

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

(11) 1年間反復経口投与毒性及び発がん性

1) ラットを用いた飼料混入投与による2年間反復経口投与毒性/発がん性併合試験 (資料No.11)

試験機関	ザ・ダウ・ケミカル・ カンパニー (米国)
報告書作成年	GLP対応 2002年

検体の純度:

試験動物: Fischer系ラット 発がん性: 1群 雌雄50匹, 衛星群: 1群 雌雄10匹, 開始時約7週令

投与後12ヵ月時に各群雌雄10匹を中間屠殺した

投与期間: 発がん性群: 24ヵ月間 (2000年3月2日~2002年3月4日~11日)

衛星群: 12ヵ月間 (2000年3月2日~2001年3月6日)

方法: 検体と基礎飼料を混合して, 0, 5, 50, 250 mg/kg/日の用量で24ヵ月間にわたって随時摂取させた。検体を混入した飼料は, 高濃度の検体・飼料混合物を粉末飼料で段階的に希釈し, 投与開始後13週間は毎週1回, その後は1月に1回の頻度で調製した。

投与量設定根拠;

試験項目及び結果:

一般状態及び死亡率; 一般状態及び生死を毎日2回観察した。また, 投与前, 投与後は1週間に1回, 全動物を対象にして以下の項目に関する詳細な臨床症状の観察を行った; 行動の異常, 動物の取扱操作及び環境に対する反応, 眼瞼閉鎖, 流涙, 瞳孔の大きさ, 流涎, 筋緊張, 伸筋衝動反応, 歩行異常, 眼の異常, 排泄状態, 胃腸の異常, 四肢の異常, 筋肉の異常運動 (震顫, 痙攣等), 塊・腫脹, 姿勢・体位, 繁殖器官の異常, 呼吸, 皮膚, 被毛, 粘膜, 過度の汚れ, その他の異常。
会陰部被毛の汚れを除き, 一般状態に異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

以下に詳細な臨床症状観察で認められた会陰部の尿による被毛の汚れの発生頻度について示す。

会陰部の尿による被毛の汚れの頻度が 50 mg/kg 体重/日以上以上の投与群雌雄で用量相関性に増加したが、時間と共に頻度が低下し特に雄で顕著に減少した。試験 729 日目において、本所見を示す動物は 0, 5, 50 及び 250 mg/kg 体重/日投与群で雄が 2/39, 0/39, 4/28 及び 6/30 例, 雌が 1/37, 0/37, 6/42 及び 23/42 例であった。本所見は検体投与の影響と考えられた。

100 mg/kg 体重/日投与群の雄で眼の混濁及び眼周囲部の被毛の汚れの頻度の増加が投与開始後 24 ヶ月時にみられたが流涙の頻度は最初の 12 ヶ月時と同様であった。本所見は偶発的で用量相関性を欠くところから検体投与とは無関係の変化と判断した。

また、試験 24 ヶ月時ではその他、種々の所見が様々な頻度で観察されたが、これらは、老年性疾病に関連したもので、ラットの寿命を考えると当然予想される変化であり、投与の影響ではないと判断された。表在性腫瘍は投与開始後 12 ヶ月間で実施した詳細な臨床観察では各群各性で 0-2 匹程度の動物にしか認められなかった。その後の検査、特に投与終了前の数ヶ月からは触診される腫瘍が増加した。試験 554 日から試験終了までの期間では、対照群を含む全ての用量群の雄では 10%以上の動物に触診腫瘍が、雌では 659 日では 10%以上の雌に腫瘍が観察された。触診腫瘍に投与量との相関はなかった。触診腫瘍は皮膚、皮下あるいはその附属腺（乳腺、陰核腺及び包皮腺、外耳道腺）に通常認められた。また、陰核腺、包皮腺あるいは後肢蹠部の腫脹あるいは腫瘍の大部分は炎症であり腫瘍ではなかった。

体重変化；全動物について、投与開始後 13 週間は週 1 回、その後の投与期間は月に 1 回体重を測定した。

以下に各群の体重平均値の変化を示す。

250mg/kg 体重/日投与群の雄の体重値が対照群に比べ統計学的に有意に減少し、投与 8 日目から試験期間を通じて統計学的に有意に低下した。投与開始後 12 ヶ月時において 250mg/kg 体重/日投与群の雄の体重値は対照群に比べ 3.3% 低く、終了時までそのまま低値で推移し、終了時には対照群と比べ 6.2%の低値を示した。250 mg/kg 体重/日投与群の雌の体重値も同様に、投与開始後 12 ヶ月間ではほとんどの測定時期に統計学的有意差を示した。投与開始後 12 ヶ月時の同群の雌は対照群に比べ 3.3%の低体重であった。試験第 24 ヶ月時においても統計学的有意差は示さなかったが体重は低く推移し試験終了時では対照群に比べ 3.3%の低値であった。これらの体重減少は検体投与の影響と判断した。50 mg/kg 体重/日投与群雌の体重も投与開始後 99 日間に対照群と比べて低値で統計学的有意差が散見されたが、その後は試験期間を通じて統計学的差は認められず、試験終了時の値は対照群と比べ 0.9%低値にとどまったため、50 mg/kg 体重/日投与群雌の体重の変化は投与の影響ではないと考えられた。その他の群には統計学的有意差は認められなかった。

また、250 mg/kg 体重/日投与群の雌雄で体重増加抑制が認められた。試験 12 ヶ月時で雌雄の体重増加量は雄と雌で、対照群と比べそれぞれ 4.3%及び 5.2%低く、試験終了時では対照群と比べ雄で 10.1%、雌で 6.2%低値となった。その他の投与群の体重増加量は試験期間を通じて対照群と同様であった
摂餌量及び食餌効率；全動物について、投与開始後 13 週間は週 1 回、その後の投与期間には月に 1 回摂餌量を測定した。食餌効率も算出した。

雄の全投与群において摂餌量は対照群と比べて増加し、統計学的有意差が散見された。投与開始後 12 ヶ月時においては、雄のいずれの投与群にも摂餌量に対照群との有意差はなかったが、試験終了時には雄の 250 mg/kg 体重/日投与群のみで統計学的有意差が認められた。雌も雄と同様、摂餌量は対照群と比べ

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

て増加し、統計学的有意差が散見されたが、雌の全投与群の値は対照群とほぼ同等であり、試験終了時はいずれの投与群でも有意差は認められなかった。以上、投与群において摂餌量の増加傾向みられたが、検体投与との関連性はないと考えられた。

食餌効率、これら体重値の低下及び摂餌量の増加が反映され、250 mg/kg 体重/日投与群の雌雄で統計学的に有意に減少した。その他の群に検体投与の影響は認められなかった。

検体摂取量；食餌中の検体の実測濃度、体重及び摂餌量から算出した平均検体摂取量は以下のとおりであった。

設定用量 (mg/kg体重/日)		5	50	250
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	5.1	51.0	255.3
	雌	5.1	50.9	254.0

血液学的検査；投与開始後 3, 6, 12, 18, 24 ヶ月時に、各群雄雌各 10 匹を対象にして、眼窩静脈より採血し、以下の項目を測定を行った。

ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、赤血球数、総白血球数、血小板数、白血球百分率*、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH) 及び平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)、プロトロンビン時間。

*：全生存動物について測定した。

対照群と比較して統計学的有意差のみられた項目を下表に示す。

50mg/kg 体重/日以上投与群の雄では赤血球関連項目（赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値）が軽度に低下したが、投与期間の後半には統計学的有意差は認められず、投与期間とともに変化の程度が悪化することはなかった。24 ヶ月時に LGL 白血病 (Fischer ラット白血病または単核細胞性白血病) が発生したことによって同群雄の赤血球数の平均値は対照群の平

均値と比べ、約 9%減少したが統計学的有意差はみられなかった。12 及び 24 ヶ月時の病理組織学的検査において、赤血球関連項目の低下による骨髄の変化は見られなかった。概して、赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値は全てほぼ同程度に減少したが、ヘモグロビン濃度は赤血球数より顕著に減少する傾向を示し、ヘマトクリット値はその中間であった。従って赤血球恒数 (MCV, MCH 及び MCHC) は対照群と同程度であり、250 mg/kg 体重/日投与群雄では MCH 及び MCV が軽度の低下傾向を示したのみであった。50 mg/kg 体重/日投与群では赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値がほぼ同程度に低下したところから赤血球恒数に異常は認められなかった。5 mg/kg 体重/日投与群の雄では赤血球関連項目が試験期間中 1~2.5%低下したが、統計学的有意差が認められたのは 3 ヶ月時のヘモグロビン濃度減少のみであった。この変化 (2%) は小さかったことおよび、その後の検査では認められなかったこと、から臨床的あるいは生物学的意義はないと判断した。

また、250 mg/kg 体重/日投与群雄において試験期間中、血小板数が増加した。本変化は 3 から 18 ヶ月時に観察されたが、24 ヶ月時の検査では統計学的有意差を示さなかった。また、病理組織学的検査では骨髄に関連する変化を認めなかったこと、および血液凝固異常を伴わない軽度の血小板数増加は臨床的意義を持たない変化であることから、これらの血小板における変化に毒性学的意義はないと判断される。3 および 6 ヶ月時に 50 及び 5 mg/kg 体重/日投与群雄において血小板数が統計学的に有意に増加した。12 ヶ月時および試験終了時においては統計学的有意差は認められず、変動幅も小さかった。従ってこれら 2 群における一時的な血小板数増加は検体投与の影響ではないと考えられた。

24 ヶ月後の雄の剖検時に特に LUC (大型不染性細胞) と分類された細胞で白血球数及び白血球百分比が著しく変動した。これらの白血球検査値は個々の動物における Fischer ラットに特有の LGL 白血病とその悪性度を反映するものであった。

一方、雌の血液学的検査項目には、プロトロンビン時間の変化以外に、どの測定時点においても統計学的有意差は認められなかった。250 mg/kg 体重/日投与群の雌では全ての測定時期にプロトロンビン時間が軽度に短縮し、12、18 及び 24 ヶ月時には統計学的有意差をともなった。しかし対照群との差は軽微で 1 秒以内であり、出血性変化を伴わなかったところから生物学的意義はないと判断した。その他には検体投与の影響は認められなかった。

血液生化学的検査；血液検査で使用した血液から得られた血清を用い、以下の項目を測定を行った。

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 (ALT) , アスパルギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) , アルブミン, コレステロール, クレアチニン, 電解質 (Na, K, P, Cl, Ca) , 血糖, 総ビリルビン, 総蛋白, 尿素窒素。

対照群と比べ統計学的有意差のみられた項目を下表に示す。

250 mg/kg 体重/日投与群の雌雄でコレステロールが、全ての測定時に対照群に比べ統計学的に有意に増加した。この増加は投与開始後 18 ヶ月間にわたって雌より雄が顕著であり、平均値では対照群と比べ、雄では 23-44%、雌で 8-22%の増加であった。本項目の平均値に関しては 24 ヶ月時に変化が大きかったが、LGL 白血病による肝臓への影響のため個々の測定値の変動が大きく、統計学的有意差は認められなかった。50 mg/kg 体重/日投与群の雄におけるコレステロール値は、投与開始後 12 ヶ月間では対照群と同様であったが 18 及び 24 ヶ月時に増加し、24 ヶ月時には統計学的有意差も認められたため、投与の影響と判断した。5 mg/kg 体重/日投与群では 18 ヶ月時に雄でのみ統計学的に有意な増加がみられたが、それは肝臓における自然発生病変が 2 例に認められたために平均値が上昇したもので検体投与の影響ではないと考えられた。5 及び 50 mg/kg 体重/日投与群雌ではコレステロールにどの検査時期にも有意差は認めなかった。

また、250 mg/kg 体重/日投与群の雄でアルブミン及び総蛋白が投与開始後 12 ヶ月時まで有意に増加した。この総蛋白の増加は主にアルブミンの増加によるもので、他の血清蛋白（グロブリン）に変化はなかった。18 及び 24 ヶ月

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

時には血清アルブミンは逆に減少したが、総蛋白値に変化はなかった。この変化は 250 mg/kg 体重/日投与群の雄に認められた腎障害による尿中への蛋白漏失によるものと推察された。50 mg/kg 体重/日投与群の雄においても、軽度ではあるが、6 ヶ月時にアルブミン増加及び 24 ヶ月時にアルブミン低下が統計学的有意差を伴って認められた。その他、5 mg/kg 体重/日投与群の雄及び雌では総蛋白及びアルブミンに異常は認められなかった。

250mg/kg 体重/日投与群の雄で血清尿素窒素が、18 及び 24 ヶ月時に統計学的に有意に増加した。本所見の臨床的意義は明らかでないものの、病理組織学的検査で腎への影響が認められたところから、この変化は投与による影響であることを示唆していた。5 mg/kg 体重/日投与群の雄ではいずれの検査時期でも尿素窒素に異常はなかった。

250mg/kg 体重/日投与群の雄で ALT 及び AST が投与開始後 12 ヶ月間、有意に低下し、雌でも程度は低い値は減少した。これらの酵素に関しては、増加した場合には肝臓疾病の指標とされている。しかし本試験では減少していたため毒性学的意義はないと考えられた。その他の血液生化学的検査及び電解質測定に統計学的有意差が散見されたが、それらは片方の性に時折みられたのみか、投与量との相関性を欠く変化であったため、検体投与に関連した変化ではないと判断された。

尿検査； 投与開始後 6, 12, 18, 24 ヶ月時に、以下の項目の測定を行った。色調、外觀、比重、尿量、pH、ビリルビン、尿糖、蛋白、ケトン体、潜血、ウロビリノーゲン及び尿沈渣（各群につき尿試料をプールしたもの）。

対照群と比べ統計学的有意差のみられた項目を下表に示す。

250 mg/kg 体重/日投与群の雄で投与 12 ヶ月時以降、尿量の増加と尿比重の減少がみられ検体投与の影響と判断した。雄の Fischer344 ラットでは慢性進行性糸球体腎症が加齢とともに進行するが、尿検査への影響は同群における病変の重症化と比例していた。50 mg/kg 体重/日投与群の雄では、より軽度であっ

たが尿量及び尿比重への影響が観察され、18 ヶ月時（尿比重のみ）及び24 ヶ月時にはその程度が重度になり、統計学的有意差も観察されたため、投与の影響と判断した。（1994年2月から1997年2月までに当該試験機関で剖検した8種の発癌性試験〔7試験が混餌投与、1試験が吸入投与〕の雄の対照群における平均尿比重は1.038〔群平均の幅1.032-1.045〕であることからみて、50 mg/kg 体重/日投与群雄の尿比重は背景データと同程度ではあった。）5 mg/kg 体重/日投与群の雄では24 ヶ月時に尿比重が統計学的に有意に低下したが、その値（1.046）は背景データと同様（群平均の幅1.032-1.045）であった。また、尿量に投与の影響と考えられる明確な異常はなく、対照群の尿比重（1.053）は背景データより高かったことから統計学的有意差がみられたもので、本所見は検体投与の影響ではなく偶発所見と判断した。また、250 mg/kg 体重/日投与群の雌で尿量が12、18及び24 ヶ月時に増加した。5及び50mg/kg 体重/日投与群の雌では尿量が6、12及び18 ヶ月時に対照群に比べ高かったが24 ヶ月時には同等であり、正常の変動範囲内と考えられた。尿比重は50 mg/kg 体重/日投与群の雌で異常を認めなかった。その他に検体投与に関連した変化は認められなかった。

眼科学的検査； 投与前及び剖検時に、全動物について検査した。

12 ヶ月及び24 ヶ月後に雌雄で、眼球出血、眼底灰白化、角膜混濁、眼周囲汚濁、眼球ろうあるいは眼球消失が認められた。眼周囲汚濁は非特異的であり投与に関連しない臨床症状と判断した。眼底灰色化、角膜混濁あるいは眼球不透明は偶発的であり加齢に伴う変化と考えた。眼球消失及び眼球ろうは眼窩静脈叢採血による二次的变化であった。これらの変化は発生頻度が低く、また、投与用量との相関を欠くところから投与の影響ではないと判断した。

臓器重量； 投与12及び24 ヶ月時に全動物を対象として最終体重及び以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。脳、肝、腎、心、副腎、精巣、精巣上体、子宮、卵巣及び脾臓。

対照群と比べ統計学的に有意差のみられた項目を下表に示す。

<12 ヶ月時>250 mg/kg 体重/日投与群の雌雄における最終体重が対照群に比べ軽度減少し、統計学的有意差はなかったが投与の影響と判断した。また、250 mg/kg 体重/日投与群の雌雄において肝重量及び対体重比が増加し、同群の雄では腎重量及び対体重比が対照群と比べ統計学的有意差を伴って増加した。250 mg/kg 体重/日投与群の雄において脾重量及び対体重比は統計学的に有意に増加したが、以前実施した13週間試験では同群で脾重量に影響がなかったところから、本変化と投与との関係は不明である。また、250mg/kg 体重/日投与群の雌において卵巣重量及び対体重比が有意に増加したが、病理組織学的検査では異常はなく、また、以前実施した試験にも卵巣への影響はなかったところから検体投与による悪影響ではないと判断した。また、250 mg/kg 体重/日投与群の雄の精巣における対体重比及び同群雌の心の対体重比が統計学的に有意に増加したが、統計学的に有意差はみられなかったものの同群の最終体重が軽度に低下し、重量値が正常範囲にあったところから考えて、わずかな対体重比の変化が統計学的有意差をもたらしたのであり、毒性学的意義はないと判断した。

<24 ヶ月時>250 mg/kg 体重/日投与群の雌雄における最終体重は対照群に比し軽度に低下し、雄では統計学的有意差を伴っていたため投与の影響と判断した。また、250 mg/kg 体重/日投与群雄の腎重量は12 ヶ月時と同様に、対照群に比べ約12%増加し、検体投与の影響と判断した。5 及び 50 mg/kg 体重/日投与群雄において、腎の対体重比が増加し統計学的有意差を示したが、これら2群の増加の程度(8~9%)は同程度であり、用量依存性はみられなかった。また、本試験における対照

群雄の最終体重 (382.1g) は背景データの体重よりやや大きく、また、腎臓相対重量 (0.785) は背景データの下限域よりやや低かった (1994 年 2 月から 1997 年 2 月までに剖検された 8 試験の対照群雄における一晩絶食後の最終体重は 333.1 から 373.5g であったが、腎重量は 2.776 から 3.173g で対体重比は 0.786 から 0.917)。加えて、5 及び 50 mg/kg 体重/日投与群雄の腎重量 (それぞれ 3.169g および 3.136g) および対体重比 (それぞれ 0.851 および 0.857) は背景データの範囲内であることより、検体投与の影響ではないと判断された。

前述のように、5 及び 50 mg/kg 体重/日投与群雄における最終体重が投与の影響ではなかったが軽度に低下したため腎の対脳重量比を計算したところ、統計学的有意差は 250 mg/kg 体重/日投与群にのみ示され、このことから 5 及び 50 mg/kg 体重/日投与群で認められた腎の対体重比の有意差は、投与の影響というよりむしろ正常の範囲内の変動であると考えられた。

全投与群の雄で肝重量及び対体重比が増加し統計学的有意差を示した。これは、LGL 白血病の肝への影響に相関していたと考えられる。後述するように LGL 白血病は試験動物種によるもので検体投与の影響ではないと考えられるため、この肝重量の増加も検体投与の影響ではないと判断される。また、250 mg/kg 体重/日投与群の雌では肝対体重比が 12 ヶ月時と同様に約 11%増加したが統計学的有意差はみられなかった。また、当該投与群の雌 2 例に LGL 白血病があり、それが肝重量増加の原因になったと考えられる (肝重量 13.263 及び 15.885g)。最終解剖時における雌の LGL 白血病の発生頻度は 250 mg/kg 体重/日投与群よりも対照群で実質的に高く LGL 白血病を持つ対照群の肝で最も重いものは 10.586g であった。

また、脾重量及び対体重比が全投与群の雄で増加したが用量相関性はなかった。脾重量の変動は全投与群で標準偏差が平均値を超えるほど顕著であった。脾臓は LGL 白血病の原発臓器であること、対照群と投与群間での頻度が異なり、また脾重量に影響を及ぼすほど病状の程度が異なっていたことを考えると、脾重量増加は検体投与の標的臓器というより、LGL 白血病の二次的変化と判断された。

また、50 及び 250 mg/kg 体重/日投与群の雄における副腎の対体重比が統計学的有意に増加した。しかしこれらは軽度に低下した体重によるものであり、投与の影響ではないと判断された。(なお、当該投与群では 1 例に悪性褐色細胞腫が認められ、動物の脾重量は増加した。群の平均値および標準偏差が大きいのはこれが原因である。) 50 mg/kg 体重/日投与群の雌において副腎重量が軽度ではあったが、統計学的に有意に減少した。しかし用量相関性を欠くこと、病理組織学的変化と一致しないこと、並びに 12 ヶ月時の検査及び以前実施した試験で副腎重量に変化がなかった

たことから、この軽微な差は偶発的と考えた。

250 mg/kg 体重/日投与群の雄において脳及び心の対体重比が統計学的に有意に増加した。しかし、これらの臓器の絶対重量は変化しなかったところから、対体重比の増加はこれらの臓器に対する直接的影響というよりむしろ体重減少によるものと判断した。

その他は検体投与に関連した変化は認められなかった。

肉眼的病理検査；投与 12 及び 24 ヶ月時に全動物を対象として剖検を行った。

12 ヶ月時には、対照群では雄 2 例、雌 1 例に、50 mg/kg 体重/日投与群の雄 4 例に、250 mg/kg 体重/日投与群では雄 9 例、雌 7 例に会陰部の尿による被毛の汚れが認められた。本所見は生存時観察における会陰部の尿による被毛の汚れと一致するものであり検体と投与の影響と考えられた。24 ヶ月時にみられた所見のうち対照群より増加したものを以下に示す。

統計学的有意差が認められた肉眼的病理所見は、250 mg/kg 体重/日投与群の雄の腎の表面粗糙、雌の会陰部の汚れ及び膀胱結石であった。これらの変化は雄で慢性進行性糸球体腎症、膀胱結晶及び粘膜過形成が重症になったこと、によるものと考えられる。これらの所見は有意な直線性認められなかったため、対検定は実施しなかった。報告書にも記載してあるように肝と脾の肉眼的病理所見は LGL 白血病に関連したものであった。

以下の所見が途中剖検動物で高頻度に認められた：

腎臓：	結石，砂粒状，腎盂	250 mg/kg 体重/日投与群雄
肝臓：	表面粗造	全投与群雄
脾臓：	肥大，恐らくリンパ系腫瘍	全投与群雄

以下の所見が途中剖検動物と計画殺動物で同程度の頻度に認められた：

皮膚/皮下織：	外陰部被毛汚濁	250 mg/kg 体重/日投与群雌
---------	---------	--------------------

以下の所見が計画殺動物で高頻度に認められた

膀胱：	結石	250 mg/kg 体重/日投与群雌
腎臓：	表面粗造，両側	250 mg/kg 体重/日投与群雄

24 ヶ月時の最終解剖では多くの“腫瘍-結節”が認められたが、これは本系統のラットには通常観察されるものであった。大部分の臓器における発生頻度はまれであったが、下垂体、皮膚及び皮下織（乳腺を含む）、脾臓、精巣及び子宮で、対照群を含め各用量群で“腫瘍-結節”が高頻度に認められた。病理組織学的検査では、これらの“腫瘍-結節”は全て Fischer 344 ラットで通常見られる腫瘍であることが判明した。雄では全投与群に、脾臓の肥大（恐らくリンパ系腫瘍）の頻度が増加した。しかし 50 mg/kg 体重/日投与群で最も高い頻度で、その頻度に用量相関性は認められなかった。

その他に検体投与の影響は認められなかった。

病理組織学的検査；対照群及び 500 mg/kg 体重/日投与群の全動物及び死亡動物・瀕死動物を対象として以下の組織について病理標本を作成し検鏡を行った。

副腎[#]、大動脈、聴覚皮脂腺、骨（関節などを含む）、骨髄、脳（大脳、脳幹、小脳）、盲腸、頸管、凝固腺、結腸、頭蓋神経、十二指腸、精巣上部、食道、眼、心、回腸、空腸、腎^{*}、涙腺・ハーダー腺、喉頭、肝^{*}、肺^{*}、乳腺、縦隔洞リンパ節、縦隔洞組織、腸間膜リンパ節、腸間膜組織、鼻腔、口腔、卵巣、卵管、睪、上皮小体、末梢神経、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺、精のう、骨格筋、皮膚・皮下組織、脊髄（頸部、胸廓、腰部）、脾[#]、胃、精巣、胸腺、甲状腺、舌、気管、膀胱^{*}、子宮、肉眼的病変部^{*}。

*：全群について検査した。

#：主群の雄全動物について検査した。

認められた主要な非腫瘍性病変を表 1 に示す。

<12 ヶ月時>検体投与に関連した唯一の変化は 250 mg/kg 体重/日投与群の雄における慢性進行性糸球体腎症の病変重篤度の増加であり、病変程度が軽度とされた糸球体腎症が増加した。対照群ならびに 5 及び 50 mg/kg 体重/日投与群における本病変の程度は軽微（組織占有率 25%以下）に過ぎず、発生頻度も対照群を含め 7 例から 9 例であった。一方、250 mg/kg 体重/日投与群の雄全てに糸球体腎症が認められそのうち 6 例の程度は軽度（組織占有率 26-50%）であった。

250 mg/kg 体重/日投与群の雄で脾の髓外造血（軽微）の発生頻度が増加した。本病変は対照群で 3 例、250 mg/kg 体重/日投与群に 7 例に認められた。この変化は高投与群における赤血球関連項目の軽微な減少に相関するものであると考えられた。その他に検体投与の影響は認められなかった。

<24 ヶ月時>検体投与群の雄において慢性進行性糸球体腎症の病変の重篤度が増加した。対照群雄の慢性進行性糸球体腎症の程度は多くが軽微であったが、対照群を含め全群で、一部の動物には重度の慢性進行性糸球体腎症も認められた。雌では慢性進行性糸球体腎症（軽微）は全投与群で 35-39 例にしか見られず、検体投与との関係は認められなかった。慢性進行性糸球体腎症は雄ラットにおける一般的加齢性病変で、雌に比べ雄で、より高頻度に認められる（Montgomery and Seely, 1990; Short and Goldstein, 1992）。ラットでは系統により慢性進行性糸球体腎症の発生は異なるが、Fischer344 ラットはその発生が多い系統である。慢性進行性糸球体腎症は雄では数ヶ月齢から認められるが、通常無処置ラットにおいては

18 ヶ月齢以降にならないと臨床症状を表さない (Gray, 1986)。本試験において 250 mg/kg 体重/日投与群の雄で中等度及び重度の慢性進行性糸球体腎症の頻度が増加したが (重度病変は統計学的に有意でなかった)、本病変は 12 ヶ月時で最初に観察されその後持続的に程度が重篤化したと考えられた。本所見は、24 ヶ月時に認められた他の腎障害の指標、血清尿素窒素、血清アルブミン増加、尿量増加、尿比重減少及び腎重量増加と関連したため検体投与の影響と判断した。また、250 mg/kg 体重/日投与群に比べて程度は低かったものの、50 mg/kg 体重/日投与群の雄においても慢性進行性糸球体腎症の重篤化が認められた。50 mg/kg 体重/日投与群の雄では中等度の慢性進行性糸球体腎症の頻度が増加した。また、腎症に随伴して生じたと考えられる他の変化 (尿量、尿比重及び血清アルブミンの変化、並びに血清尿素窒素の軽微な増加) が 250 mg/kg 体重/日投与群雄に比べてより軽度で認められたため、結論的には 50 mg/kg 体重/日投与群の雄の腎に投与の影響があったと判断した。一方、5 mg/kg 体重/日投与群雄において慢性進行性糸球体腎症の程度は増加したが、本試験の対照群雄における慢性進行性糸球体腎症は背景データに比べて軽度で、軽微病変は本試験が 66%、背景データが 0-36%であり、中等度病変は本試験が 4%しかなかったのに対し背景データでは 16-56%であり、同群の中等度慢性進行性糸球体腎症の頻度 (22%) は実際には背景データの最低値付近にあると判断した。以上の理由により 5 mg/kg 体重/日投与群雄における慢性進行性糸球体腎症の程度の増加は投与の影響ではないと考えられた。

以下に慢性進行性糸球体腎症の背景データ (%) および本試験における発生頻度 (%) を示す。

その他、腎で認められた病変について以下に記述する。250mg/kg 体重/日投与群の雄 14 例の腎盂に結晶が認められ、検体投与の影響と考えられた。結晶はヘマトキシリン・エオジン染色で淡桃色に染まり、外周がはっきりせず、かすかに同心円状構造を呈していた。また、腎盂上皮過形成が 250 mg/kg 体重/日投与群雄に多数認められ、同群では病変程度が重篤化し (軽度あるいは中等度)、投与の影響と考えられた。過形成はしばしば結晶と同時にみられたが過形成は結晶に比べてより高頻度に認められた。一方、ごく軽微な多中心性過形成が対照群を含む全投与群の雄で 8 から 10 例に認められ、偶発的所見と判断した。250 mg/kg 体重/日投与群の雌では、軽度の腎盂上皮過形成が 250 mg/kg 体重/日投与群の雌で 6 例、対照群雌に 2 例認められ、統計学的有意差は認められなかった。この変化は雄と同様の影響を示

唆していたがその程度はより軽度であると考えられた。結晶は雌の腎盂には認められなかった。

膀胱における検体投与の影響は雌雄の 250 mg/kg 体重/日投与群でのみ認められ、病理組織学的には同一の変化であったが、雌では雄に比べ 50%以上高い発生頻度で観察された。本病変の特徴は、検体あるいは代謝物と考えられる結晶が 250 mg/kg 体重/日投与群の多くの動物で膀胱腔内に認められ、これらの結晶は雄の腎盂で観察されたものに類似し、雌ラットの膀胱でより高頻度にみられた。また、250 mg/kg 体重/日投与群の雄 2 例及び雌 6 例で剖検時に認められた結石は結晶から生じたと考えられ、成分を分析した結果、親化合物が平均で約 68%、尿中代謝物が約 0.5%で、通常の結石で観察されるシュウ酸化合物(約 2%)が同定された。その他は同定できなかったが通常の尿成分や細胞の残屑であろうと考えられた。また、膀胱の結晶は粘膜過形成を伴っていた。粘膜過形成は多中心性にみられ、250 mg/kg 体重/日投与群の一部の雌では、びまん性過形成がみられた。しかしそれ以外では膀胱の一部に局限していた。また、剖検時に膀胱結石がみられた動物には、より重度の粘膜過形成が観察された。すなわち、雄 1 例には炎症を伴う重度のびまん性過形成が、雌 6 例では中等度のびまん性過形成が観察され、他の雄動物では膀胱に急性移行上皮壊死があり、動物の死亡原因の一つと考えられた。加えて 250 mg/kg 体重/日投与群の雄 2 例には他の発症例とは異なる形態の膀胱粘膜過形成がみられ、その内 1 例には中等度多中心性の結節性過形成があり、別の例には多中心性、中等度過形成を伴う炎症が認められた。これらの所見も検体投与の影響と判断した。

その他、統計学的有意差がみられた変化は雄の副腎髓質過形成の発生頻度の増加であった。過形成は片側性、限局性あるいは多中心性、ないし両側性、多中心性であり、それぞれ病変の程度で分類した。本所見は発生頻度及び程度に関しても投与群の雄で増加し、対照群の 8 例に対し 5、50 及び 250 mg/kg 体重/日投与群でそれぞれ 18、15 及び 22 例に認められ、250 mg/kg 体重/日投与群では統計学的有意差を示した。しかし、本試験の対照群の雄における副腎髓質過形成の頻度は背景データの雄に比べて低く、一方、投与群における頻度は背景データの範囲内であった。さらに投与群の雄において副腎髓質腫瘍は増加しなかったため検体投与の影響ではないと判断された。

以下に本試験における副腎髓質過形成発生頻度と背景データを示す。

その他の非腫瘍性所見に検体投与の影響は認められなかった。

認められた腫瘍性病変を表 2 に示す。

<12 ヶ月時>剖検時に認められた腫瘍は肺腺腫 1 例、上皮上体腺腫 1 例、数例の下垂体腺腫、数例の精巣間細胞腫及び糸球体内膜ポリープ 3 例であった。剖検時に腫瘍として観察されたもの以外に、顕微鏡観察で認められたものが下垂体及び精巣にみられた。腫瘍は全て良性で、同系統の動物において一般的腫瘍であった。

<24 ヶ月時>検体投与の影響と考えられる腫瘍発生頻度の増加はなかった。統計学的有意差を示した唯一の腫瘍は雄ラットにおける LGL 白血病であった。用量相関性はなく全ての投与群で同程度（対照群雄の約 2.5 倍）に発生した。当該白血病は Fischer 344 ラットに特異的なもので、恐らくナチュラルキラー細胞に由来するものである。LGL 白血病は単核細胞性白血病あるいは Fischer ラット白血病とも呼ばれ、Fischer 344 雄ラットの死亡原因として最も一般的な腫瘍であり多くの報告がある（Haseman et al., 1998 年; Stefanski et al., 1990 年; Stromberg and Vogtsberger, 1983 年 a; Stromberg et al., 1983 年 b; Stromberg et al., 1983 年 c; Ward and Reynolds, 1983 年）。本腫瘍の初期には脾及び肝に病変が現れ、その後種々の臓器、例えばリンパ節、骨髄、末梢血及び他の臓器に波及して肺及び脳をしばしば浸襲することもある。本試験では LGL 白血病が対照群雄では 12 例、各投与群では 29 あるいは 30 例に観察された。本病変の発生の早期化及びその発生頻度に用量相関性はなく、また、動物の死因と用量との関係も認められなかった。対照群の雄で試験途中で解剖された 12 例中 3 例に LGL 白血病が認められ、そのうち 2 例の死因は LGL 白血病と診断された。5mg/kg 体重/日投与群では途中解剖された 11 例中 8 例に LGL 白血病が認められそのうち 7 例の死因とされた。50mg/kg 体重/日投与群では途中解剖例 22 例中 11 例に LGL 白血病が見られ、そのうち 11 例の死因とされた。250mg/kg 体重/日投与群では途中解剖 22 例中 12 例に LGL 白血病が見られそのうち 7 例の死因とされた。当研究所における 1994 年 2 月から 1997 年 2 月までに実施したた発癌性試験 8 試験（混餌投与 7 試験、吸入投与 1 試験）における LGL 白血病的背景データでは、対照群動物 50 匹に対し 8-20 例の発生が見られ平均では 1 群 50 匹に 14 例であった。雌では平均で 50 匹/群に 9 例みられ、その発生幅は 5 から 14 例であった。これらの試験は全て 24 ヶ月間試験で動物供給業者、飼料及び飼育管理は本試験と同様であった。また、Fischer344 ラットで LGL 白血病的発生頻度が一般的に高いことは文献的にも報告されている。National toxicology Program の 1998 年の報告では 2 年間試験における雄の平均発生率は 50.5%（発生幅 32-74%）で、雌が平均 28.1%（発生幅 14-52%）、2003 年の報告では雄 46~59%、雌 24~36%である（Haseman et al., 2003 年; Haseman et al. 1998 年）。

以上より本試験の雄ラットにおける LGL 白血病的増加は以下の理由から投与の影響とは判断しなかった：①50 倍の投与量の開きがありながら用量相関性が見られないこと、②雌において発生頻度の増加がないこと、③雌雄のいずれにもその他の腫瘍発生頻度に異常がないこと。また、CD-1 マウスにおける混餌投与でも投与に関連した腫瘍発生は認められず（Yano and Day, 2002 年）、復帰突然変異試験（資料 18）、in vitro 染色体異常試験（資料 19）、CHO/HGPRT を用いた変異原性

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

試験及びマウス骨髄小核試験（資料 20）における *in vitro* 及び *in vivo* 変異原試験結果はすべて陰性であった。さらに本検体と同系統の化学物質（triazolopyrimidines）の多くの化合物で発癌試験が実施されているが、Fischer ラットにおいて白血病の増加はない（Hanley and Billington, 2000 年）。また本試験の発癌性試験群に供試された全動物を研究所外の病理学者が再評価し、全 LGL 白血病は外部の Pathology Working Group が診断及び腫瘍の病期をレビューした（参考資料 12-1）。Pathology Working Group によると、投与群において認められた統計学的有意な増加は、その発生頻度及び病期に用量相関性がないことから検体投与の影響とは関連せず、毒性学的に人へのリスクはないと結論された。

以上の結果より、本剤のラットに対する 2 年間慢性毒性・発がん性併合試験における影響として、50 mg/kg 体重/日以上以上の投与群の雄では、赤血球関連項目の軽度減少、尿量増加、尿比重低下及び尿素窒素のごく軽度の増加、慢性進行性糸球体腎症の重篤化が認められた。250 mg/kg 体重/日投与群雌雄で体重減少及び外陰部被毛汚濁の増加、コレステロールの軽度増加、雄では血清アルブミン及び総蛋白の軽度増加、雌雄とも膀胱粘膜上皮の軽微な過形成及び内腔における結晶沈着、膀胱粘膜の重度過形成あるいは重度炎症が少数例に認められた。また、250 mg/kg 体重/日投与群の雌雄で、頻度は低かったが肉眼的に観察できる結石が膀胱及び腎盂に認められた。同群ではその他検体投与の影響として、腎盂上皮の過形成、腎盂内結晶、慢性進行性糸球体腎症の増加、血清尿素窒素の軽度増加、尿量増加及び尿比重の減少、腎重量の増加、肝重量の増加が認められた。以上により、雄における無毒性量は 5.1 mg/kg 体重/日、雌における無影響量は 50.9 mg/kg 体重/日と判断した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

表 1：主な非腫瘍性所見

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

(11) 1年間反復経口投与毒性及び発がん性

2) マウスを用いた飼料混入投与による発がん性試験

(資料No.12)

試験機関	ザ・ダウ・ケミカル・ カンパニー (米国) GLP対応
報告書作成年	2002年

検体の純度：

試験動物： CD-1系マウス 1群 雌雄50匹，開始時約6週令

投与期間： 18ヵ月間 (2000年6月8日から2001年12月13日)

方法： 検体と基礎飼料を混合して，0，10，100，375(雄)または750(雌) mg/kg体重/日の用量で18ヵ月間にわたって随時摂取させた。検体を混入した飼料は，高濃度の検体・飼料混合物を粉末飼料で段階的に希釈し，投与開始後13週間は毎週1回，その後は月に1回の頻度で調製した。

投与量設定根拠；

試験項目及び結果：

一般状態及び死亡率；一般状態 (皮膚，被毛，呼吸，震顫及び痙攣を含む神経系機能，行動) 及び生死を毎日2回観察した。また，投与前，投与後は1週間に1回，全動物を対象にして以下の項目に関する詳細な臨床症状の観察を行った；行動の異常，動物の取扱操作及び環境に対する反応，眼瞼閉鎖，流涙，瞳孔の大きさ，流涎，筋緊張，伸筋衝動反応，歩行異常，眼の異常，排泄状態，胃腸の異常，四肢の異常，筋肉の異常運動 (震顫，痙攣等) 塊・腫脹，姿勢・体位，繁殖器官の異常，呼吸，皮膚，被毛，粘膜，過度の汚れ，その他の異常。

種々の症状が散見されたが，用量相関性もなく老齢マウスに自然発生的にみられる所見であり，検体投与関連性はないものと考えられた。

体重変化；全動物について，試験開始前と投与開始後90日間は週に1回，その後の投与期間は月1回体重を測定した。

投与開始後50日間，雌の投与群の平均体重値が対照群よりわずかに低値であったが，その後これらの群の値は対照群と同等であり，体重増加値に変化は認められなかったことより，検体投与の影響ではないと考えられた。雄においてはいずれの投与群においても有意差は認められなかった。

摂餌量及び食餌効率；全動物について，試験開始前と投与開始後90日間は週に1回，その後の投与期間は月1回測定し，食餌効率も計算した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

雄では投与開始後 30 日間で統計学的に有意に摂餌量が増加したのみであった。また、雌では 100 mg/kg 体重/日以上以上の投与群で投与開始後 85 日より統計学有意差が散見されたが、この期間、当該投与群で体重に変化は認められなかったため、これらの変化は検体投与の影響ではないと考えられた。

検体摂取量；食餌中の検体の実測濃度，体重及び摂餌量から算出した平均検体摂取量は以下のとおりであった。

設定用量 (mg/kg体重/日)		10	100	375	750
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	10.0	99.7	376	-
	雌	10.1	100	-	751

血液学的検査；投与後 12 ヶ月時，及び 18 ヶ月時に各群雄雌全生存動物を対象にして，臍部静脈（12 ヶ月時）あるいは眼窩静脈（18 ヶ月時）より採血して塗抹標本作製し，18 ヶ月時には総白血球数及び白血球百分率を計測した。なお，瀕死動物については眼窩静脈あるいは尾静脈より採血し塗抹標本作製した。

検体投与に関連した変化は認められなかった。

眼科学的検査；試験前及び剖検時に，全動物について検査した。

いずれの動物にも検体投与に関連した異常は認められなかった。

臓器重量；投与終了時に全動物を対象として最終体重及び以下の臓器重量を測定し，対体重比も算出した。脳，肝，腎，心，副腎，精巣，精巣上体，子宮，卵巣及び脾臓。

対照群と比べ統計学的に有意差のみられた項目を下表に示す。

100 mg/kg 体重/日以上以上の投与群の雄では肝の対体重比の有意な増加が，375 mg/kg 体重/日投与群の雄では肝重量の統計学的に有意な増加が認められた。さらに，統計学的有意差はなかったものの，100 mg/kg 体重/日投与群の雄の肝重量は約 12%増加し，これらの肝重量の増加は検体投与に起因しているものと考えられた。その他には雌雄とも投与に関連した変化はなかった。

肉眼的病理検査；試験終了時，全動物を対象として剖検を行った。

検体投与の影響は認められなかった。

病理組織学的検査；対照群及び雄では 375 mg/kg体重/日投与群，雌では 375 mg/kg体重/日投与群の全動物及び途中死亡または瀕死動物を対象として以下の組織について病理標本を作成し検鏡を行った。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

副腎，大動脈，聴覚皮脂腺，骨（関節を含む），骨髓，脳（大脳，脳幹，小脳），盲腸，頸管，凝固腺，結腸，頭蓋神経，十二指腸，精巢上体，食道，眼，胆のう，心，回腸，空腸，腎*，涙腺・ハーダー腺，喉頭，肝*，肺*，乳腺，縦隔洞リンパ節，縦隔洞組織，腸間膜リンパ節，腸間膜組織，鼻腔，口腔，卵巣，卵管，腓，上皮小体，末梢神経，下垂体，前立腺，直腸，唾液腺，精のう，骨格筋，皮膚・皮下組織，脊髓（頸部，胸廓，腰部），脾，胃，精巢，胸腺，甲状腺，舌，気管，膀胱，子宮，膣，肉眼的病変部*。

*：全群について検査した。

以下に主要病変について示す。

100 mg/kg 体重/日以上投与群の雄及び 750 mg/kg 体重/日投与群の雌で，小葉中心性および小葉中間帯の肝細胞の肥大（大型化）が認められた。これらの肝細胞では雌雄ともに細胞質の好酸性染色性の亢進や，雄においては細胞質内空胞の存在からなる染色性変化も認められた。本所見の程度は，雄で，軽度，中等度または重度で，雌では軽微または軽度であった。肝細胞肥大に加え，375mg/kg 体重/群の雄 4 例に軽微から軽度の肝臓ペリオーシス（肝紫斑症）がみられた。この病変の特徴は類洞空隙の拡張であり，退行性の肝臓影響を反映していると解釈された。また，上記の肝の非腫瘍性変化を以下のように考察した；これらの所見の特徴は，1) 100 mg/kg 体重/日以上投与群の雄における肝重量および対体重比の増加，2) 100 mg/kg 体重/日以上投与群の雄および 750 mg/kg 体重/日投与群の雌における小葉中心性/中間帯部位の肝細胞の大型化および染色性変化であった。肝細胞の染色性変化は，雌雄動物における細胞質の好酸性染色性の亢進と雄における細胞質中空胞の存在が原因であった。肝重量の増加および肝の組織学的影響は，13 週間混餌毒性試

験で観察された影響と同様であった（資料 9）。肝重量の増加と細胞質の好酸性染色性亢進を伴う肝細胞肥大は、検体を代謝するために誘導された肝細胞酵素と滑面小胞体の代償性変化の結果であると解釈された。雄でみられた細胞質空胞化は、13 週間混餌毒性試験で実施した電子顕微鏡検査により、リソソーム脂肪の増加に関連していると考えられ、検体投与に関連する影響と考えられた。肝臓のペリオーシスもまた、375 mg/kg 体重/日投与軍の雄 4 例に認められた。

10 mg/kg 体重/日投与群の雄において尿細管の鉍質沈着（多巢性分布）の発生頻度が対照群と比較して増加し、統計学的有意差もみられた。同様の差が高用量群の 750 mg/kg 体重/日投与群で観察されなかったことから、この差は投与に関連していないと解釈され、自然発生的変化であることが示唆された。その他の病理組織学的所見の発生頻度には統計学的有意差は認められず、検体投与に起因するものではないと判断された。

また、フィッシャーの直接確率法（ $\alpha=0.05$, 片側）を用いて腎臓及び卵巣の病変発生頻度に対して統計学的解析を実施した結果、以下の成績を得た。

- 腎尿細管拡張の発生頻度は雌雄 10 及び 100 mg/kg 体重/日投与群で増加したが用量相関性は認められず、投与関連性の変化ではないと解釈された。
- 腎尿細管の多発性鉍質沈着の発生頻度は 10 及び 100 mg/kg 体重/日投与群の雄で増加したが用量相関性は認められず投与に関連した変化ではないと解釈された。雌の 750 mg/kg 体重/日投与群で認められた腎尿細管の鉍質沈着は、投与との関連性が疑われたが、検体と構造が類似した化合物の毒性によれば（Hanley, Billington, 2001），マウスでは主に肝臓に投与関連性の病変が認められ、腎臓は標的臓器ではないと考えられた。また、雄での発生頻度に用量相関性がなかったことから投与との関連性はないものと判断した。
- 卵巣のう胞（両側）の発生頻度が雌の 750 mg/kg 体重/日投与群で対照群と比べ増加したが、本所見は CD-1 マウスによく観察されることから、以下に示す当該試験実施機関の背景データと比較した。

その結果、本試験の対照群における卵巣のう胞（両側）の発生頻度は、背景データより低いことが判明した。加えて、本試験の対照群の片側、両側の卵巣のう胞の発生頻度を合算（合計）した場合においても背景データよ

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

りも低値を示した。一方、750 mg/kg 体重/日投与群の雌の卵巣のう胞の発生頻度は背景データとほぼ同等であった。従って、750 mg/kg 体重/日投与群の卵巣のう胞の発生頻度の増加は、本試験の対照群の発生頻度がたまたま低かったことに起因する偶発所見と解釈され検体投与の影響ではないと考えられた。

以上、いずれの組織においても検体投与に起因する腫瘍の発生頻度の増加はみられなかった（表参照）。さらに、死亡または瀕死状態の原因は、本系統の本齢のマウスで通常観察されるような所見と一致した。すべての腫瘍性病変を表に示す。

以上の結果から、本剤の 18 ヶ月間飼料混入投与による発がん性試験における影響として、100 mg/kg 体重/日以上投与群の雄では肝重量の増加、肝細胞肥大が、375 mg/kg 体重/日投与群の雄では肝細胞ペリオーシスが、750 mg/kg 体重/日投与群の雌で肝細胞肥大が認められた。以上により、本剤の無毒性量は、雄では 10.0 mg/kg 体重/日、雌では 100.0 mg/kg 体重/日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ダウ・ケミカル日本株式会社にある。

表：腫瘍性病変

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

(11) 1年間反復経口投与毒性及び発がん性

3) イヌを用いた飼料混入投与による1年間反復経口投与毒性試験 (資料No.13)

試験機関	ザ・ダウ・ケミカル・ カンパニー (米国) GLP対応
報告書作成年	2002年

検体の純度：

試験動物： ビーグル犬 1群 雌雄4匹，開始時約6ヵ月令

投与期間： 13週間 (2000年7月31日～2001年8月1日)

方法： 検体を0, 0.015, 0.045, 0.15%の濃度で基礎飼料と混合して，1年間にわたって随時摂取させた。検体を混入した飼料は，高濃度の検体・飼料混合物を粉末飼料で段階的に希釈し，少なくとも2週間に1回調製した。

投与量設定根拠：

試験項目及び結果：

一般状態及び死亡率；一般状態及び生死を毎日2回観察した。また，投与前，投与後は1週間に1回，全動物を対象にして以下の項目に関する詳細な臨床症状の観察を行った；行動の異常，動物の取扱操作及び環境刺激に対する反応，眼瞼閉鎖，流涎，筋緊張，伸筋衝動反応，歩行異常，姿勢・体位，瞳孔の大きさ，流涙，皮膚，被毛，粘膜，呼吸，眼の異常，排泄状態，胃腸の異常，傷，四肢の異常，筋肉の異常運動（震顫，痙攣等），塊・腫脹，姿勢・体位，繁殖器官の異常，呼吸，皮膚，被毛，粘膜，過度の汚れ，その他の異常。試験期間中，死亡は認められなかった。一般状態に検体投与の影響は認められなかった。

体重変化；全動物について，試験開始前と投与開始後最初の18週間は週に1回，その後は4週間に1回体重を測定した。

0.15%群，0.45%群及び0.015%群の雄では平均体重増加量が対照群に比べそれぞれ34%，8.5%及び16.5%の体重増加量の減少がみられた。これらの変化は対照群の雄の体重増加量が通常よりも高いことによるものと解釈された。本試験の対照群の雄における試験期間全体の平均体重増加量 (3.817 kg) は当該試験機関において，最近実施された1年間のイヌの試験における対照群雄の平均体重増加量 (2.899 kg) に比し大幅に高い値であった。一方，雌では投与群全群で対照群よりも体重増加量が大幅に増加し，高用量群雌の平均は対照群に比し60%増加した。以上より上記の変化は生物学的変動によるもので検体投与に関連した変化ではないと考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

摂餌量及び食餌効率；すべての動物について摂餌量を試験開始前と投与開始後最初の 18 週間は週に 1 回、その後は 4 週間に 1 回測定した。食餌効率も計算した。

検体投与の影響は認められなかった。

検体摂取量；食餌中の検体の実測濃度，体重及び摂餌量から算出した平均検体摂取量は以下のとおりであった。

投与量 (%)		0.015	0.045	0.15
検体摂取量	雄	5.3	14.7	46.2
(mg/kg/日)	雌	4.4	14.0	44.8

血液学的検査；投与後 13 週時，各群雄雌全動物を対象にして，一晚絶食後，頸静脈より採血し，以下の項目を測定を行った。

ヘマトクリット値，ヘモグロビン濃度，赤血球数，総白血球数，血小板数，白血球百分率，平均赤血球容積 (MCV)，平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH) 及び平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)，プロトロンビン時間。

投与期間全体にわたって雌雄のデータを合わせて統計処理を行った結果，統計学的有意差がみられた項目を以下に示す。

0.15 %群の平均プロトロンビン時間は対照群に比べ統計学的に有意に短縮した。この変化は同群の投与開始前のプロトロンビン時間がもともと低値であったこと，ならびに試験終了時の 0.15 %群の雌のプロトロンビン時間が対照群と同様 (100%) であったことから投与に関連したものではないと解釈された。さらに，対照群と 0.15 %群のプロトロンビン値の差はいずれの検査時期においても 0.6 秒以内であり，この差は生物学的に有意ではないと考えられた。

その他，検体投与に関連した変化は認められなかった。

血液生化学的検査；血液検査で使用した血液から得られた血清を用い，以下の項目を測定を行った。

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 (ALT)，アスパルギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)，γ-グルタミルトランスペプチターゼ，アルブミン，コレステロール，クレアチニン，電解質 (Na, K, PO₄, Cl, Ca)，血糖，総ビリルビン，総蛋白，尿素窒素。

以下に対照群と比べ統計学的に有意差のみられた項目を下表に示す。

0.15 %群の雌雄に ALP 活性平均値の有意な上昇がみられた。しかし同群で肝重量の変化が見られず、かつ肝の病理組織学的検査において異常が認められなかったことから、この変化は毒性的に有意ではないと考えられた。0.15 %群の雌雄において平均 Cl 濃度の統計学的に有意な上昇がみられた。これは、同群雄の投与開始前の Cl 濃度が高かったことならびに 0.15 %群両性の Cl 濃度はイヌにおける文献値の範囲内、110~124 mmol/l (Duncan *et al.*, 1994) であったことから、投与に関連したものではないと解釈された。

その他の項目においても検体投与に関連した変化は認められなかった。

尿検査；試験開始前、試験期間のほぼ中間期及び試験終了直前に、以下の項目の測定を行った。色調、外観、比重、pH、ビリルビン、尿糖、蛋白、ケトン体、潜血、ウロビリノーゲン及び尿沈渣。

検体投与に関連した変化は認められなかった。

眼科学的検査；試験前及び試験終了前に、全動物について検査した。

いずれの動物にも異常は認められなかった。

臓器重量；試験終了時に全動物を対象として最終体重及び以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。脳、肝（胆のうを含む）、腎、心、精巣、精巣上体、子宮、卵巣、副腎、脾臓及び甲状腺（上皮小体を含む）。

雌雄とも、試験期間を通していずれの用量においても最終体重ならびに臓器重量に検体投与に関連した変化は認められなかった。0.045%ならびに 0.15% 群の雌において平均子宮重量が対照群に比し低下した。この低下は、試験終了時に対照群の動物 2 例が子宮内膜の過形成を伴う偽妊娠をおこしたことによるものであるため、投与に関連したものではないと解釈された。

肉眼的病理検査；試験終了時、全動物を対象として剖検を行った。

検体投与の影響は認められなかった。

病理組織学的検査；全動物を対象として以下の組織について病理標本を作成し検鏡を行った。

副腎、大動脈、骨（関節などを含む）、骨髄、脳（大脳、脳幹、小脳）、盲腸、頸管、頭蓋神経一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、結腸、十二指腸、精巣上体、食道、眼、胆のう、心、回腸、空腸、腎、喉頭、肝、肺、乳腺、縦隔洞リンパ節、縦隔洞組織、

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

腸間膜リンパ節，腸間膜組織，鼻腔，口腔，卵巢，卵管，睪，上皮小体，末梢神経，下垂体，前立腺，直腸，唾液腺，骨格筋，皮膚・皮下組織，脊髄（頸部，胸廓，腰部），脾，胃，精巣，胸腺，甲状腺，舌，扁桃，気管，膀胱，子宮，膣，肉眼的病変部。
以下に主要病変について示す。

0.15% 投与群の雄 1 例で軽微な腎盂上皮の多発性過形成が観察された。本所見は 13 週間反復投与試験（資料 10）で認められたものと同様であった。この他に観察されたすべての組織学的所見は自然発生性の変化であり，検体投与関連性はないものと判断された。

以上の結果から，本剤の 1 年間飼料混入投与による反復投与毒性試験における影響として，0.15%群雄で腎盂上皮の過形成が，また同群雌雄でアルカリホスファターゼの上昇が認められた。アルカリホスファターゼの上昇は他に関連した肝臓の所見が認められないことより，毒性学的には有意ではないと考えられた。以上より，本剤の無影響量は雌雄とも 0.045%，無毒性量は雄で 0.045%（14.7 mg/kg 体重/日），雌では 0.15 %（44.8 mg/kg 体重/日）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ダウ・ケミカル日本株式会社にある。

(12) 繁殖毒性及び催奇形性

1) 繁殖毒性

ラットを用いた繁殖試験

(資料No.14)

試験機関

ザ・ダウ・ケミカル・
カンパニー (米国)
GLP対応

報告書作成年

2000年

検体の純度 :

試験動物 : CD系ラット, 1群雌雄各30匹, 投与開始時約6週齢

投与期間 : P1世代; 投与開始からF1児離乳時までの18週間,
P2世代; 離乳時からF2児離乳時までの18週間。

(2000年7月19日~2000年11月19日)

方法 : 検体を0, 30, 100 および300 mg/kg 体重/日の用量になるよう, 毎週調製した。検体はそのまま基礎飼料と混合した。

投与量設定の根拠;

交配・調整・選抜及び観察・検査項目: 概要を表Aにまとめた。

一般状態及び死亡率; 全動物の一般状態及び生死を毎日観察した。また, 全動物について臨床観察を実施した。雄動物については, 投与前とその後は週1回行った。雌動物については, 投与前, 交配前および交配中は週1回行った。交尾した雌については妊娠0, 7, 14, 21日に, 出産後の雌については引き続き哺育0, 1, 4, 7, 14 および21日に観察した。交尾しなかった, または出産しなかった雌は週1回観察した。動物を手に持ち, 皮膚, 被毛, 粘膜, 呼吸, 神経系機能(振戦と痙攣を含む), 腫脹, 腫瘤および行動について詳細に観察した。

交配及び妊娠の確認; 交配は雌の膣洗浄液により発情を確かめ, 精子の有無により交尾を確認した。妊娠の確認は精子または膣栓の認められた日を妊娠0日とした。

繁殖性に関する指標; 交配, 妊娠及び哺育時期の観察に基づき, 次の指標を算出した。

交尾率 = (交尾を認めた動物数 / 交配に用いた動物数) × 100

受胎率 = (出産を認めた雌動物数 / 交配した雌動物数) × 100

受精率 = (出産させた雄動物数 / 交配した雄動物数) × 100

妊娠率 = (出産を認めた雌数 / 交配した雌数) × 100

雄の妊性率 = (妊娠させた雄数 / 交配した雄数) × 100

出産率 = (生存児を出産した雌数 / 出産を認めた雌数) × 100

出産時生存率 = 出産時の生存児の百分率

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

着床後胚死亡率 = (着床痕数 - 生存児数) / (着床痕数) × 100

哺育 1 または 4 日の生存率 = (哺育 1 または 4 日の生存児数 / 生存産児数) × 100

哺育 7, 14 または 21 日の生存率 = (哺育 7, 14 または 21 日の生存児数 / 哺育 4 日の調整後の生存産児数) × 100

性周期；交配前 3 週間ならびに精子または膣栓が観察されるまでの交配期間中に親動物の雌全例について膣洗浄液を毎日採取して性周期を調べた。

精子検査；親動物の雄全例について剖検時に精子の運動性について検査した。その他親動物の対照群および 300 mg/kg 体重/日投与群の雄全動物について、計数、精子形態の検査を行った。

身体発達の指標；交配用に選抜された全 F1 離乳児について出生 28 日から毎日膣開口の観察を、出生後 35 日から包皮分離の観察を行った。また、F2 児動物では哺育数調整の前、出産後 1 日に肛門・生殖突起間距離（絶対距離および体重の 3 乗根の相対距離）を測定した。

病理組織学的検査；親動物の対照群と 300 mg/kg 体重/日投与群の全動物について以下に示す組織について実施した（臓器重量が増加したため甲状腺についても実施した）。妊性低下の兆候がみられた 30 mg/kg 体重/日投与群と 100 mg/kg 体重/日投与群の動物の生殖器についても組織学的検査を行った。副腎、頸管、凝固腺、精巣上体、肉眼的異常部位、腎、肝、肺、卵巣、卵管、下垂体、前立腺、精のう、精巣、甲状腺、子宮、膣。

臓器重量；全親動物を対象として以下の臓器重量を測定した。対体重比も計算した：卵巣、子宮（卵管及び頸部を含む）、精巣、精巣上体（両側の合計重量及び左側のみ尾部の重量）、精囊・凝固腺（及び精囊液）、前立腺、脳、下垂体、肝、腎、副腎、脾、甲状腺。児動物に関しては脳、脾、胸腺の重量を測定した。対体重比も計算した。

表 A

世代	期間 (週間)	作業手順	試験項目
P ₁	育成(10)		体重及び摂餌量を週1回測定した。
	交配(3)	雌雄1対1で交配。交尾は膣栓または精子で確認し、その日を妊娠0日とした。	交配前3週間性周期を観察した。 交配状況の観察。性周期を観察した。
	妊娠(3)		体重を雄は週に1回、雌は妊娠0, 7, 14, 20日に測定した。
	出産 (F ₁)		出産状況の観察。 生産児数、分娩日、性別、外表異常の観察。 同腹生存児体重測定。
	哺育(3)	出産後4日に同腹児数を雄4匹雌4匹(不可能な場合は雌雄合計8匹)に調整した。	哺育1, 7, 14及び21日に母動物の体重を測定した。同じく、摂餌量を哺育1, 4, 7, 11, 14, 17, 19, 21日に測定した。 哺育0, 1, 4, 7, 14及び21日に生存児数を数えて体重を測定した。死亡児数も数えた。また、哺育児にみられた外表異常、一般状態の変化を毎日記録した。 死亡児と哺育4日に屠殺した児動物について肉眼的病理検査を行った。
	離乳	F _{1a} 各群から雌雄30匹ずつを継代用に選抜した。 F _{1a} 離乳後、約1週間でP ₁ を再交配し、F _{1a} と同様の手順でF _{1b} を得た。	継代用以外の児動物を屠殺し、その内各群雌雄10匹の肉眼的病理検査を行った。 交配用に選抜された動物について生後28日から毎日膣開口の観察を、生後35日から包皮分離の観察を行った。 P ₁ 親動物について肉眼的病理検査と臓器重量の測定及び生殖器官及び標的臓器の病理組織学的検査を行った。精子検査もおこなった。 (F ₀ 世代に準ずる。)
F ₁	育成(12)		(F ₀ 世代に準ずる。)
	交配(3)	(F ₀ 世代に準ずる。)	(F ₀ 世代に準ずる。)
	妊娠(3)		(F ₀ 世代に準ずる。)
	出産		

世代	期間 (週間)	作業手順	試験項目
F ₁	哺育(3) 離乳	(F ₀ 世代に準ずる。)	全親動物と児動物については肉眼的病理検査を行った。親動物については臓器重量の測定と生殖器官、標的臓器の病理組織学的検査も行った。
F ₂			

結果：

一般状態； <P1 世代> 300 mg/kg 体重/日投与群の雄 1 例および 30 mg/kg 体重/日投与群の雌 1 例が計画剖検前に死亡した。さらに、30 mg/kg 体重/日投与群の雌 1 例が瀕死状態であったため計画剖検前に屠殺した。雄の死亡例は試験 29 日に死亡する前には明らかな臨床症状は示さなかった。剖検時、内臓のうっ血、腎臓の退色、陰囊の赤色化が観察されたが、死因は特定できなかった。30 mg/kg 体重/日投与群では、P1 世代の雌 2 例（動物番号 4544, 4546）が死亡あるいは切迫殺されたが、前者では、剖検により副腎の腫大、体脂肪の減少、癒着を伴う腹水、消化管内溶血、腎盂拡張、腸間膜リンパ節腫大、胃潰瘍、膀胱拡張及び子宮膿腫を示す化膿滲出物を伴う子宮の炎症が観察され、本動物の死因と考えられたが、中・高用量群の雌動物には同様の所見を示す死亡動物がみられていないことから、本例の死亡は検体投与に起因したものではないと考えられた。後者の切迫殺動物では、不正咬合切歯および鼻周囲部の赤色汚れなど鼻口部の創傷が認められたことから、死因は不慮の外傷によるものと考えられた。なお、P2 世代では雌の 30 mg/kg 体重/日投与群に難産が 1 例認められたが、同群の P1 世代および中・高用量群の両世代では難産を含む分娩障害はみられなかったことから、偶発所見と解釈した。

<P2 世代> 計画剖検前に死亡した 100 mg/kg 体重/日投与群の雄 1 例および雌 1 例に偶発的な所見が観察された。雄では試験 115 日に死亡する前には明らかな臨床所見は観察されず剖検時、軽度の腎盂拡張と肺のうっ血がみられ、死因は特定できなかった。雌の 1 例は試験 137 日に剖検に供されたが、死亡の 10 日前に異常呼吸音および不正咬合が特徴である鼻部および鼻口部の物理的創傷がみられた。1 週間後、本動物には、削瘦とともに口周囲部赤色汚れ、被毛粗剛、皮膚蒼白、努力性呼吸、排糞の減少が認められた。また剖検時、本動物に体脂肪の減少、上顎および下顎の骨折、胃のびらん-潰瘍、副腎暗調化、消化管内ガス貯留が観察され、すべて不慮の外傷によるものであると判断された。その他の親動物はすべて計画剖検時まで生存し検体投与の影響は認められなかった。30mg/kg 体重/日投与群の母動物 1 例に難産がみられ、出産児のほとんどが死亡または出産後間もなく死亡した。しかし、試験を通して他には難産の兆候は観察されなかった。

体重変化； 体重値については、P1 世代では、交配前の期間、いずれの投与群においても検体投与の影響は認められなかった。妊娠 21 日には、300 mg/kg 体重/日投与群の雌で体重平均値が対照群と比べて有意に減少した。P2 世代では、300 mg/kg 体重/日投与群の雄で交配前期間の開始から終了まで体重値が対照群と比べて有意に低かったが、交配前の残りの期間中に回復する傾向がみられた。妊娠 21 日には、300 mg/kg 体重/日投与群の雌で体重平均値が対照群と比べて有意に減少した。

体重増加量については、P1 世代では妊娠中は統計学的有意差は認められなかったが、哺育 1~4 日には対照群と比べ有意に減少した。その後は対照群と同程度あるいは対照群と比べ有意に増加した。P2 世代では妊娠中および哺育 1~4 日の期間、対照群と比べ有意に減少した。その後は P1 世代と同様に対照群と同程度あるいは対照群と比べ有意に増加した。<F1, F2 世代>児動物では、300 mg/kg 体重/日投与群の両世代で、出産後 1 日の哺育児体重は、対照よりわずかに低く、その後の哺育期間においても雌雄とも対照群と比べ有意に減少した。この哺育児の体重減少は、哺育期間の初期~中間期が最も大きいという傾向がみられたが、その後哺育 21 日までに一部回復兆候がみられた。この変化は、母動物の摂餌量および体重が哺育開始から 2 週間は有意に減少したが、その後哺育期間の最終週に回復したという事実と一致する。この相関性と、その他の生殖または発育に対する影響がないことから、哺育児の体重変化は、母動物の摂餌量と体重の影響の二次的なものであることが示唆された。

摂餌量；検体投与の影響は認められなかった。

検体摂取量；試験期間を通し、検体の平均濃度は、30, 100 および 300 mg/kg 体重/日の用量について、雄では目標濃度の 97.6, 97.8 および 96.0%であり、雌では目標濃度の 98.7, 98.0 および 97.5%であった。

繁殖性に関する指標；交配、受胎、妊性または妊娠の指標、着床後胚死亡、交尾までの時間、妊娠期間、出産児の性比に、投与に関連した影響は両世代ともいずれの用量においても認められなかった。P1 世代で哺育児の生存率の統計学的に有意な低下が、出産後 1 日に 30 mg/kg 体重/日投与群および 100 mg/kg 体重/日投与群でみられた。これは、300 mg/kg 体重/日投与群ではみられず、また、出産後 4 日には 100 mg/kg 体重/日投与群のみでみられたこと、その後は、哺育児の生存率は対照群と同等であったこと、P1 児動物の生存率のこれら統計学的に有意な低下は P2 世代では認められなかったこと、用量反応関係がないこと、という事実から、P1 哺育児の生存率低下は、投与に関連したものではないことが示唆された。

性周期；いずれの用量においても性周期への影響はなかった。

精子検査；いずれの用量いずれの精子検査項目においても検体投与の影響は認められなかった。

身体発達の指標；膈開口の齢は全群とも同様であり、投与の影響は認められなかった。雄では、100 および 300 mg/kg 体重/日投与群において包皮分離の日齢がわずか (1.9~2.4 日程度) だが統計学的に有意に遅延した。これらのわずかな遅延は、以下の 3つの理由により毒性学的意義のないことが示唆される。

1) 観察された値は本指標の正常な変動の範囲内であること [当実験施設で最近実施された本指標を調べた 2つの繁殖試験では、対照の雄の包皮分離は 45.9 日齢で (Carney ら, 1998), 一方他の試験では対照群の雄の包皮分離は 37.9 日齢 (F1a 同腹児) および 44.7 日齢 (F1b 同腹児) であった (Carney ら, 1999)]。このことは、包皮分離の齢差は対照動物間でも約±2.5 日は普通の変動幅であるという他の実験施設の経験とも一致する (Clark, 1998)。

2) 300 mg/kg 体重/日投与群の動物の体重減少、特に離乳時における体重減少は、包皮分離のわずかな遅延の原因となりうる。Ashby および Lefevre (2000) は、包皮分離は性成熟前の体重に大きく依存すると報告しており、300 mg/kg 体重/日投与群の F1 離乳児の体重は 10.7%まで減少した。食餌制限試験でも包皮分離の齢に対する低体重影響の可能性が支持された (Carney ら, 1998)。

3) 最後に、包皮分離は、それ自体は悪影響というより抗アンドロゲン影響の可能性を示す一つの指標と考えられる。本試験で、雄の生殖器の重量や組織学的所見、肛門・生殖突起間距離または雄の生殖機能障害のいずれにも影響がないことを考慮に入れると、抗アンドロゲン影響を裏付けるような証拠はない。また、抗アンドロゲン物質はしばしば包皮分離の齢と包皮分離時の体重の両方を増加させるが (EDSTAC 最終報告書, 1998), 今回の試験では認められなかった。

また、30 mg/kg 体重/日投与群の雄において肛門・生殖突起間相対距離に、統計学的に有意な増加がみられたが、絶対距離には変化が認められなかった。その他の投与群ではみられなかったことを考慮に入れると、この増加は偶発的で、投与に関連しないものと考えられた。

臓器重量 ; <P1 世代>100 または 300 mg/kg 体重/日投与群の雄の肝重量および対体重比に対照群と比較して、統計学的に有意な増加がみられた。300 mg/kg 体重/日投与群において、肝重量の増加は、投与に関連した病理所見、軽微な小葉中心性肝細胞肥大と一致した。一方、100 mg/kg 体重/日投与群の雄にみられた肝重量増加と関連する病理組織学的所見は認められず、したがって、これらの投与群の変化は毒性学的に意義のないものと考えられた。また、30 mg/kg 体重/日投与群の雄において肝対体重比の統計学的に有意な増加がみられたが、軽微であり投与に関連した病理所見も認められなかったため、最終体重の軽度の低下による 2 次的なもの投与に関連したものではないと考えられた。300 mg/kg 体重/日投与群の雌において、最終体重の統計学的に有意な減少と腎重量および対体重比の統計学的に有意な増加がみられた。腎重量増加は腎の病理組織学的変化と一致したため投与の影響と考えられた。また、300 mg/kg 体重/日投与群の雌で副腎、脳、肝臓、甲状腺の対体重比に統計学的に有意な増加がみられたが、同群でみられた体重減少を反映していると解釈された。

<P2 世代>300 mg/kg 体重/日投与群の雄においても、最終体重に統計学的に有意な減少が認められた。100 および 300 mg/kg 体重/日投与群の雄では、肝対体重比に統計学的に有意かつ用量に関連した増加がみられた。300 mg/kg 体重/日投与群では対照群と比べ統計学的に有意ではなかったものの、肝重量も増加した。本所見は、非常に軽微な小葉中心性肝細胞肥大と一致したため投与関連性の影響と考えられた。100 mg/kg 体重/日投与群の雄では肝重量の高値に一致するような病理組織学的関連はなく、したがって、本群における変化は、毒性学的に意義はないとは考えられた。300 mg/kg 体重/日投与群の雄でも、脳および甲状腺の対体重比に統計学的に有意な増加がみられ、これらの変化は 300 mg/kg 体重/日投与群の雄における体重の減少を反映していると解釈された。300 mg/kg 体重/日投与群の雌では腎重量および対体重比に統計学的に有意な増加がみられた。腎重量の増加は、P 1 世代と同様に投与に関連した腎の病理組織学的変化と一致したため投与の影響と考えられた。300 mg/kg 体重/日投与群の雌でも、肝の対体重比に統計学的に有意な増加がみられた。この変化は、300 mg/kg 体重/日投与群の雌における最終体重のわずかな低下を反映したもので、肝の対体重比増加と一致する病理組織学的関連所見はなかったため、検体投与との関連性を示すものではないと解釈された。

<F1 世代>300 mg/kg 体重/日投与群の雄において、投与に関連して最終体重と脳重量が統計学的に有意に減少し、脳の対体重比が有意に増加した。脳重量の変化は 300mg/kg 体重/日投与群の雄の低体重を反映したものと解釈された。300 mg/kg 体重/日投与群の雌では最終体重が対照と比較して低値であった。統計学的有意差はないものの、この変化は投与に

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

関連していると解釈された。雌離乳児の臓器重量には、いずれの用量においても投与に関連した変化はなかった。

<F2世代>300 mg/kg 体重/日投与群の雌雄において最終体重が対照と比較して低値であり、統計学的に有意ではなかったが、最終体重の低値は投与に関連していると解釈された。100 および 300 mg/kg 体重/日投与群の雌において胸腺重量が対照群と比べ、それぞれ 83 及び 85%であり、統計学的有意差がみられた。100 mg/kg 体重/日の雌では胸腺の対体重比も有意に低かった。胸腺重量の変化は、用量反応相関性がないことから投与に関連していないと解釈された。

肉眼的病理検査；すべての肉眼的病理所見は自然発生的変化であり、検体投与と関連していないと考えられた。

病理組織学的検査；P1 及び P2 世代ともに、300 mg/kg 体重/日投与群の雄では肝臓の軽微な小葉中心性肝細胞肥大の発生頻度が対照群と比べ有意に増加した。この変化は、300 mg/kg 体重/日投与群の雄における肝臓重量の増加と一致、検体投与の影響と解釈された。また、300 mg/kg 体重/日投与群の雌では腎盂上皮の多巢性過形成の発生率と程度の増加、軽微から軽度の腎盂上皮慢性炎症、軽度の慢性尿細管間質性炎症、多巢性尿細管変性の発生率と程度の増加、腎盂内または集合管管腔の結晶が認められた。腎盂上皮の過形成は、約 3~15 細胞の厚さであり、腎乳頭の基部、側部や先端部を含んでいた。一方、影響の認められない対照群や 30 mg/kg 体重/日投与群では腎盂上皮は 1~は 2 細胞の厚さであった。300 mg/kg 体重/日投与群の動物数例に、腎盂内または集合管管腔の結晶が認められた。結晶は不定形であり、いくつかは不規則な境界を有する不定形の好酸性構造で、その他は好塩基性で粒状であり、少数例に中央部に同心円のある好塩基性結晶がみられた。300 mg/kg 体重/日投与群の雌 8 例における腎盂上皮過形成は、基底結合組織の慢性炎症に付随していた。300 mg/kg 体重/日投与群の雌 7 例に、間質中の多数のリンパ球および隣接する尿細管管腔の好中球が特徴とする慢性活動性尿細管間質性炎症がみられた。100 mg/kg 体重/日投与群において P1 世代の雌 2 例に、腎盂内結晶が認められ投与に関連した所見と判断された。30 または 100 mg/kg 体重/日投与群の P1 世代の雄親動物ならびに 30 mg/kg 体重/日投与群の P1 世代の雌親動物では、投与に関連した病理組織学的変化は認められなかった。その他の病理組織学的所見は自然発生的変化であり、検体投与に関連していないと解釈された。妊性低下の兆候がみられた動物の生殖器を組織学的検査した結果、投与の影響は認められなかった。

以上の結果より、2 世代にわたって本剤を飼料中に混入して投与した結果、100 mg/kg 体重/日以上群雌において腎盂上皮の多巢性過形成、腎盂内または集合管管腔の結晶が、また、300mg/kg 体重/日投与群において摂餌量の減少（P2 世代雄、P1 および P2 世代雌、哺育期間開始から 2 週間）、体重または体重増加量の減少（P2 世代雄、P1 および P2 世代雌、妊娠後期ならびに全哺育期間）、雄の肝臓の絶対/相対重量の増加、雌の腎臓の絶対/相対重量の増加が認められた。一方、繁殖能力、哺育児生存率および性成熟のいずれの指標においては検体投与の影響は認められず最高投与量の 300 mg/kg 体重/日でも影響がなかった。両世代とも 300 mg/kg 体重/日投与群の児動物の体重が減少し、この変化は母動物の摂餌量および体重減少に関連しているものと解釈された。以上の結果から、親動物に関する無影響量（NOEL）は 30 mg/kg 体重/日であり、児動物に関する無影響量及び繁殖毒性に関する無影響量は 100 mg/kg 体重/日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ダウ・ケミカル日本株式会社にある。

表 B①：

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

(12) 繁殖毒性及び催奇形性

2) 催奇形性

ラットにおける催奇形性試験

(資料No.15)

試験機関	ザ・ダウ・ケミカル カンパニー (米国) GLP対応
報告書作成年	2000年

検体の純度：

試験動物： CD系妊娠ラット 1群雌 25匹

試験期間： 試験期間 (1999年8月30日～2000年8月31日)

方法： 検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、0、100、500及び1000 mg/kg体重/日の投与用量で、妊娠6日から20日まで毎日1回強制経口投与した (産栓を発見した日を妊娠0日とした)。

なお、対照群には0.5%メチルセルロース水溶液を同様に投与した。

投与量設定の根拠；

試験項目：

親動物； 一般状態 (検査項目：皮膚、被毛、粘膜、呼吸、震顫・痙攣を含む神経系、行動) 及び生死を毎日観察し、妊娠0、6、9、12、15、18、21日に体重を測定した。摂餌量は妊娠3日より3日間隔で測定した。妊娠21日に帝王切開し、剖検を行なった後、妊娠子宮重量、肝・腎重量、生存及び死亡胎児の数と子宮内位置、吸収痕の数および位置、黄体数、着床数を記録した。

生存胎児；性別、体重を記録し、外表異常の観察を行った。

各同腹児群の約半数の胎児については内臓異常を検査し、残りの胎児は骨格標本を作製して骨格異常の有無を検査した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

結 果：

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

結 果（つづき）：

臨床的およびケージ外からの観察では、死亡例はなく、試験期間を通して投与に関連する所見は認められなかった。体重変化では妊娠 18～21 日の 1000 mg/kg 体重/日投与群における体重増加量は対照群と比較して約 16%減少し、投与に関連していると考えられた。1000 mg/kg 体重/日投与群で妊娠 18～21 日において軽度ではあるが、統計学的に有意な摂餌量の減少が認められ検体投与の影響と考えられた。また、1000 mg/kg 体重/日で腎重量と対体重比の増加がみられたがこれらは投与に関連していると考えられ、CD ラットにおける 13 週間混餌予備試験の結果と一致していた。また、軽度ではあるが統計学的に有意な肝の対体重比の増加 (7～9%) が全投与用量でみられた。一方、肝重量の統計学的に有意な増加が 100 mg/kg 体重/日でのみ認められた。これは肝重量の増加が軽度であること、10 倍の用量の差がありながら、明らかな用量反応がないこと、また投与に関連した病理組織学的変化がないことを考慮すると、肝重量の増加に関しては毒性学的意義はないと考えられた。また、肉眼的病理検査においては投与に関連した病理所見は認められなかった。妊娠率、黄体数、着床数、腹当り生存胎児数、着床前胚死亡率、胚吸収率、胎児体重、胎児の性比または妊娠子宮重量に関しては、いずれの投与群においても有意な差は認められず、胎児変化の発生率にも、対照と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。胎児検査において、低頻度で多種の変異および奇形が全群にわたって散見された。そのうち 500 および 1000 mg/kg 体重/日投与群では各 2 例の胎児に皮膚の過度の弛緩を特徴とする異常である皮膚弛緩症が観察された。いずれの場合にも、2 例の皮膚弛緩症胎児は同腹児であった。皮膚弛緩症は、当施設において最近実施された非関連物質のいくつかの発生毒性試験で観察されており、この異常が投与の影響というよりむしろ動物系統の遺伝的背景に関連していることを示唆している。他の奇形に関しては、100 mg/kg 体重/日投与群の胎児 2 例におけるクラス II の波状肋骨、胸骨裂および 1000 mg/kg 体重/日の胎児 1 例における 1 個の過剰胸椎が観察された。この試験で観察されたすべての奇形と変異は低頻度の発生であり、用量に関連して増加することはない。

以上の結果から、本剤を妊娠ラットに投与した場合、1000 mg/kg 体重/日投与群で母動物に体重増加抑制、摂餌量の減少、腎重量・対体重比の増加が認められ、母体及び胎児における無毒性量はそれぞれ、500 および 1000 mg/kg 体重/日、また最高投与量の 1000 mg/kg 体重/日でも胎児に対して致死作用や催奇形性を有しないと判断される。

3) ウサギにおける催奇形性試験

(資料No.16)

試験機関	ザ・ダウ・ケミカル カンパニー (米国) GLP対応
報告書作成年	2001

検体の純度：

試験動物： ニュージーランド白色種妊娠ウサギ (5~6 ヲ月令)
1 群雌 25 匹

試験期間： 試験期間 (1999 年 12 月 20 日~2000 年 2 月 8 日)

方法： 検体を 0.5%メチルセルローズ水溶液に懸濁し、0, 5, 25 及び 75 mg/kg体重/日の投与用量で、妊娠 7 日から 27 日まで毎日 1 回強制経口投与した (交尾の観察された日を妊娠 0 日とした)。

なお、対照群には 0.5%メチルセルローズ水溶液を同様に投与した。

投与量設定の根拠；

試験項目：

親動物； 一般状態 (検査項目：皮膚、被毛、粘膜、呼吸、震顫・痙攣を含む神経系、行動) 及び生死を毎日 1 回観察し、妊娠 0, 7, 10, 13, 16, 20 および 28 日に体重を測定した。摂餌量は妊娠 4 日から毎日測定した。妊娠 28 日に帝王切開し、剖検と肝、腎、妊娠子宮重量を測定し、黄体数、着床数、生存及び死亡胎児の数と子宮内位置を記録した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

生存胎児；性別，体重を記録し，外表異常の観察を行った。

すべての胎児について内臓異常の有無を検査した後，骨格標本を作製して骨格異常の有無を検査した。

結 果：

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

結 果 (つづき)

妊娠 27 日に 75 mg/kg 体重/日投与群の 1 例の死亡が認められ、同群の他 1 例が妊娠 23 日に流産した。この 2 例の死亡動物とも胃腸障害の前兆があり、剖検における生存動物にも胃腸障害の証拠となる便の減少または無便および（または）便の異常な硬さ、便の色、粘液物質を含む便が 75 mg/kg 体重/日で 23 例中 10 例にみられた。75 mg/kg 体重/日投与群における、これら臨床症状の発生率の増加、1 例の死亡および 1 例の流産は検体投与に関連していると考えられた。25 mg/kg 体重/日投与群では、2 例が妊娠 27～28 日に便の変化を示したが、両動物とも正常な胎児が確認された。他の 1 例には胃内に毛球が観察された。以上、25 mg/kg 体重/日投与群胃腸への影響は軽度であったため、25 mg/kg 体重/日以下では母体毒性はないと考えられた。5 mg/kg 体重/日投与群で、便の減少および（または）軟便が雌 5 例にみられたが、同じ所見は対照群にも観察された。体重に関してはどの用量の投与後にも対照群の動物と比較して平均体重に関して統計学的有意差はなかった。一方、統計学的に識別できなかったものの、妊娠中期に 75 mg/kg 体重/日投与群の雌の体重増加量に一貫した減少があり、妊娠 13～24 日の期間中の体重増加量は 43%の減少となった。それ以降、75 mg/kg 体重/日投与群の雌は妊娠 24～28 日に体重増加量は上昇し、この期間中では対照群の動物より 34.4 g 増加した。75 mg/kg 体重/日投与群において妊娠後期の体重増加の増加率は、妊娠中期の体重増加量の減少を相殺し、結果的に全投与期間（妊娠 7～28 日）を通した体重増加量は対照群に比べ 3%大きかった。25 および 5 mg/kg 体重/日投与群における動物の体重増加量は検体投与によって影響を受けなかった。摂餌量も対照群と比較してどの投与群にも統計学的に有意な差はなかった。病理検査では妊娠 27 日に死亡した 75 mg/kg 体重/日投与群の 1 例で、胃・小腸内摂取物の減少、盲腸内水様内容物、会陰部の汚れが認められた。また子宮内に正常と思われる胎児 8 例が含まれていた。胎児の付いていない胎盤が 1 例みられたが、流産の形跡はなかった。他の流産した 1 例の剖検では、胆嚢壁に数個の隆起した退色巣と盲腸内に水様内容物がみられた。これらの動物の死亡または流産の正確な原因は特定できなかったが、検体投与はこれら母動物で観察された所見の一因と考えられた。また、5 mg/kg 体重/日投与群の妊娠動物では、胎児 1 例が部分的に食されていて十分に評価できなかったが、妊娠 25 日に正常と思われる胎児 9 例を流産した。この動物には胃内毛球、胸水、盲腸内暗色水様内容物および血液による会陰部の汚れ（直前の流産のためと思われる）がみられた。この動物の体重減少（妊娠 10～13 日から流産まで 342 g 減）は妊娠 14～24 日の便の減少または無便と相まって、胃腸障害が起こっていたことを示唆している。胃内毛球はウサギでは稀なことではなく、特に妊娠後期に雌は分娩に備えて自身の毛をむしりとして巣の内張りにする。胃腸内の流れが強く障害される場合、食欲減退、体重減少および便の減少は毛球の普通の臨床兆候である (Suckow and Douglas, 1997)。したがって、この状態は検体投与に関連していないと考えられた。予定された剖検で、投与に関連した唯一の所見は 75 mg/kg 体重/日投与群の動物 1 例 (6331) における胃腸への影響であり、胃内の粘液、水様内容物を容れた盲腸および盲腸腔内の出血が観察された。剖検で認められ

た他の所見は、散発的および（または）投与に関連しないものであった。投与群のすべての動物における妊娠率、黄体数、着床数、着床前胚死亡率または同腹児数に投与に関連した有意な影響は認められなかった。75 mg/kg 体重/日投与群で、着床後胚死亡百分率、腹当りの胚吸収数、吸収された着床の百分率および腹当りの胚吸収数など、胚吸収率を評価するために用いたいくつかの関連指標に軽度の増加があった。統計学的に識別できなかったものの、これらの値は最近の背景対照データの範囲外であり、投与に関連していると考えられた。ウサギは通常栄養的な影響に著しく敏感であり、またウサギにおける栄養的ストレス要因と妊娠維持の関連は十分に認識されているもので、胚死亡率の軽度の増加は 75 mg/kg 体重/日投与群で妊娠動物に起こった栄養障害に続発したものと考えられた。たとえば、より軽度の食餌制限は様々な結果をもたらすが、妊娠ウサギにおける強度の食餌制限は流産および胚吸収率の増加を引き起こすことが示されている (Matsuzawa ら, 1981 ; Clark ら, 1986 ; Petrere ら, 1993) 。さらに、母体の胃腸への影響をもたらす化学物質の処置は、一般的なストレスや不快と同様に特定の栄養素に付加的作用を及ぼす (Pitt ら, 1997a, b) 。また、150 mg/kg 体重/日までの用量でのウサギにおける予備試験において胚・胎児の生存に及ぼす悪影響はまったくなかった。これらの報告により、75 mg/kg 体重/日投与群の雌における胚吸収率の軽度な増加は、母体毒性と関連したものであることを支持している。25 または 5 mg/kg 体重/日投与群において、投与に関連した繁殖指標への影響は認められなかった。

胎児に関してはどの投与群においても胚・胎児発生のいずれの指標にも投与に関連した影響はなかった。全体で、奇形胎児は対照群と 5 mg/kg 体重/日投与群でそれぞれ 3 腹からの 3 例、25 mg/kg 体重/日投与群の 4 腹からの 4 例、75 mg/kg 体重/日投与群で 2 腹からの 2 例で、それら奇形の殆どは散発的所見として発現した。対照群の胎児 1 例に癒合肋骨が、他の 1 例に食道後右鎖骨下動脈がみられた。5 mg/kg 体重/日投与群の胎児に胆嚢欠損、水腎症および癒合胸椎椎体がそれぞれ散発的に発生した。25 mg/kg 体重/日投与群における奇形は、1 例が癒合肋骨で、別の 1 例は食道後右鎖骨下動脈であった。75 mg/kg 体重/日では 1 例に分岐肋骨が認められた。また、対照群の 1 例と 25 mg/kg 体重/日投与群の 1 例での癒合肋骨を伴う半胸椎の多発異常が認められた。25 mg/kg 体重/日投与群の同胎児には肺動脈狭窄、心室中隔欠損および肺後葉欠損もみられた。75 mg/kg 体重/日投与群の胎児 1 例に動脈幹遺残、食道後右鎖骨下動脈および肺後葉欠損がみられた。

胎児の変異に関しては、5 mg/kg 体重/日投与群で癒合胸骨分節に統計学的に有意な増加（4 腹からの 7 例の胎児）がみられたが、用量反応関係はなく、検体投与関連性はないと判断された。本試験中に観察された他の胎児変異は腹での発生率が低頻度で、かつ用量反応関係が認められなかったため検体投与との関連はないものと考えられた。

以上、本剤を妊娠ウサギに投与した結果、75 mg/kg 体重/日投与群で、死亡 1 例、流産 1 例、胃腸障害、運動低下等の臨床症状及びそれと関連した肉眼的病理所見（水様

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

または血様の盲腸内容物、胃粘液および会陰部の汚れ)、妊娠 13~24 日に体重抑制、摂取物の減少などの母体毒性が観察された。これら母体毒性と一致して、75 mg/kg 体重/日投与群で胚吸収率の種々の測定指標が軽度に増加した。この変化は、統計学的有意差はなかったものの、胚吸収率の指標の値は背景対照範囲から外れており、投与に関連しているが、この用量群における母体への影響に続発したものと思われた。25 および 5 mg/kg 体重/日では、検体投与に関連した母体または胎児へのいかなる悪影響も認められなかった。以上を考慮すると、本剤のウサギにおける催奇形性試験では、母体毒性および発生毒性に関する無影響量 (NOEL) は 25 mg/kg 体重/日で、75 mg/kg 体重/日までの用量では催奇形性は認められなかった、と結論される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

(13) 変異原性

1) 細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料No.17)

試験機関	コバンス社 (米国)
	GLP対応
報告書作成年	1999年

検体の純度：

方 法： ヒスチジン要求性のサルモネラ *Salmonella trphimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) およびトリプトファン要求性の大腸菌 WP2 *uvrA* を用い、ラット肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9) の存在下および非存在下で Ames らの方法で実施し、変異原性を検定した。検体を溶解させるため、DMSO を用いた。

用量設定の根拠：

陽性対照として代謝活性化法ではベンゾピレン、2-アミノアントラセンを用い、非代謝活性化法では2-ニトロフルオレン、アジ化ナトリウム、ICR-191、及び4-ニトロキノリン-N-オキシドを用いた。

陽性反応の判定基準は、以下のように行った。

プレートあたりの平均復帰変異体数において、適切な溶媒対照のプレートあたりの平均値と比較して、最低一種の菌株で3倍以上 (TA98, TA1535, TA1537, WP2*uvrA*) あるいは2倍以上 (TA100) の用量に関連した再現性のある増加が認められた場合に、被験物質は陽性であると判断した。観察された反応が上記3つの基準 (程度、用量反応性、再現性) を満たさない場合、陰性と判断した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

結 果：
本試験

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

確認試験

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

本試験条件下において、S9 ミクロソーム酵素の存在下、非存在下のいずれにおいても、プレートあたりの復帰変異体数増加は認められなかった。一方、陽性対照群では著明な増加が認められた。

以上の結果から、本剤は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有さないものと判断される。

2) ラットリンパ球を用いた in vitro 染色体異常試験

(資料No.17)

試験機関	ザ・ダウ・ケミカル・ カンパニー (米国) GLP対応
報告書作成年	1999年

検体の純度：

試験動物： SD系雄性ラット（14～17週令）の血液から採取したリンパ細胞を用い染色体異常誘発性を検索した。

試験方法： 検体は、代謝活性化及び非代謝活性化系で、0, 333, 1000, 1500 µg/mLの濃度でDMSOで溶解した。ラットリンパ細胞を全血培養開始からおおよそ48時間後に検体溶液と4時間処理した。その後20時間後に細胞を採取し染色体異常を検索した（試験1）。また、確認のため、培養条件は同じで、検体濃度を非活性化系では0, 33.3, 100, 333, 1000 µg/mL、活性化では0, 333, 1000, 1500 µg/mLとし、培養細胞を24時間連続処理した後24時間時に細胞を採取し染色体異常を検索した（試験2）。その後、試験2で分裂指数の減少が望ましい水準に達しなかったため、24時間連続処理の再試験（試験3）を、検体濃度0, 400, 700, 800 µg/mLで行った。

陽性対照には、非活性化系ではマイトマイシンCを（0.5, 0.05, 0.075 µg/mL）、または活性化系ではシクロフォスファミドを4 µg/mLの濃度で用いた。

各濃度2枚のスライドを用い、1枚のスライドあたり100個の分裂中期像を、陽性対照群では50から75個の分裂中期像を観察した。染色体の異常をギャップ（gap）、切断（break）、交換（exchange）に分類し計測した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

結 果：

検体処理群では、濃度と関連した染色体異常の増加はなかった。一方、陽性対照として用いたマイトマイシン及びシクロホスファミドは、有意な染色体異常の増加を示した。

以上の結果から、検体はラットのリンパ細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験において陰性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ダウ・ケミカル日本株式会社にある。

3) マウスの骨髄を用いた小核試験

(資料No.19)

試験機関 ザ・ダウ・ケミカル・
カンパニー (米国)
GLP対応
報告書作成年 1999年

検体の純度：

試験動物： CD-1系マウス (約8週令) 1群雄各5匹

方法： 検体を0.5%メチルセルロース溶液に懸濁させ、CD-1系雄マウスに、
検体を0, 500, 100, 2000 mg/kg体重の用量で2日間連続強制経口
投与した。陰性対照群には、溶媒を10 mL/kgの割合で、陽性対照群
にはシクロホスファミドを120 mg/kg体重の割合で投与した。

検体及び溶媒投与群は24時間後に屠殺し、陽性対照群は単回投与後
24時間時に屠殺した。

各動物について2000個の多染性赤血球を観察し、そのうち小核を有
する多染性赤血球の出現頻度を記録した。

また、多染性赤血球と正染性赤血球の比MN-PCE (多染性赤血球×100/
(多染性赤血球+正染性赤血球))も算出した。赤血球中の多染性
赤血球の割合は動物あたり200個の赤血球に基づいて計測し、結果
は百分率で表した。

結果： 本試験に使用した投与液中の検体の分析濃度は、規定の値の88～
100%であった。動物の生存期間中、毎日の観察において毒性を示唆
する所見は認められなかった。投与による体重への顕著な影響も認め
られなかった。

検体投与群と陰性対照群の間で、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意差は認められなかった。一方、陽性対照群では小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な増加がみられた。

また投与群の動物において、多染性赤血球の比率に陰性対照値と比較して有意差は認められなかったが、陽性対照動物の多染性赤血球の比率は、陰性対照動物における値と比較して有意に低いことが確認された。

以上の結果から、本試験条件下で本剤はマウスの骨髄細胞を用いた *in vivo* 小核試験において陰性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ダウ・ケミカル日本株式会社にある。

(資料 19-1)

4) CHO 細胞を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験

試験機関 ダウ・ケミカル・カンパニー

[GLP 対応]

報告書作成年 1999 年

検体純度：

試験方法：チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO-K1-BH4) を用いて、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT) 遺伝子座における変異細胞の出現率を、ラット肝から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 mix) の存在下及び非存在下の両方で検定した。

細胞を播種し、24 時間後にジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させた検体を、46.88, 93.75, 187.5, 375, 750 及び 1500 µg/mL の濃度で 4 時間処理した。処理後細胞を洗浄し、通常培地と交換した。一部は毒性検査用シャーレに播種し、6~8 日培養後にコロニーを固定・染色した。表現型発現期間 (7~9 日) の継代培養は 2~3 日ごとに行った。その後チオグアニン選択培地を含む突然変異検出用シャーレ及びコロニー形成率用シャーレに再播種した。約 6~10 日間の培養後に、これらの固定・染色を行い、コロニー数をカウントし、細胞 1×10^6 個あたりの突然変異出現率を算出した。検体処理の他に、陰性対照 (1%DMSO) 及び陽性対照 (S9 mix の存在下と非存在下でそれぞれ 20-メチルコラントレンとエチルメタンサルフォネート) 処理も行った。

用量設定根拠；

試験結果：結果を表 1 と表 2 に示した。

検体処理されたどの濃度においても、代謝活性化の有無に関わらず、突然変異出現率 (細胞 10^6 個に対する頻度) に有意な増加は認められなかった。一方陽性対照物質で処理された群では明らかな増加が認められた。

結論：以上の結果から、本検体は代謝活性化を含む本試験条件下において突然変異原性は陰性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ダウ・ケミカル日本株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

(14) 生体機能への影響に関する試験

ペノキススラムにおける薬理試験

(資料No.20)

試験機関	環境バイリス㈱
	GLP対応
報告書作成年	2003年

検体の純度：

1) マウス及びラットの中枢神経系に対する作用

(1) 雌雄マウスの一般状態

供試動物： ICR系マウス（体重 雄 23.9～26.2g, 雌 18.0～25.5g），1群
雌雄各3匹

方 法： 検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁して0, 200, 600,
2000 mg/kg体重を経口投与し, Irwinの多次元観察法に準じて
投与後1, 2, 4, 6, 24時間時に行動変化, 神経症状の中毒症
状を観察した。また投与24時間後に動物の体重も測定した

結 果： いずれの用量またいずれの観察時にも動物の一般状態, 体重
に対照群との差は認められなかった。

(2) ラットの一般状態

供試動物： SD系雄ラット（体重 164.3～181.8g），1群各5匹

方 法： 検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁して0, 200, 600,
2000 mg/kg体重を経口投与し, 投与後1, 2, 4, 6, 24時間時
に機能観察総合評価法に準じて行動変化, 神経症状, 中毒症
状を評価し, 体温, 瞳孔径も測定した。また, 投与24時間後
に動物の体重も測定した。

結 果： 200 mg/kg 体重群で投与後6時間時に, 600 mg/kg 体重で投与
後4及び6時間に, 2000 mg/kg 体重で投与後4時間時にそれ
ぞれ1例ずつ移動性の軽度減少がみられたのみでその他に検
体投与によると思われる行動変化, 神経症状, 体温変化, 瞳
孔径の変化および体重変化は認められなかった。

(3) マウスのヘキソバルビタール睡眠に対する作用

供試動物： ICR系マウス（体重 雄 23.3～27.8g），1群雄各8匹

方 法： 検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁して, 0, 200, 600,
2000 mg/kg体重を経口投与し, 1時間後にヘキソバルビタール
を80 mg/kg体重の用量で皮下投与し, 正向反射の消失から回
復までの時間を測定し, 睡眠に対する影響を調べた。

結 果：

いずれの投与群でも検体投与の影響は認められなかった。

(4) ラットの循環器系に対する作用

供試動物： SD系雄ラット（体重 192.8～238.1g） 1群各5匹

方 法： 検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁して、0, 200, 600, 2000 mg/kg体重を経口投与し、収縮期血圧、心拍数に対する影響を調べた。

結 果：

収縮期血圧は、2000 mg/kg 体重までの用量を投与したが、検体投与による有意な作用を示さなかった。心拍数に関しては600 mg/kg 体重群で2時間後に、2000 mg/kg 体重群で1及び2時間後に対照群と比較して有意な低下が認められた。

(5) マウスの消化器系に対する作用

供試動物： ICR系マウス（体重 雄27.0～32.0g）， 1群雄各8匹

方 法： 検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁して、0, 200, 600, 2000 mg/kg体重を経口投与し、1時間後に炭末懸濁液を経口投

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

与した。炭末懸濁液投与 30 分後に、マウスを屠殺し、胃から大腸までの腸管を摘出、幽門部から盲腸開口部間の長さに対する炭末移動距離の比率 (%) を調べた。

結 果：

いずれの投与群においても対照群と比較して検体投与の影響は認められなかった。

(6) ラットの腎機能に対する作用

供試動物： SD系雄ラット（体重 152.4～169.2g）1群各5匹

方 法： 検体を 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁して、0, 200, 600, 2000 mg/kg体重を経口投与し、投与後 6 時間までの尿量、尿中のNa⁺, K⁺, Cl⁻濃度を測定し腎機能に対する影響を調べた。

結 果：

2000 mg/kg 体重までの用量を投与したが、検体投与による変化は認められなかった。

(7) ラットの血液に対する作用

供試動物： SD系雄ラット（体重 168.3～193.0g）1群各5匹

方 法： 検体を 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁して、0, 200, 600, 2000 mg/kg体重を経口投与し、投与後 1 時間で採血し、血液凝固としてプロトロンビン時間 (PT) および活性トロンボプラスチン時間 (APTT) を、溶血としてヘモグロビン濃度 (Hb) に対する影響を調べた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

結 果：

ヘモグロビン濃度に対して、200 mg/kg 体重群で有意な増加を示したが、他の投与群では有意差はなく、用量依存性が認められなかったため検体投与に対する影響ではないと考えられた、その他に統計学的有意差は認められなかった。

(8) まとめ

以上、本剤の急性中毒症状発症の可能性及び急性中毒症の性格を明らかにし、その処置法を考察するため、本試験を行った。

600 及び 2000 mg/kg 体重群で検体投与後 1 ないし 2 時間時に心拍数の低下が認められたが、投与後 4 時間には回復した。その他、検体投与に関連する影響は認められなかった。

以上の試験結果より、本剤が散布作業にともなって摂取された場合や、誤って摂取された場合に、急性中毒の発現する可能性は低いと推測された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

「生体機能への影響に関する試験」の総括表

2) 急性経皮毒性

ラットにおける急性経皮毒性試験

(資料No.2)

試験機関 ザ・ダウ・ケミカル・
カンパニー (米国)
GLP対応
報告書作成年 2002年

検体の純度：21.9%フロアブル

[組成] ペノキススラム (原体) 21.9%
界面活性剤・溶剤等 78.1%

試験動物：Fischer 344系ラット (開始時約8週令) 1群雌雄各5匹
(体重雄 163.4~174.6g, 雌 117.0~126.2g)

試験期間：14日間観察

方法：検体をガーゼにのせて、剃毛した6×6cmの範囲に24時間閉鎖貼付した。

試験項目：全動物を対象として詳細な一般症状を含む中毒症状及び生死を14日間毎日観察した。

試験終了時、全動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg体重)	5000
LD ₅₀ (mg/kg体重)	5000以上
死亡開始時間及び終了時間	死亡は認められなかった
症状発現及び消失時間	投与日より発現, 投与7日に消失。
死亡の認められなかった最高投与量 (mg/kg体重)	5000

一般状態の変化として、雄1例及び雌5例において口周囲の汚れ、雄1例において鼻部周囲の汚れ、並びに雌1例において会陰部の汚れが認められた。又、雄3例及び雌5例全ての試験部位で、皮膚の潰瘍化及び赤色化が認められた。試験部位における皮膚の潰瘍化及び赤色化は、ガーゼパッチ及び被験物質の固定に用いたテープを24時間皮膚暴露後に除去したことによるものと考えられた。いずれの動物でも、一般状態の変化は試験7日までに回復した。剖検では異常所見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ダウ・ケミカル日本株式会社にある。

(2) 眼及び皮膚に対する刺激性

1) 皮膚刺激性

ウサギを用いた皮膚一次刺激性試験

(資料No.3)

試験機関 ザ・ダウ・ケミカル・
カンパニー (米国)
GLP対応
報告書作成年 2002年

検体の純度：21.9%フロアブル

[組成] ペノキススラム (原体) 21.9%
界面活性剤・溶剤等 78.1%

試験動物： ニュージーランド白色種ウサギ (開始時 約 3 ヶ月令)
1 群雄 1 匹, 雌 2 匹 (体重 雄 : 2.443~2.473 kg)

試験期間： 14 日間観察

方法： 検体をガーゼにのせて, 0.5mL の原液を, 剃毛した 10×10 cm の範囲に 4 時間閉鎖貼付した。

観察項目： 検体適用後 3 日間塗布部位を観察した。

結果： 観察した刺激性変化の採点は以下の表の通りである。
なお, 判定は原文 14 ページの表 2 によった。

変 化	最 高 評 点	投与後観察時間			
		60 分	24 時間	48 時間	72 時間
紅斑, 痂皮	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0
浮 腫	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0
合 計	8.0	0.0	0.0	0.0	0.0

注) 表の点数は 3 匹の平均値である。

投与に関連した刺激性所見は認められなかった。

以上より, 本剤は皮膚刺激性を有しないものと思われる。

2) 眼刺激性

ウサギを用いた眼粘膜一次刺激性試験

(資料No.4)

試験機関 ザ・ダウ・ケミカル・カンパニー (米国)
GLP対応
報告書作成年 2002年

検体の純度：21.9%フロアブル

[組成] ペノキススラム (原体) 21.9%
界面活性剤・溶剤等 78.1%

試験動物： ニュージーランド白色種ウサギ (約4ヵ月令) 1群雄1匹, 雌2匹
(体重2.51~2.58 kg)

試験期間： 72時間観察

方法： 検体を0.1 mlウサギの右眼の結膜のう内に適用した。

観察項目： 検体適用後1, 24, 48及び72時間に角膜, 虹彩, 結膜の刺激性変化を観察した。

結果： 観察した刺激性変化の採点は以下の表の通りである。
なお, 判定はDraize法によった。

項目	最高 評点	投与後観察 (時間)			
		1	24	48	72
角膜					
A. 混濁の程度	4	0.0	0.0	0.0	0.0
B. 混濁の面積	4	0.0	0.0	0.0	0.0
虹彩					
A. 基準	2	0.0	0.0	0.0	0.0
結膜					
A. 紅斑	3	1.0	0.7	0.3	0.0
B. 浮腫	4	0.3	0.0	0.0	0.0
C. 分泌物	3	0.3	0.0	0.0	0.0
角膜(I) = AXBX5	80	0.0	0.0	0.0	0.0
虹彩(II) = AX5	10	0.0	0.0	0.0	0.0
結膜(III) = (A+B+C) X2	20	3.2	1.4	0.6	0.0
合計 = I + II + III	110	3.2	1.4	0.6	0.0

注) 表の点数は3匹の平均値である。

点眼1時間後, 雌2例では軽度の結膜の発赤が認められ, 雄では軽度の結膜の発赤, 軽度の浮腫及び軽度の分泌物が認められた。点眼24時間後, ウサギ2例で軽度の結膜の発赤が認められた。点眼48時間後, ウサギ1例で軽度の結膜の発赤が認められたが, 試験4日までに回復した。

以上の結果より, 検体は軽度の眼刺激性を有するものと思われる。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

(3) モルモットを用いた 21.9%フロアブルの皮膚感作性試験 (資料No.5)

試験機関 スプリングボーン
研究所 (米国)
GLP対応
報告書作成年 2002年

検体の純度：21.9%フロアブル

[組成] ペノキススラム (原体) 21.9%
界面活性剤・溶剤等 78.1%

試験動物：ハートレー系モルモット (約 6~8 週令) 1群雌雄各 10 匹または
5 匹 (体重 338~428g)

試験期間：48 時間観察

方法：Buehler 法にしたがって行った。

投与量設定根拠；

感 作：左腹側部を刈毛し、検体原液を 0.3ml, 6 時間塗布して経皮感作を
7 日ごとに 3 回実施した。

誘 発：最終感作暴露の 2 週間後に、動物の右腹側部を刈毛した後、剃毛
し、検体の原液を 0.3ml 適用した。

観 察 項 目：その後被験物質を除去し、24 時間及び 48 時間後に塗布部位の観察
を行った。

結 果：反応の程度を次の 4 段階で採点した。

評価点	処置に対する反応	評価点	処置に対する反応
紅斑程度 0	反応無し	—	—
紅斑程度 1	軽度の紅斑	浮腫程度 1	軽微の紅斑
紅斑程度 2	中程度の紅斑	浮腫程度 2	軽度の紅斑
紅斑程度 3	重度の紅斑	浮腫程度 3	中程度の紅斑
重度 3 (M-3)	著明な皮膚障害	浮腫程度 4	重度の紅斑

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある。

群	感 作 誘 発		供試動物数	感 作 反 応 動 物 数						陽性率	
				24 時間			48 時間				
				皮膚反応評点 0 1 2 3 4			平均	皮膚反応評点 0 1 2 3 4			平均
検 体	100% 検体	100% 検体	20	20	0	0	0	0	0	0	0
陰性対照	未処置	100% 検体	10	10	0	0	0	0	0	0	0

当該試験機関で行った DNCB, HCA (ヘキシルシナムアルデヒド) による感作物質検出能確認試験結果を以下に示す。

群	感 作 誘 発		供試動物数	感 作 反 応 動 物 数						陽性率								
				24 時間			48 時間											
				皮膚反応評点 0 ± 1 2 3 M-3			平均	皮膚反応評点 0 ± 1 2 3 M-3			平均							
①	0.1% DNCB	0.1% DNCB	20	0	0	2	17	0	1	1.8	0	0	5	14	0	1	1.7	20/20
②	未処置	0.1% DNCB	10	1	9	0	0	0	0	0.5	3	7	0	0	0	0	0.4	0/10
③	5% HCA	2.5% HCA	20	3	10	6	1	0	0	0.7	4	13	2	1	0	0	0.5	7/20
④	未処置	2.5% HCA	10	9	1	0	0	0	0	0.1	10	0	0	0	0	0	0.0	0/20

以上の結果より、本剤の皮膚感作性は陰性であると考えられる。