脈/肺中葉欠落	1	0	0	0	
左小眼球症と皺状網膜	0	1	0	1	
右側心	1	1	0	0	
心室隔壁欠損	0	2a	1b	0	
両側性水晶体縮小	0	0	0	1	
内臓異常を有する胎児数(率)	3 (3.1%)	5 (5.1%)	5 (5.1%)	10 (9.8%)	
異常 出血:皮下	1	0	0	2	
出血:左肺葉	1	2	0	0	
出血:腹腔内	0	1	1	1	
尿管拡張(片側/両側)	0	0	4	3	
腎盂拡張	1	1	0	2	
精巣の位置のずれ	0	1	0	2	
無名動脈欠損	0	0	0	1	
骨格検査胎児数	98	101	97	102	
骨格異常を有する胎児数	13	16	12	14	
化骨遅延: 頭蓋骨 未化骨を含む	3	4	4	1	
: 肋骨;未化骨を含む	0	0	0	1	
: 椎骨;未化骨を含む	3	7	2	1	
: 骨盤;未化骨を含む	2	3	1	3	
: 指骨/趾骨;未化骨を含む	1	1	0	0	
変異: 余剰肋骨	1	5	0	2	
: 肋骨 波状/曲がり	0	2	0	0	
: 短い肋骨	2	0	2	4	
: 頸肋	1	2	1	0	

統計処理: (KRUSKAL-WALLIS, FISHERの直接確率検定法, JONCKEERS TEST)

# 生存児を認めない母動物も含む。\* 1匹の妊娠動物あたり

a: うち1例は右側心の例と同一。b: 小型児(体重2.46g)であり、小眼球症を併発していた。

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ウサギにおける催奇形性試験

(毒性資料No. 原体-27)

試験機関：

報告書作成年：1984年[GLP対応]

検体の純度：

供試動物： New Zealand 白色種 ウサギ雌 1群16匹 試験開始時 13～22週齢

妊娠第1日目体重：3290g～3805g

投与期間： 妊娠期間13日間 (試験期間1984年2月7日～1984年3月15日)

投与方法： 雌動物は妊性の確認された雄と交配し、交尾が確認された雌動物については、排卵の誘起を確実にするため黄体形成ホルモン(25I.U.)を静注した。交尾を確認した日を妊娠0日とした。

検体を0.25%tragacanth/0.2% Tween 80水溶液に懸濁し、50、350及び2500mg/kgの投与量で妊娠6日から18日までの13日間、毎日1回妊娠ウサギに強制経口投与した。なお、対照群には溶媒を同様に投与した。

用量設定の根拠：

観察・検査項目：

親動物；一般状態及び生死を毎日観察し、妊娠1、6、10、14、19、23及び29日に体重及び摂餌量を測定した。妊娠29日目に帝王切開し、母動物の肉眼的病理変化についても検査した。また卵巣、子宮については黄体数、生存胎児数及び位置、胚/胎児死亡数及び位置、異常胎児を観察した。

生存胎児；外表異常を検査した後、体重測定を行い、解剖して内臓異常を検査し、性別を判定した。異常が認められた胎児については、顕微解剖又は病理組織学的検査を行った。内臓異常検査後、骨格標本作製し、骨格異常の有無を検査した。

結果：

親動物；投与に関連した死亡はみられなかった。

一般状態の変化として、赤色尿が2500mg/kg群の16例中13例に、特に投与期間後半に認められた。350mg/kg群では赤色尿が13例中3例に投与終了直後に認められた。50mg/kg群及び対照群では観察されなかった。

赤色尿の頻度は用量に関連しており、また投与終了以降は経時的に減少し、試験終了時には全く観察されなかったことから検体による毒性所見というより、そのようなきわめて高い用量を投与したために代謝物の尿中への排泄が量的に多く観察された可能性が示唆された。従ってこれらの尿変色は毒性作用に関連したものとは考えられなかった。また、50及び2500mg/kg群で淡色の便が認められたが、用量との関

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。

連がなく、毒性学的に意味のある変化とは考えられなかった。

また、2500mg/kg群では投与初期に摂餌量及び体重増加量が減少し、摂餌量の低下は統計学的有意差が認められた。

子宮内検査の結果、着床所見に投与に起因した影響は認められなかった。また、剖検時に異常は認められなかった。

胎児；体重、性比、奇形の発生率において投与による影響は認められなかった。

内臓検査において、肺中葉が欠損している胎児が、50及び2500mg/kg群でそれぞれ3及び4例みられた。本所見の発生率はそれぞれ3.54%及び3.17%であり、当該試験機関における背景データ( )の範囲内であったこと、及び用量との関連性がみられないことから、投与に関連した変化とは考えられなかった。骨格変異では、13肋骨の頻度が増加し、2500mg/kg群で統計学的に有意差が認められた(42.2%)。これは対照群の13肋骨の頻度が低値であることによるものとも考えられ、以下に示すように背景データ内であったことから、毒性学的に意味のある変化とは考えられなかった。また母動物毒性が2500mg/kgでみられることから、母動物の一般状態の変化に起因する可能性も示唆された。

申請者注)

以上の結果より、本検体を妊娠ウサギに投与したとき、2500mg/kg群の母動物に摂餌量減少、増体重抑制が認められた。従って本試験における無毒性量は母動物に対して350mg/kg/日であると判断された。また、児動物にはなんら所見が認められなかったことから、児動物に対する無毒性量は2500mg/kg/日と考えられた。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。

結果の概要

投与群 (mg/kg/日)		0	50	350	2500	
1群当たり動物数		16	16	15	16	
一般状態		検体投与に関連した毒性影響は認められなかった。				
死亡数 (率)		2(12.5%)	0	1(6.3%)	0	
妊娠数		12	16	13	16	
非妊娠数		2	0	0	0	
流産動物数		0	0	1	0	
親動物	摂餌量	妊娠6~9日(g)	179	176	166	↓132
		10~13日	188	166	168	↓135
		14~18日	185	179	173	↓148
		19~22日	176	175	185	171
		23~28日	147	158	160	155
	体重増加量	妊娠6~10日(g)	40	63	53	7
		10~14日	126	103	110	70
		14~19日	86	103	102	107
		19~23日	91	122	132	114
		23~29日	140	156	155	166
	着床所見	検査親動物数	12	16	13	16
		黄体数*	9.9	10.8	11.5	9.8
		着床数*	8.7	8.1	8.9	8.8
		生存胎児数*	8.1	7.1	7.5	7.9
		総死亡杯数*	0.6	1.1	1.4	0.9
		初期吸収数*	0.4	0.3	0.3	0.3
後期吸収数*		0.2	0.8	↑1.1	0.6	
着床前死亡率**		11.8	26.1	22.2	10.2	
着床後死亡率**	7.9	10.7	14.3	10.5		
胎児動物	生存胎児体重(g)	43.5	46.3	45.4	44.5	
	性比(雄%)	49.2	56.1	57.5	49.9	
	外表検査胎児数	97	113	98	126	
	外表奇形を有する胎児数	1	1	0	2	
	奇形: 前肢湾曲	1	0	0	2	
	多指症	1	0	0	0	
	猿頭症	0	1	0	0	
	内臓検査胎児数	97	113	98	126	
	内臓奇形を有する胎児数	0	1	1	0	
	奇形 単眼症	0	1	0	0	
	後食道大動脈弓	0	0	1	0	
	内臓異常を有する胎児数	2(2.2%)	4(5.3%)	1(1.0%)	4(3.0%)	
	異常 肝葉に開裂	2	0	1	0	
	肺中葉の欠損**	0	3(3.54%)	0	4(3.17%)	
	角膜表面の隆起	0	1	0	0	
	骨格検査胎児数	96	111	97	124	
	骨格異常を有する胎児数	14(15.0%)	15(12.5%)	13(13.1%)	14(11.7%)	
	縫合骨	2	2	1	7	
	頸部肋骨	3	2	2	2	
	胸骨分節の一部癒合	1	2	5	2	
	腹側に余剰の胸骨核	5	6	1	1	
	肋骨の不規則化骨	1	0	0	0	
	肋骨の一部癒合	0	1	0	1	
	頭頂間骨二分化	1	0	0	0	
腹側に余剰の椎骨核	0	0	0	1		
化骨遅延: 椎骨;未化骨を含む	1	0	0	0		
変異: 13 肋骨	19.0%	36.4%	39.1%	↑42.2%		
: 胸骨核の変異	28.3%	14.4%	22.0%	7.5%		

\*1匹の妊娠動物あたり      ↑ ↓ : p<0.05、◆◆ : p<0.01 (KRUSKAL-WALLISの検定法)

\*\*当該試験機関における背景データ、

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。

(13) 変異原性

① 細菌を用いたDNA修復試験

(毒性資料No. -原体28)

試験機関：

報告書作成年：1989年 [GLP対応]

検体の純度：

方 法： Rec-assay

枯草菌 *Bacillus subtilis* の組換修復機構保持株 (H-17) と欠損株 (M-45) を用い、代謝活性化及び非活性化法によってDNA損傷の誘発性を検定した。被験物質はジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて溶解した。濃度設定試験において、溶解限界濃度の 3000  $\mu$ g/disk (代謝活性化法では1500  $\mu$ g/disk) でも試験菌株に対する生育阻害作用が認められなかったため、本試験では 3000  $\mu$ g/disk (代謝活性化法では 1500  $\mu$ g/disk) を最高濃度とした。

試験結果： 結果を表に示す。

検体投与群では代謝活性化を含め、最高濃度においても両株に生育阻止を認めなかった。一方、陽性対照 (非活性化法ではマイトマイシンC、活性化法では Trp-P-1) では両株の間で明かな生育阻止の差が生じた。また、陰性対照のカナマイシンでは、両菌株の生育阻止帯の直径は同程度であった。

代謝活性化の有無	薬物	濃度 ( $\mu$ g/disk)	阻止帯の径 (mm)		差 (mm)
			M - 45	H - 17	
非活性化	対照 (DMSO)	0	0.0	0.0	0.0
	ジフルフェニカン	93.8	0.0	0.0	0.0
		188	0.0	0.0	0.0
		375	0.0	0.0	0.0
		750	0.0	0.0	0.0
		1500	0.0	0.0	0.0
		3000	0.0	0.0	0.0
	陰性対照 (カナマイシン)	0.3	6.9	6.9	0.0
陽性対照 (マイトマイシンC)	0.02	9.8	0.0	9.8	
活性化	対照 (DMSO)	0	0.0	0.0	0.0
	ジフルフェニカン	46.9	0.0	0.0	0.0
		93.8	0.0	0.0	0.0
		188	0.0	0.0	0.0
		375	0.0	0.0	0.0
		750	0.0	0.0	0.0
		1500	0.0	0.0	0.0
陽性対照 (Trp-P-1)	20	5.8	0.0	5.8	

以上の結果より、本検体はDNA損傷誘発性を有しないものと判断される。

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。

## ②細菌を用いた復帰突然変異性試験

(毒性資料 No. 原体-29)

試験機関：

報告書作成年：1984年[GLP対応]

検体の純度：

試験系：細菌（サルモネラ菌〈TA1535、TA1537、TA1538、TA98、TA100株〉）

試験方法：

### Ames試験（プレート法）

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) のTA1535、TA1537、TA1538、TA98、TA100株を用いた。Aroclor 1254で薬物代謝系を誘導したラット肝臓から調製したS9の非存在及び存在の条件下で、Amesらの方法により変異原性を検定した。

検体を溶解させるため、ジメチルスルホキシド(DMSO)を用いた。

S9-Mix又は緩衝液0.5mLと菌懸濁液0.1mL、検体溶液0.1mLさらにトッパアガー2mLを試験管に加えて混合し、最少グルコース寒天平板培地に広げた。この培地を37°Cで72時間培養後、生育障害の有無を調べた後、復帰変異コロニー数を計測した。各濃度とも3プレートを用いた。同一の試験条件で2回試験した。

各濃度ごとの復帰変異コロニー数の平均値を算出し、溶媒対照の値と比較した。

試験結果：結果を次表に示した。

表1、2に示したように、2回の試験共に検体を用いた全用量において代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数に溶媒対照の2倍以上で、かつ用量相関性を伴った増加は認められなかった。また、いずれの濃度においても、生育障害は認められなかった。

一方、陽性対照として用いた非代謝活性化条件下でのアジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、2-ニトロフルオレンでは、溶媒対照と比較して明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、代謝活性化条件下での2-アミノアントラセンは、試験に用いたすべての菌株に明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、ジフルフェニカン は代謝活性化の有無にかかわらず本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと判断される。



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。

試験結果表 (本試験) プレート法 試験1

代謝 活性化 系の有無	被験物質 濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	復帰変異数 (コロニー数/プレート)										
		塩基対置換型						フレームシフト型				
		TA100		TA1535		TA1538		TA98		TA1537		
S9Mix (-)	対照 (DMSO)	70	63	18	9	6	6	16	14	19	16	
		68	(67)	13	(13)	9	(7)	16	(15)	15	(17)	
	50	65	63	10	8	12	10	18	14	10	13	
		63	(64)	6	(8)	8	(10)	12	(15)	17	(13)	
	150	62	68	8	9	7	8	17	9	16	10	
		61	(64)	8	(8)	13	(9)	18	(15)	16	(14)	
	500	66	58	4	9	11	3	12	10	12	11	
		63	(62)	6	(6)	7	(7)	14	(12)	9	(11)	
	1500	61	68	5	4	7	8	17	10	12	10	
		66	(65)	9	(6)	11	(9)	12	(13)	8	(10)	
5000	66	64	9†	14†	17†	5†	12†	13†	8†	9†		
	64	(65)	9†	(11)	8†	(10)	10†	(12)	10†	(9)		
S9Mix (+)	対照 (DMSO)	60	68	8	12	15	17	15	19	18	17	
		67	(65)	18	(13)	15	(16)	20	(18)	20	(18)	
	50	76	82	6	5	13	11	23	12	24	14	
		99	(86)	7	(6)	15	(13)	21	(19)	15	(18)	
	150	70	79	15	10	11	10	20	20	12	19	
		79	(76)	10	(12)	12	(11)	14	(18)	18	(16)	
	500	90	81	13	12	11	10	22	26	19	23	
		87	(86)	13	(13)	10	(11)	20	(23)	14	(19)	
	1500	84	79	8	12	11	12	16	22	15	16	
		94	(86)	11	(10)	10	(11)	22	(20)	24	(18)	
5000	67†	93†	10	8	8†	15†	20†	19†	20†	24†		
	95†	(85)	13	(10)	6†	(10)	22†	(20)	17†	(20)		
陽性 対照	S9Mix を必要 としな いもの	名称	NaN <sub>3</sub>		NaN <sub>3</sub>		NF		NF		9-AC	
		用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	5		5		10		10		20	
	コロニー数 /プレート	624	560	775	676	124	99	135	124	198	282	
		672	(619)	668	(706)	113	(112)	149	(136)	131	(204)	
	S9Mix を必要 とする もの	名称	AA		AA		AA		AA		AA	
		用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	2		2		2		2		2	
コロニー数 /プレート	841	793	97	130	158	163	877	770	91	119		
	859	(831)	120	(116)	172	(164)	817	(821)	114	(108)		

(数値) : 3枚の平均値 † : 沈殿析出

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

9-AC : 9-アミノアクリジン

AA : 2-アミノアントラセン

NF : 2-ニトロフルオレン

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。

試験結果表 (本試験) プレート法 試験 2

代謝 活性化 系の有無	被験物質 濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	復帰変異数 (コロニー数/プレート)										
		塩基対置換型						フレームシフト型				
		TA100		TA1535		TA1538		TA98		TA1537		
S9Mix (-)	対照 (DMSO)	83	78	8	10	18	9	15	16	10	14	
		76	(79)	9	(9)	13	(13)	21	(17)	15	(13)	
	50	77	62	8	12	7	11	17	15	18	10	
		72	(70)	1	(7)	15	(11)	17	(16)	10	(13)	
	150	88	73	10	8	11	14	18	21	9	8	
		75	(79)	11	(10)	14	(13)	19	(19)	8	(8)	
	500	57	58	5	6	4	8	10	13	14	9	
		66	(60)	6	(6)	7	(6)	10	(11)	13	(12)	
	1500	72	72	14	9	8	11	15	13	11	10	
		79	(74)	8	(10)	3	(7)	14	(14)	10	(10)	
5000	66 †	80 †	9 †	12 †	12 †	10 †	10 †	14 †	13 †	10 †		
	65 †	(70)	13 †	(11)	12 †	(11)	18 †	(14)	9 †	(11)		
S9Mix (+)	対照 (DMSO)	105	98	7	12	20	14	22	21	17	17	
		84	(96)	14	(11)	15	(16)	21	(21)	20	(18)	
	50	76	90	8	12	18	14	27	23	10	11	
		95	(87)	8	(9)	8	(13)	14	(21)	8	(10)	
	150	82	111	12	7	12	12	20	13	17	16	
		90	(94)	10	(10)	11	(12)	22	(18)	13	(15)	
	500	90	90	10	6	10	12	26	21	9	9	
		104	(95)	6	(7)	11	(11)	24	(24)	27	(15)	
	1500	84	78	5	9	13	11	21	19	11	18	
		108	(90)	13	(9)	7	(10)	27	(22)	12	(14)	
5000	76 †	97 †	11 †	8 †	11 †	18 †	13 †	19 †	13 †	17 †		
	84 †	(86)	20 †	(13)	9 †	(13)	15 †	(16)	17 †	(16)		
陽性 対照	S9Mix を必要 としな いもの	名称	NaN <sub>3</sub>		NaN <sub>3</sub>		NF		NF		9-AC	
		用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	5		5		10		10		20	
	コロニー数 /プレート	824	825	745	798	140	141	167	165	81	89	
		807	(819)	794	(779)	136	(139)	147	(160)	63	(78)	
	S9Mix を必要 とする もの	名称	AA		AA		AA		AA		AA	
		用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	2		2		2		2		2	
コロニー数 /プレート	979	1041	82	137	597	546	774	632	113	91		
	920	(980)	101	(107)	685	(609)	655	(687)	106	(103)		

(数値) : 3枚の平均値 † : 沈殿析出

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

9-AC : 9-アミノアクリジン

AA : 2-アミノアントラセン

NF : 2-ニトロフルオレン

### ③細菌を用いた復帰突然変異性試験

(毒性資料 No. 原体-30)

試験機関：

報告書作成年：2006年[GLP 対応]

検体の純度：

試験系：細菌（サルモネラ菌〈TA102〉）

試験方法：

#### Ames試験（インキュベーション法及びプレインキュベーション法）

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) のTA102 株を用いた。Aroclor 1254 で薬物代謝系を誘導したラット肝臓から調製したS9 の非存在及び存在の条件下で、Amesらの方法により変異原性を検定した。

第1試験：インキュベーション法。S9-Mix 又は緩衝液 0.5mL と菌懸濁液 0.1mL、検体溶液 0.1mL さらにトッパアガー2mL を試験管に加えて混合し、最少グルコース寒天平板培地に広げた。この培地を 37°C で 72 時間培養後、生育阻害の有無を調べた後、復帰変異コロニー数を計測した。各濃度とも 3 プレートを用いた。

第2試験：プレインキュベーション法。S9-Mix 又は緩衝液 0.5mL と菌懸濁液 0.1mL、さらに検体溶液 0.1mL を試験管に加え、37°C で 20 分間プレインキュベーション後、トッパアガー2mL を試験管に加えて混合し、最少グルコース寒天平板培地に広げた。この培地を 37°C で 48 時間培養後、生育阻害の有無を調べた後、復帰変異コロニー数を計測した。各濃度とも 3 プレートを用いた。

各濃度ごとの復帰変異コロニー数の平均値を算出し、溶媒対照の値と比較した。各濃度ごとの平均復帰変異コロニー数が、溶媒対照の数の 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。

試験結果：結果を次表に示す。

表 1、2 に示したように、2 回の試験共に検体を用いた全用量において代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数に溶媒対照の 2 倍以上で、かつ用量相関性を伴った増加は認められなかった。また、いずれの濃度においても、生育阻害は認められなかった。

一方、陽性対照として用いた非代謝活性化条件下でのマイトマイシンC、クメンヒドロパーオキシドでは、溶媒対照と比較して明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、代謝活性化条件下での 2-アミノアントラセンは、試験に用いたすべての菌株に明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、本試験条件下において、復帰変異誘発作用は有さないものと判断された。

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。

[表 1] 復帰変異試験成績 (第 1 試験、インキュベーション法)

代謝活性化系の有無	被験物質濃度 (µg/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)		
		塩基対置換型		
		TA102		
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	209	216	
		243	(223)	
	16	213	240	
		202	(218)	
	50	181	192	
		234	(202)	
	158	213	253	
		264	(243)	
	500	218	233	
		220	(224)	
	1581 †	235	191	
		180	(202)	
	5000 †	222	221	
		221	(221)	
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	296	294	
		264	(285)	
	16	308	296	
		256	(287)	
	50	247	216	
		278	(247)	
	158	272	252	
		288	(271)	
	500	229	210	
		269	(236)	
	1581 †	253	265	
		240	(253)	
	5000 †	274	259	
		252	(262)	
陽性対照	S9Mix を必要としないもの	名称	MMC	
		用量 (µg/プレート)	5	
	S9Mix を必要とするもの	コロニー数/プレート	620	637
			560	(606)
	S9Mix を必要とするもの	名称	AA	
		用量 (µg/プレート)	2	
	コロニー数/プレート	587	614	
		663	(831)	

† : 沈殿析出 (数値) : 3枚の平均値

MMC : マイトマイシンC AA : 2-アミノアントラセン

[表 2] 復帰変異試験成績 (第 2 試験、プレインキュベーション法)

代謝活性化系の有無	被験物質濃度 (µg/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)		
		塩基対置換型		
		TA102		
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	265	261	
		292	(273)	
	16	245	235	
		231	(237)	
	50	192	229	
		287	(236)	
	158	229	210	
		297	(245)	
	500	275	210	
		279	(255)	
	1581 †	267	287	
		286	(280)	
	5000 †	301	299	
		302	(301)	
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	297	258	
		208	(254)	
	16	283	236	
		216	(245)	
	50	206	281	
		237	(241)	
	158	209	194	
		197	(200)	
	500	322	294	
		301	(306)	
	1581	266	276	
		210	(251)	
	5000	236	261	
		259	(252)	
陽性対照	S9Mix を必要としな いもの	名称	Cumene	
		用量 (µg/プレート)	50	
	コロニー数 /プレート	544	520	
		495	(520)	
	S9Mix を必要と するもの	名称	AA	
		用量 (µg/プレート)	2	
コロニー数 /プレート		486	547	
		549	(527)	

† : 沈殿析出 (数値) : 3 枚の平均値

Cumene : クメン ヒドロパーオキシド AA : 2-アミノアントラセン

④マウスリンパ腫細胞を用いた前進突然変異性試験

(毒性資料No. 原体-31)

試験機関：

報告書作成年：1984年[GLP対応]

検体の純度：

方法：マウスリンパ腫 L5178Y 細胞を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9) の存在下及び非存在下で、Clive らの方法を用いてチミジンキナーゼ遺伝子座における前進突然変異原性を検定した。溶媒はジメチルスルホキシド (DMSO) を用い、検体濃度範囲 1~15 $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 2 回試験を行った。陽性対照として、非代謝活性化条件下ではエチルメタンサルホン酸塩 (EMS)、代謝活性化条件下では 20-メチルコランスレンを用いて同様に処理した。

用量は検体濃度 3.125~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  の範囲で実施した予備毒性試験での結果、0.5~2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  の検体濃度範囲では細胞生存率が 20% となるような細胞毒性が見られたことから決定した。

細胞濃度を  $2 \times 10^6$  となるように検体を含む培地に懸濁し、37 度で 3 時間培養した。その後、気相を 5%  $\text{CO}_2$ :95% 空気の混合ガスに置換したボトルにて 24 及び 48 時間のそれぞれの時点で  $2 \times 10^5$  に細胞数を調整し、24 及び 48 時間の時点でそれぞれ細胞数を確認するために、1 プレート当たり 200 個の細胞となるよう播種し生存率を確認した。また、48 時間培養後に、 $2 \times 10^6$  個の細胞をとり、トリフルオロチミジン (TFT) を含む選択培地に播種し、12 時間培養し変異細胞コロニーを検出した。

結果は以下の数値で示した；

懸濁液中の増殖

$$\frac{\text{処理24時間後の細胞数}}{2 \times 10^5} \times \frac{\text{処理48時間後の細胞数}}{2 \times 10^5}$$

細胞生存率

$$\frac{\text{懸濁液中の増殖 (\%対照)} \times \text{寒天プレート中での生存度 (\%対照)}}{100}$$

突然変異頻度は変異株コロニー数/ $10^6$  生存細胞と定義し、以下のように計算した。

$$\frac{600}{\text{生存コロニーの合計数}} \times \frac{\text{変異株コロニーの合計数}}{3}$$

突然変異頻度が対照区の2倍以上であり、統計学的有意差が認められる場合であって、用量依存性があり、さらに再現性が認められる場合、陽性と判断した。

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。

試験結果： 結果は以下の表に示す。

非代謝活性化

群	濃度 μg/mL	試験①					試験②				
		生存細胞数 <sup>A</sup>	相対増殖 <sup>B</sup>	細胞生存率 <sup>C</sup>	総変異株数 <sup>D</sup>	突然変異頻度 <sup>E</sup>	生存細胞数 <sup>A</sup>	相対増殖 <sup>B</sup>	細胞生存率 <sup>C</sup>	総変異株数 <sup>D</sup>	突然変異頻度 <sup>E</sup>
溶媒対照 (DMSO)	0	188	100	100	34	35	198	100	100	44	45
陽性対照 (EMS)	500	18	10	3	70	799*	125	63	43	311	500**
検体	1.0	171	91	37	34	40	-	-	-	-	-
	1.5	179	95	22	50	48	199	101	7	80	80**
	1.75	175	93	20	66	76*	-	-	-	-	-
	2.0	170	91	17	65	76*	203	103	23	87	85**
	2.75	-	-	-	-	-	183	93	17	82	90**
	3.5	-	-	-	-	-	166	84	13	91	109**

代謝活性化

群	濃度 μg/mL	試験①					試験②				
		生存細胞数 <sup>A</sup>	相対増殖 <sup>B</sup>	細胞生存率 <sup>C</sup>	総変異株数 <sup>D</sup>	突然変異頻度 <sup>E</sup>	生存細胞数 <sup>A</sup>	相対増殖 <sup>B</sup>	細胞生存率 <sup>C</sup>	総変異株数 <sup>D</sup>	突然変異頻度 <sup>E</sup>
溶媒対照 (DMSO)	0	157	100	100	33	40	190	100	100	110	38
陽性対照 (MC)	5	160	102	87	127	159**	138	73	67	283	139**
検体	2.5	-	-	-	-	-	199	105	105	107	36
	5	-	-	-	-	-	185	98	86	108	38
	7.5	152	97	74	34	44	154	81	45	116	50
	10	157	100	58	42	53	196	103	25	162	55*
	12.5	156	100	34	40	51	-	-	-	-	-
	15	181	116	12	62	65*	-	-	-	-	-

\* : p < 0.05 で有意差あり \*\* : p < 0.001 で有意差あり

A: 各プレートに200細胞播種した後の生存コロニー数 B: 対照区を100とした場合の増殖率 C: 細胞生存率(前述の数式参照)

D: 試験①及び②とも、1反復が3ペトリ皿からなり、対照区は4反復、その他は2反復の平均コロニー数

E: 突然変異頻度(前述の数式参照)

EMS : エチルメタンサルホネート、MC : 20-メチルコランズレン

非代謝活性化条件では、2回の試験とも細胞生存率が用量とともに低下し、用量に関連した突然変異頻度の増加が両試験でみられたが、これは細胞毒性が強く認められた濃度区においてであった。

代謝活性化条件は、第1回試験で7.5から15μg/mL、第2回試験で7.5から10μg/mLの濃度で細胞毒性が誘発され、それぞれ15及び10μg/mLで突然変異頻度の有意な増加を認めたが、対照区の2倍以内であり、突然変異原性は陰性と判断された。

また、代謝活性化系の有無にかかわらず、陽性対照区では突然変異頻度の増加が認められ、本試験系の感受性が確認された。

以上の結果より、ジフルフェニカン代謝系非存在下では変異原性を示すものの、代謝系存在下では変異原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。

## ⑤マウスリンパ腫細胞を用いた前進突然変異原性試験

(毒性資料No.原体-32)

試験機関：

報告書作成年：2007年

検体の純度：

目的及び原理：本試験の目的は検体について、マウスリンパ腫細胞のチミジンキナーゼ (TK)座に正突然変異を誘発する能力があるかどうかを評価することである。  
評価はTK変異株 (TK<sup>-/-</sup>)のみがチミジン類似物質 (トリフルオロチミジン、TFT) の存在下で増殖できるという性質を利用して行う。TFT の存在下では正常なTK (TK<sup>+/-</sup>) はTFTをリン酸化し、取り込んだ結果DNA合成を阻害し、細胞死をひき起こすが変異したTK (TK<sup>-/-</sup>) はチミジンを經由しない新生合成経路によってDNA合成を行うため、生存することができるという原理から、コロニーを形成する細胞をTK<sup>-/-</sup>に変異したものと判断するものである。また、増殖速度が異なる2種類の変異体がコロニーの大きさの差異として識別されるが、その出現頻度を比較することにより、変異の特徴を推定することも可能である。

試験方法：継代培養したマウスリンパ腫細胞L5178Y TK<sup>+/-</sup>を用いた。

検体の溶媒はDMSOを用い、各2反復を設定した。

細胞は検体に暴露後、検体含まない培地に移して2日間培養した。その後細胞を集め、96穴のマルチタイタープレートを用いて、生存率については1ウェルあたり2000細胞をTFTを含む培地に播種し、10日間培養しコロニーを計測した。変異原性については、8細胞/mLに細胞培養液を希釈し、1ウェルあたり1.6細胞をTFTを含む培地に播種し6日間培養しコロニーを計測した。

生存率及び増殖率について以下の数式に従った；

1つのウェル中に発生するコロニーの数はポアソン分布に従うと考えられる。コロニーを含まないウェルの割合はP(0)である。

$$P(0) = \text{コロニーを含まないウェルの数} / \text{全体のウェルの数}$$

当該培養液のコロニーを含まないウェルの割合から、コロニー発生率PEは；

$$\%PE = -\ln P(0) / 1 \text{ ウェルあたり細胞数} \times 100$$

相対生存率；

$$\text{相対生存率}\%RS = (\text{PE 試験区} / \text{PE対照区}) \times 100$$



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。

細胞の増殖率(suspension growth)は、

SG=発現時間後の細胞数/播種した細胞数

相対細胞増殖率RSGは、

$$RSG=(SG \text{ 試験区}/SG \text{ 対照区}) \times 100$$

全体的な増殖の相対値relative total growth(RTG) ;

$$\%RTG=\%RSG \times \%2 \text{ 回目のPE} / 100$$

2回目PE=発現期間終了後のコロニー形成率

変異体出現頻度は以下の式で求められる ;

$$MF=(PE \text{ 変異細胞} / PE \text{ 生存細胞}) \times 10^6$$

試験は独立して2回行った。試験前に濃度設定のために実施した細胞毒性試験(3時間暴露については非代謝活性化法及び代謝活性化法ともに1~100 µg/mLで実施、24時間暴露については非代謝活性化法のみ0.5~50 µg/mLで実施)の結果から、試験1は暴露時間を3時間とし、濃度は非代謝活性化法及び代謝活性化法の両試験共に100µg/mLまでとした。試験2では、代謝活性化法では暴露時間を3時間とし、濃度は試験1と同じく100µg/mLまでとし、非代謝活性化法では暴露時間を24時間とし濃度は20µg/mLまでとした。

試験結果:結果を表に示す。いずれの試験においても、代謝活性化系の有無にかかわらず、変異原性は認められなかった。細胞毒性は代謝活性化系の非存在下のみで認められた。一方、陽性対照の4-Nitroquinoline 1-oxide及び 3-Methylcholanthreneは、突然変異誘発頻度を著しく増加させた。

以上の結果より、本試験条件下において検体のマウスリンパ腫細胞を用いた突然変異性は陰性であり、変異原性はないと判断される。

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。

表1 マウスリンパ腫細胞を用いた突然変異原性試験結果 (第1回目の試験結果)

薬物	濃度 (mL当り)	S-9 mixの有無	相対生存率RS %	相対細胞懸濁液増殖RSG%	全体的増殖の相対値(RTG%)	変異体出現頻度10 <sup>6</sup> 細胞当り	突然変異誘発頻度(×10 <sup>-6</sup> )
陰性対照(DMSO)	1%	-	100	100	100	125	1.0
ジフルフェニカン (3時間暴露)	1 μg		99	93	82	143	1.1
	10 μg		69	82	77	134	1.1
	25 μg		23	62	55	150	1.2
	50 μg		28	63	50	150	1.2
	100 μg		t	t	t	t	t
陽性対照4-NQO	0.1 μg		36	92	66	1138	9.1
陰性対照(DMSO)	1%	+	100	100	100	171	1.0
ジフルフェニカン (3時間暴露)	1 μg		102	101	109	151	0.9
	10 μg		113	89	91	179	1.0
	25 μg		114	79	85	164	1.0
	50 μg		104	73	89	118	0.7
	100 μg		109	77	83	151	0.9
陽性対照3-MC	2 μg	66	82	102	687	4.0	

4-NQO : 4-Nitroquinoline 1-oxide、3-MC : 3-Methylcholanthrene

t: 生育不良 p: 検体析出

表2 マウスリンパ腫細胞を用いた突然変異原性試験結果 (第2回目の試験結果)

薬物	濃度 (mL当り)	S-9 mixの有無	相対生存率RS %	相対細胞懸濁液増殖RSG%	全体的増殖の相対値(RTG%)	変異体出現頻度10 <sup>6</sup> 細胞当り	突然変異誘発頻度(×10 <sup>-6</sup> )
陰性対照(DMSO)	1%	-	100	100	100	154	1.0
ジフルフェニカン (24時間暴露)	1 μg		96	99	108	172	1.1
	4 μg		94	89	95	150	1.0
	8 μg		76	87	99	135	0.9
	12 μg		86	84	84	160	1.0
	16 μg		84	81	83	180	1.2
	20 μg		71	74	70	173	1.1
陽性対照4-NQO	0.025 μg	78	100	91	559	3.6	
陰性対照(DMSO)	1%	+	100	100	100	108	1.0
ジフルフェニカン (3時間暴露)	1 μg		102	105	88	108	1.0
	10 μg		104	104	92	104	1.0
	25 μg		109	93	67	127	1.2
	50 μg		84	88	81	113	1.0
	100 μg		96	86	67	118	1.1
陽性対照3-MC	2 μg	91	99	75	584	5.4	

4-NQO : 4-Nitroquinoline 1-oxide、3-MC : 3-Methylcholanthrene

p: 検体析出

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。

## ⑥V79 細胞-HGPRT法による in vitro変異原性誘発試験

(毒性資料 No. 原体-33)

試験機関：

報告書作成年： 1990 年[GLP 対応]

検体の純度：

試験系：チャイニーズハムスター肺由来培養細胞 (V79)

試験方法：

V79 培養細胞のHGPRT座における突然変異原性を in vitro条件下で評価した。検体の濃度はS9 mix非存在下/存在下で 1.6 $\mu$ g/mLから 1000 $\mu$ g/mLの範囲の 5 濃度を設定した。その他、溶媒対照群 1 群、陽性対照群として、エチルメタンサルホネート(EMS；非代謝活性化)、7,12-ジメチルベンズアントラセン(DMBA；非代謝活性化及び代謝活性化)それぞれ 1 群を設定した。検体および陽性対照物質の調製にはジメチルスルホキシド(DMSO)を用いた。試験は 2 回おこなった。

### 試験用量設定の根拠

#### 試験の実施 コロニー形成率と突然変異試験

各濃度について 2 反復、培養液を設定した。フラスコあたり  $7.5 \times 10^5$  細胞の V79 細胞を、底面 25cm<sup>2</sup> のフラスコの培養用培地に入れた。接着後 (24 時間後) に、細胞を非代謝活性下及び代謝活性下条件で 3 時間各濃度の検体に暴露させ培養した。その後、単層細胞を HBSS で洗浄し、これを 3 枚のペトリ皿それぞれに 100 個の細胞を再播種し培養して、コロニー数を算定することにより細胞毒性を判定した。

一方、フラスコに再播種した細胞は、必要に応じて継代し 7 日間培養し突然変異試験に供した。これを突然変異株細胞分離のために 10<sup>5</sup> 個、10 $\mu$ g/mL の 6-チオグアニン(6-TG) を添加したヒポキサンチン無含有培養液のペトリ皿 (合計 3 皿) に播種した。また、3 枚のペトリ皿には各用量群のコロニー形成率を求めるために、ペトリ皿あたり 200 個の細胞を播種した。

6 日間の培養後、突然変異株分離用のペトリ皿では 6-TG 抵抗性コロニー数を、コロニー形成率測定用ペトリ皿ではコロニー数を測定した。

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。

試験結果：

#### 1. 非代謝活性化条件における突然変異原性試験

非活性化条件下で2試験を実施した。その結果、相対生存率を指標とした細胞毒性はいずれの濃度でも観察されなかった。最初の試験において1000 $\mu$ g/mL区の培養液にコンタミネーションが生じたため、24時間後に廃棄した。一方、すべての試験の統計学的解析において、処理した濃度のいずれにも突然変異の頻度に有意な増加は認められなかった。

陽性対照群のEMSは、すべての試験で明らかに変異原性を誘発した。従って、検体は本非活性化試験において非変異原性物質と判断された。

#### 2. 代謝活性化条件における突然変異原性試験

活性化条件下でも同じ濃度を採用して2試験を実施した。相対生存率を指標とした細胞毒性はいずれの濃度でも観察されなかった。すべての試験の統計学的解析において、処理した濃度のいずれにも突然変異の頻度に有意な増加は認められなかった。

従って、検体は本代謝活性化試験において非変異原性物質と判断された。

陽性対照物質のDMBAは、すべての試験で明らかに変異原性を誘発した。

以上の結果より、本検体は代謝活性化の有無にかかわらず、V79-HPRT 前進突然変異原性試験において非変異原性物質であると判断された。

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。

### 非代謝活性化

群	濃度 µg/mL	試験①				試験②			
		生存 細胞数	相対 増殖 <sup>A</sup>	総変異 株数 <sup>B</sup>	変異率 ×10 <sup>-6</sup>	生存 細胞数	相対 増殖 <sup>A</sup>	総変異 株数 <sup>B</sup>	変異率 ×10 <sup>-6</sup>
溶媒対照 (DMSO)	0	219.5	109.8	0.2	0.2	207.3	103.7	0	0
陽性対照 EMS	1000	139.9	70.0	67.2	93.8	181.9	91.0	101.1	112.7
陽性対照 DMBA	10	151.4	75.7	0	0	161.8	81.0	0	0
検体	1.6	214.4	107.2	0.2	0.2	204.1	102.1	0	0
	8	180.3	90.2	0	0	152.2	76.1	0	0
	40	136.4	68.2	0	0	206.4	103.3	3.5	3.6
	200	118.2	94.1	0.5	0.5	210.0	105.0	0	0
	1000	C	C	C	C	258.5	129.3	0	0

A:細胞数を 200 とした時の百分率

B:試験①及び②とも、1 反復が 3 ペトリ皿からなる 2 反復の平均コロニー数

EMS : エチルメタンサルホネート DMBA : 7,12-ジメチルベンズアントラセン

C: コンタミネーションにより計数不能

### 代謝活性化

群	濃度 µg/mL	試験①				試験②			
		生存 細胞数	相対 増殖 <sup>A</sup>	総変異 株数 <sup>B</sup>	変異率 ×10 <sup>-6</sup>	生存 細胞数	相対 増殖 <sup>A</sup>	総変異 株数 <sup>B</sup>	変異率 ×10 <sup>-6</sup>
溶媒対照 (DMSO)	0	170.3	85.2	1.2	1.2	224	112	0	0
陽性対照 DMBA	10	137.4	68.7	22.9	32.9	154.3	77.2	32	41.9
検体	1.6	161.5	80.8	0	0	188.5	94.3	0	0
	8	153.4	76.7	0	0	198.0	99.1	0.2	0.2
	40	137.2	68.6	0	0	183.7	91.9	0.7	0.8
	200	161.5	80.8	0	0	208.8	104.4	0	0
	1000	201.7	100.9	1.4	1.4	168.0	84.1	0.5	0.6

A:細胞数を 200 とした時の百分率

B:試験①及び②とも、1 反復が 3 ペトリ皿からなる 2 反復の平均コロニー数

DMBA : 7,12-ジメチルベンズアントラセン

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。

⑦ ヒトリンパ球を用いたin vitro 細胞遺伝学的試験

(毒性資料No. -原体34)

試験機関：

報告書作成年：1984年[GLP対応]

検体の純度：

試験方法：2人の健康な提供者から採血した全血を培養し、代謝活性系存在下及び非存在下において検体を 18.75、37.5、75 及び 150  $\mu$ g/mLの濃度で処理し、25時間培養後、分裂中期の染色体標本を作製した。

なお、投与量は本試験に先立って実施した細胞毒性試験で、溶解限界濃度である 150  $\mu$ g/mL においても毒性がみられなかったため、この濃度を最大投与量とした。

各濃度段階について 200個の分裂中期像を観察した。染色体の異常をギャップ、切断、交換、欠失、環、二動原体等に分類し計測した。

検体はジメチルスルホキシド(DMSO) に溶解した。

陽性対照として、シクロホスファミド (CPA) を代謝活性化条件で処理して調べた。

試験結果：結果を次頁の表に示す。非代謝活性条件下において 37.5  $\mu$ g/mL で処理したものは、総異常数 (ギャップを除く) が対照に比べて統計学的に有意に増加した。しかし、これより上の濃度では変化がみられず (ギャップを除く)、用量との関連性もないことから生物学的意義のある変化であるとは考えられなかった。代謝活性条件下では、総異常数に対照群と比べて統計学的に有意な増加はみられなかった。一方、陽性対照の CPA では総異常数に対照群と比して有意な増加がみられた。

以上の結果より、ジフルフェニカンにおけるヒトリンパ球を用いた in vitro 細胞遺伝学的試験での変異原性は陰性であると判断される。

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。

表

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	処理時間	標本作製時間	観察細胞数 (提供者 A/B)	S-9 Mix の有無	100個当たりの異常数										異常持つ 細胞 %		分裂 指数
						ギャップ	染色体		染色分体		同座 欠失	その 他#	総異常数		ギャップ を含む	ギャップ を含まない		
							欠失	交換	欠失	交換			ギャップ を含む	ギャップ を含まない				
対照 (DMSO)	0	3	処理後 25時間 経過後	100/100	-	9.5	0	0	0	0	0	0	9.5	0	9	0	2.9	
ジフル ルフエ ニカン	18.75			100/30	-	8.5	0	0	1.5	0	0	0	10	1.5	10	1.5	3.0	
	37.5			100/100	-	14	0.5		2	0	0.5	0.5	18	3.5*	15	3.5	3.3	
	75			94/94	-	1.6	0	0	0	0	0	1.1	2.7	1.1	2.7	1.1	3.6	
	150			100/30	-	5.8	0	0	1.5	0	0.7	0	8.0	2.2	5.8	1.5	2.9	
対照 (DMSO)	0			100/100	+	8	0	0	0	0	0.5	0	8	0.5	8	0.5	1.9	
ジフル ルフエ ニカン	18.75			100/100	+	7	0.5		0.5	0	0.5	0	8.5	1.5	7	1.5	4.1	
	37.5			100/100	+	8.5	0.5		0.5	0	1	0	10.5	2	8.5	1.5	2.3	
	75			100/40	+	5.7	0	0	0	0	0.7	0	6.4	0.7	6.4	0.7	2.1	
	150			100/13	+	5.3	0	0	1.8	0	0	0	7.1	1.8	6.2	1.8	2.2	
陽性 対照 (CPA)	50			25/25	+	108	14	2	90	18	14	0	492	138**	78	54	-	

# : 細粉化がみられた細胞は“細胞100個当たりの異常数”の計算から省いたが、異常をもつ細胞の計算には含めた。

\* :  $P < 0.025$  で有意差あり    \*\* :  $P < 0.001$  で有意差あり ( $\chi^2$ -検定法)

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。

### ⑧ラット初代培養肝細胞を用いた不定期DNA合成

(毒性資料No. 原体-35)

試験機関：

報告書作成年：1984年[GLP対応]

検体の純度：

試験方法：ラットの初代培養肝細胞に検体を 0.5 から 250  $\mu\text{g/mL}$  の濃度で処理し、不定期DNA合成 (UDS) を測定してDNA損傷の誘発性を検定した。溶媒はジメチルスルホキシド (DMSO) を用い、最終濃度は1%とした。

不定期DNA合成は、検体処理細胞を $^3\text{H}$ -チミジンを含む培地で培養し、DNAへの $^3\text{H}$ -チミジンの取り込み量をオートラジオグラフ法を用いて測定した。測定は3枚のスライドについて行い、結果はこれらの平均値で表した。

試験結果：結果を以下の表に示す。

薬物	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	粒子数/核	6個以上粒子 をもつ核 %	20個以上粒子 をもつ核 %	23時間後の細胞 生存率(%対照)
溶媒対照 (DMSO)	1 %	0.61	0.0	0.0	100.0
検体	0.5	0.68	0.0	0.0	測定せず
	1.0	1.08	2.7	0.0	95.6
	2.5	0.65	0.7	0.0	96.8
	5.0	0.65	0.0	0.0	99.5
	10	0.61	0.0	0.0	80.3
	25	0.63	0.0	0.0	44.0
	50	0.62	0.7	0.0	44.0
	100	0.83	1.3	0.0	24.0
250	—	—	—	—	
陽性対照 (2-AFF)	0.1	13.78	87.3	24.0	87.7

250  $\mu\text{g/mL}$ 区は毒性が高く、粒子の分析はできなかった。

本試験に用いた濃度範囲において、検体はラット初代培養肝細胞の核標識に有意な変化をもたらさなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-AFF では、顕著な核標識の増加が認められた。

以上の結果より、本試験条件下では本検体は不定期DNA合成を誘発しないものと判断される。



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。

⑨ラット骨髄細胞を用いた *in vivo* 染色体異常誘発性試験  
(毒性資料No. 原体-36)

試験機関：  
報告書作成年：1984年 [GLP対応]

検体純度：  
供試動物： Sprague-Dawley CD 系ラット 雌雄各45匹

試験方法： ラットに検体を 6300mg/kgの用量で腹腔内投与し、投与後6、24及び48時間後に雌雄5匹ずつを屠殺して各動物の大腿骨骨髄から染色体標本を作製した。

投与量は本試験に先立って実施した毒性予備試験において、48時間以内に約10%の動物が死亡する濃度とした。

1動物当たり50個、一群当たり雌雄合計500個の分裂中期像を観察した。染色体の異常をギャップ、切断、交換、多動原体染色体、無動原体断片、点状断片、環状染色体、細粉化に分類し計測した。検体は1%メチルセルロース溶液に懸濁した。陽性対照として、マイトマイシンCを同様に投与して調べた。

試験結果： 結果を以下の表に示す。

薬物	屠殺時間	検査細胞数	異常数* (100細胞当たり)													異常細胞数				
			染色分体					染色体					その他			ギャップ				
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	ギャップを除外	ギャップを含む	
対照 (メチルセルロース)	6	453																		
	24	500	2															2	2	
	48	468	1															3	3	
ジフルフェニカン	6	500		1														2	2	
	24	461	1								3						4	1	3	6
	48	439	1																1	1
陽性対照 (マイトマイシンC)	6	461	6	3	1					1			4	3			5	1	17	21
	24	359	27	2	5	1						17	12	1			1		32	33
	48	350	2									7	6						10	10

\* A:断片をもった染色分体切断, B:断片をもたない染色分体切断,  
C:交換, D:複合型, E:転座, F:断片をもった同位染色分体切断,  
G:断片をもたない同位染色分体切断, H:環, I:二動原体, J:点状断片,  
K:無動原体断片, L:10個以上の異常をもつ細胞, M:細粉染色体,  
N:染色分体ギャップ, O:同位染色分体ギャップ

各検査時において、検体投与群の染色体異常をもつ細胞数は、対照群に比べて統計学的に有意に増加することはなかった。一方、陽性対照のマイトマイシンCは、3時点のいずれにおいても異常染色体をもつ細胞数を有意に増加させた。

以上の結果より、本検体のラットの骨髄細胞を用いた *in vivo* における染色体異常誘発性は陰性であると判断される。

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。

#### (14) 生体機能への影響

##### ジフルフェニカンにおける薬理試験

(毒性資料 No. 原体-37)

試験機関：

報告書作成年：1989年[GLP 対応]

検体の純度：

経口投与の場合は 5%アラビアゴム溶液に、また静脈投与の場合は 0.5%カルボキシメチルセルロース生理食塩溶液に検体を懸濁した。摘出臓器試験ではジメチルスルホキシドに、また溶血試験では 10%ジメチルスルホキシドに検体を溶解して用いた。

#### I. 中枢神経系に対する作用

##### 1. 自発行動への影響

供試動物：ICR 系マウス，一群雄 10 匹，体重 27.8～32.6g，

試験方法：ジフルフェニカン 800、2000 及び 5000mg/kg を単回強制経口投与し、投与後 5、15、30 分、1、3、6 及び 24 時間後に Irwin の多次元観察法に準じた方法で行動及び徴候の観察を行った。

試験結果：対照群を含め全投与群で特異な徴候は、観察されなかった。

##### 2. 自発運動量に対する影響

供試動物：ICR 系マウス，一群雄 10 匹，体重 24.3～33.7g，

試験方法：ジフルフェニカン 800、2000 及び 5000mg/kg を単回強制経口投与後、自発運動量への影響を Irwin の回転カゴ法で検討した。運動量は投与直後から 20 分間隔で 200 分後まで回転数を測定し、対照群と比較した。

試験結果：全投与群とも対照群とほぼ同様な推移を示し、いずれの時点においても有意差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。

## II. 呼吸循環器系に対する作用

供試動物：日本白色種ウサギ、一群雄 5 匹、体重 3.53～3.60 kg,

試験方法：ジフルフェニカン 1、3 及び 10mg/kg を静注し、呼吸数、呼吸振幅、血圧心拍数及び心電図について投与後 30 分後まで観察した。

試験結果：3 mg/kg 投与群で軽度の呼吸数減少、呼吸振幅増大、心拍数増加、心電図上で 5 例中 2 例に R-R 間隔の短縮がみられた。10mg/kg 投与群では、呼吸数増加、呼吸振幅減少、血圧降下、心拍数増加がみられ、心電図上で 5 例中 2 例に R-R 間隔の短縮、1 例に Q 波、R 波の低下、S T 波の下降がみられた。

申請者注)

## III. 自律神経系に対する作用

摘出回腸への影響

供試動物：Hartley 系モルモット雄 3 匹、体重 432～468g,

試験方法：18 時間絶食させたモルモットの回腸を摘出しマグヌス法を用いて、ジフルフェニカン  $10^{-6}$ ～ $10^{-4}$  g/mL の単独作用とアセチルコリン及びヒスタミン累積投与による収縮反応への影響を  $10^{-6}$ ～ $10^{-4}$  g/mL で検討した。

試験結果：ジフルフェニカン  $10^{-6}$  g/mL の単独投与では、回腸の静止時筋緊張に影響を及ぼさなかった。 $10^{-5}$  g/mL 以上で回腸の自発運動を惹起させた。ジフルフェニカン  $10^{-6}$  g/mL では、アセチルコリン及びヒスタミンによる収縮反応に対して影響を及ぼさなかったが、 $10^{-5}$  及び  $10^{-4}$  g/mL では抑制的に作用した。

## IV. 消化管機能に対する作用

供試動物：ICR 系マウス、一群雄 10 匹、体重 22.6～27.6g,

試験方法：18 時間絶食させたマウスにジフルフェニカン 800、2000 及び 5000mg/kg を経口投与し、投与 30 分後に活性炭末懸濁液を 0.1mL/10g の割合で経口投与した。その 20 分後致死させ、開腹し、幽門より炭末先端部までの長さとお腸の長さを測定して移行率を % で求めた。活性炭末懸濁液は 10%アラビアゴム溶液を用い 10%懸濁液とした。

試験結果：全投与群とも対照群の消化管輸送能に比較して差はなかった。

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。

#### V. 血液に対する作用

供試動物：日本白色種ウサギ、雄3匹、体重3.35～3.48kg,

投与方法：ウサギから採取した血液から2.5%赤血球生食浮遊液を調製した。ジフルフェニカン  $10^{-6}$ ～ $10^{-4}$  g/mLを2mLずつ試験管にとり、同量の上記調製液と混和し、30分間保温した後、溶血の有無を観察した。陽性対照薬としてサポニンを用いた。

試験結果：対照群及び全投与群とも溶血作用を示さなかった。サポニン  $10^{-4}$  g/mL投与群では完全溶血を示した。

#### VI. 末梢神経系に対する作用

横隔膜神経筋への影響

供試動物：Wistar系ラット、雄7匹、体重248～270g,

試験方法：Bulbrig(1946)及び久我(1958)の方法に準じて横隔膜神経筋標本を作製し、矩形波刺激を横隔膜神経に連続的に与え、筋収縮をポリグラフに記録した。ジフルフェニカン  $10^{-6}$ ～ $10^{-4}$  g/mLの単独作用を各用量につき4例とd-ツボクラリン  $3 \times 10^{-6}$  g/mL及びフィゾスチグミン  $3 \times 10^{-6}$  g/mLの反応に対する影響を単独作用のみられない  $10^{-4}$  g/mLで3例検討した。

試験結果：ジフルフェニカンの単独投与ではいずれの濃度でも神経刺激による筋収縮に影響を及ぼさなかった。また、ジフルフェニカン  $10^{-4}$  g/mL投与ではd-ツボクラリン及びフィゾスチグミン反応に対して影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、ジフルフェニカンは大量に投与したときに、いくつかの薬理的な検査項目で非特異的と考えられる作用が見られたのみで特異的な薬理作用は見られなかった。

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。

生体に及ぼす影響に関する総括表

試験項目	動物種	投与経路	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 mg/kg	無作用量 mg/kg	結果の概要
中枢神経系 自発行動 (Irwin 法)	マウス	経口	800, 2000, 5000	♂:10	—	5000	影響なし
自発運動量 (回転カゴ法)	マウス	経口	800, 2000, 5000	♂:10	—	5000	影響なし
呼吸、循環器系 に及ぼす影響	ウサギ	静注	1, 3, 10	♂:5	3	1	3mg/kg 以上で心 拍数、心電図に 影響がみられ た。
自律神経系に 対する作用 (マグヌス法)	モルモット	—	$10^{-6} \sim$ $10^{-4}$ g/mL	♂:3	$10^{-5}$ g/mL	$10^{-6}$ g/mL	$10^{-5}$ g/mL 以上 で回腸の自発 運動を惹起
消化管機能に 対する作用 (炭末輸送)	マウス	経口	800, 2000, 5000	♂:10	—	5000	影響なし
血液系に対す る作用	ウサギ	—	$10^{-6} \sim$ $10^{-4}$ g/mL	♂:3	—	$10^{-4}$ g/mL	溶血作用なし
末梢神経系に 対する作用 (bulbrig, 久我 の方法)	ラット	—	$10^{-6} \sim$ $10^{-4}$ g/mL	♂:7	—	$10^{-4}$ g/mL	影響なし

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。

(1) 代謝物

の細菌を用いた復帰突然変異試験 (Ames 試験)

(毒性資料No.代謝物-1)

試験機関

(イギリス)

報告書作成年 2003 年 [GLP 対応]

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* 5 株 (TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537) を用い、フェノバルビタールと  $\beta$  ナフトフラボンで誘導した雄ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で Ames らの方法を用いてプレート法で変異原性を検索した。

検体は DMSO で溶解、調製し、処理容量は 0.1 mL/プレートとした。試験 1 では 15~5000  $\mu$ g/プレートの 6 濃度で実施した。試験 2 では試験 1 の結果から 50~5000  $\mu$ g/プレートの各々 5 濃度で実施した。各用量 3 枚のプレートを用いた。陽性対照試験および溶媒対照試験も同時に実施した。37°C で 48 時間培養後、復帰変異コロニーを計数した。

溶媒対照に比し復帰変異コロニー数の増加が、再現性をもって認められ、統計学的に有意な正の濃度反応相関がある場合に変異原性を有すると判定した。

濃度設定根拠 :

結果 : 試験 1 の結果を表 2、試験 2 の結果を表 3 に示した。

2 回の独立した復帰突然変異試験の結果、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株、いずれの処理濃度においても再現性のある復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照群では、明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上、本代謝物は代謝活性化を含む本試験条件下において復帰突然変異誘発性を有しないと考えられる。

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。

表 1 復帰突然変異試験成績 (濃度設定試験 : TA100 を用いたプレート法)

薬 剤	濃度 (µg/プレート)	復帰変異コロニー数/プレート	
		S9 Mix-	S9 Mix+
溶媒対照 (DMSO)	0	105	134
検体	0.15	105	126
	0.5	103	151
	1.5	102	129
	5	95	105
	15	C	136
	50	101	120
	150	113	142
	500	110	118
	1500	99	105
5000	88S	73S	

C : コンタミネーションのため、計測不能

S : 生育阻害

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。

表 2 復帰突然変異試験成績 (試験 1: プレート法)

薬 剤	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S9 Mix の 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	TA102	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	0.1 ml	-	94	14	386	29	13	
検 体	15		97	18	398	34	14	
	50		93	16	429	29	13	
	150		93	17	405	29	9	
	500		88	20	425	28	11	
	1500		89	18	426	26	10	
	5000		73	12	399	28	12	
陽性対照			+	688	377	1264	130	1587
ENNG	3							
ENNG	5							
MMC	0.5							
4NQO	0.2							
9-AA	80							
溶媒対照 (DMSO)	0.1 ml	+	99	17	353	48	14	
検 体	15		108	12	364	39	11	
	50		105	13	391	38	11	
	150		107	16	398	45	10	
	500		94	14	399	37	9	
	1500		104	13	366	38	12	
	5000		95	14	292	40	10	
陽性対照				1009	479	625	262	504
2-AA	1							
2-AA	2							
DAN	10							
B(a)P	5							

(表中の値は 3 枚のプレートの平均値)

ENNG: N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン, MMC: マイトマイシン C

9-AA: 9-アミノアクリジン, 4-NQO: 4-ニトロキノリン 1-オキシド

2-AA: 2-アミノアントラセン, B(a)P: ベンゾ(a)ピレン



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。

表 3 復帰突然変異試験成績 (試験 2 : プレート法)

薬 剤	濃度 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	S9 Mix の 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	TA102	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	0.1 ml	-	86	18	331	24	9
検 体	50		91	19	321	25	7
	150		83	25	302	25	10
	500		83	13	279	23	11
	1500		85	15	283	24	11
5000	76	9	245	18	5		
陽性対照		+	461	299	1038	100	2050
ENNG	3						
ENNG	5						
MMC	0.5						
4NQO	0.2						
9-AA	80						
溶媒対照 (DMSO)	0.1 ml	+	115	14	310	31	15
検 体	50		102	16	316	36	12
	150		104	12	307	39	15
	500		104	12	292	38	13
	1500		108	15	258	32	11
5000	82	12	248	37	16		
陽性対照		+	1120	395	696	439	420
2-AA	1						
2-AA	2						
DAN	10						
B(a)P	5						

(表中の値は 3 枚のプレートの平均値)

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン, MMC : マイトマイシン C

9-AA : 9-アミノアクリジン, 4-NQO : 4-ニトロキノリン 1-オキシド

2-AA : 2-アミノアントラセン, B(a)P : ベンゾ(a)ピレン

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) 代謝物 のヒト末梢血培養細胞を用いた  
*in vitro* 染色体異常試験

(毒性資料No.代謝物-2)

試験機関：

報告書作成年： 2004年 [GLP 対応]

検体の純度：

試験方法：ヒトのリンパ球を用い、染色体異常誘発性を薬物代謝酵素系（フェノバルビタールとβ-ナフトフラボンで誘導したラット S9 mix）の存在下および非存在下で検索した。検体の溶媒は DMSO とした。

実験は独立して以下の 3 回行った。

実験 1 では S9 mix の最終濃度を 1% とし、検体とともに 4 時間処理した後、新しい培地に交換し 20 時間培養後に染色体標本作製した。S9 mix 非存在下では検体に 4 時間処理した後、20 時間培養後に染色体標本作製した。

実験 2 及び 3 では S9 mix の最終濃度を 2% とし検体とともに 4 時間処理した後新しい培地に交換して 20 時間培養後に染色体標本作製した。

実験 2 の S9 mix 非存在下では検体処理開始から 24 時間検体に暴露させた後、染色体標本作製した。

実験 3 では S9 mix 非存在下群は設定しなかった。

試験濃度は検体暴露を 24 時間とした実験 2 の S9 mix の非存在下でのみ最高濃度を 710 μg/mL とし、その他の群では、S9 mix の存在の有無にかかわらず最高濃度を 10mM に相当する 2840 μg/mL とした。

溶媒対照ならびに陽性対照（MMC：マイトマイシン C (-S9) 及び CP：シクロホスファミド (+S9)）を同時に試験した。

標本作製前 2 時間にはコルヒチン処理を行った。すべて各濃度あたり 2 系列で培養した。各 3 濃度の標本を評価の対象として選抜し、1 濃度あたり 200 個の分裂中期像を観察した。そしてギャップを除く構造異常を有する細胞の出現頻度が用量相関的に増加した場合、変異原性陽性と判定した。

濃度設定根拠：

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。

結果： 実験 1、実験 2 及び実験 3 の結果をそれぞれ表 1、表 2 及び表 3 示した。

実験 1 では、2840  $\mu\text{g/mL}$  で、分裂指数の明らかな低下 (S9 mix 非存在下で 33%、存在下で 52% 溶媒対照に比べて低下) が見られた。同濃度で、ギャップを含む染色体異常を有する細胞数が背景データの範囲を上回ったものの、ギャップを除く染色体異常を有する細胞数の増加は S9 mix の有無にかかわらず、認められなかった。

実験 2 では S9 mix 非存在下では 355  $\mu\text{g/mL}$  区で、S9 mix 存在下では最高用量である 2840  $\mu\text{g/mL}$  でギャップを除く染色体異常を有する細胞数の増加がみられ、これらは、弱い染色体異常誘発性を示すものと考えられた。

実験 3 では、染色体異常を有する細胞数の増加はみられなかった。

いずれの実験でも、倍数体細胞の増加はみられなかった。

従って、本検体は弱い染色体異常誘発性を有するが、作用はきわめて弱く、3 つの独立した実験のうち 1 つで 10mM の推奨された限界濃度でのみみられたことから、生物学的な意義はないものと考えられた。従って、本検体は実質上、染色体異常誘発性は有するものとは考えられなかった。

一方、陽性対照として用いた MMC (-S9) および CP (+S9) は構造的染色体異常の明らかな増加を誘発した。

以上、本検体は代謝活性化を含む本試験条件下でのヒトのリンパ球に対して、染色体異常誘発性を有しないと考えられた。

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。

表 1 染色体異常試験結果 実験 1

薬 剂	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	処理 時間	標 本作 製時間	S9 mix の有 無	分 裂 指 数 (%)#	観 察 細 胞 数	ギ ャ ッ プ	構造異常の分類					構造異常頻度 (%)	
								染色体型		染色分体型		そ の 他	ギャップ	
								欠 失	置 換	欠 失	置 換		含 む	含 ま な い
溶媒対照	0	4	24	-	100	200	0	2	0	0	0	0	1.5a	1.5b
検体	710				117	200	1	0	0	2	0	0	1.5	1.0
	1420				112	200	2	1	0	0	0	0	1.5	0.5
	2840				67	200	7	4	0	1	0	0	5.0	2.0
陽性対照 (MMC)	0.4				59	100	18	28	21	6	0	0	50	39.0 ***
溶媒対照	0	4	24	+	100	200	3	1	0	0	0	0	2.0c	0.5d
検体	710				81	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0
	1420				85	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
	2840				48	200	6	4	1	1	0	0	5.0	2.0
陽性対照 (CP)	10				15	150	18	31	22	5	1	2	31.3	25.3 ***

MMC : マイトマイシン C, CP : シクロホスファミド

分裂指数 (%) # : 溶媒対照に対する%

Fisher 直接確率計算法 \*\*\* :  $p < 0.001$

背景データ (4 時間暴露 S9mix 非存在下) a: 0-3%, b: 0-1.5%, (4 時間暴露 S9mix 1%存在下) c: 0-3.5%, d: 0-2%

表 2 染色体異常試験結果 実験 2

薬 剂	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	処理 時間	標 本作 製時間	S9 mix の有 無	分 裂 指 数 (%)#	観 察 細 胞 数	ギ ャ ッ プ	構造異常の分類					構造異常頻度 (%)	
								染色体型		染色分体型		そ の 他	ギャップ	
								欠 失	置 換	欠 失	置 換		含 む	含 ま な い
溶媒対照	0	24	24	-	100	200	3	1	0	0	0	0	2.0a	0.5b
検体	177.5				67	200	4	1	0	0	0	0	2.5	0.5
	355				58	200	12	6	0	1	0	0	9.0	3.5*
	710				32	200	3	5	0	2	0	0	3.5	2.5
陽性対照 (MMC)	0.2				23	100	19	40	38	5	1	0	62.0	57.0 ***
溶媒対照	0	4	24	+	100	200	3	0	0	0	0	0	1.5c	0.0d
検体	710				117	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0
	1420				87	200	8	1	1	0	0	0	5.0	1.0
	2840				93	200	10	6	4	2	0	0	7.0	4.0**
陽性対照 (CP)	104				17	100	35	41	17	10	0	0	62.02	45.0 ***

MMC : マイトマイシン C, CP : シクロホスファミド

分裂指数 (%) # : 溶媒対照に対する%

Fisher 直接確率計算法 \*\* :  $p < 0.001$

背景データ (24 時間暴露 S9mix 非存在下) a: 0-3%, b: 0-1.5%, (4 時間暴露 S9mix 2%存在下) c: 0-3.5%, d: 0-1.5%

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。

表 3 染色体異常試験結果 実験 3

薬剤	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	処理時間	標本作製時間	S9 mix の有無	分裂指数 (%)#	観察細胞数	ギャップ	構造異常の分類					構造異常頻度 (%)	
								染色体型		染色分体型		その他	ギャップ	
								欠失	置換	欠失	置換		含む	含まない
溶媒対照	0	4	24	+	100	200	1	2	0	0	0	0	0.5	0.0
検体	710				108	200	3	0	0	2	0	0	2.0	0.5
	1420				125	200	1	0	0	1	0	0	1.0	0.5
	2130				77	200	1	0	0	0	1	0	1.0	0.5
	2840				84	200	4	1	1	1	0	0	3.5	1.5
陽性対照 (CP)	10				16	100	20	27	24	2	0	1	44.0	33.0 ***

CP : シクロホスファミド

分裂指数 (%) # : 溶媒対照に対する%

Fisher 直接確率計算法 \*\* :  $p < 0.001$

背景データ (4時間暴露 S9mix 2%存在下) c: 0-3.5%、d: 0-1.5%