

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 1. 1 年間反復経口投与毒性及び発がん性

### (1) チアクロプリドのイヌにおける慢性毒性試験

(資料 No. 原体-17)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1998 年 6 月 22 日

検体の純度 : 96.8~97.1%

試験動物 : ビーグル犬、試験開始時 ; 27~32 週齢、体重 7.0~11.0kg

主群 : 1 群雌雄各 4 匹、

衛星群 : 1 群雄 3 匹 (0、100 及び 1000ppm 群、26 週に計画屠殺)

試験期間 : 12 ヶ月 (1996 年 1 月~1997 年 1 月)

#### 【投与方法】

検体を 0 (対照群)、40、100、250、1000ppm となるように飼料と混ぜ 12 ヶ月間雌雄各 4 匹のイヌに投与した。亜急性毒性試験 (資料 No. 原体-11) でみられた前立腺の重量増加と腺肥大を確認するために、0 (対照群)、100、1000 ppm 群ではさらに雄 3 匹のイヌを追加し、26 週間後の中間屠殺に供した。飼料は制限給餌 (1~6 週 : 1 日当たり 300 g、7~17 週 : 1 日当たり 330 g、18~26 週 : 1 日当たり 350 g、27~53 週 : 1 日当たり 380 g) とし、水は自由に摂取させた。検体を添加した飼料は、1 週間に 1 回調製した。

#### 投与用量設定の根拠 ;

慢性毒性試験の投与用量は、亜急性毒性試験の結果 (資料 No. 原体-11) に基づいて決定された。亜急性毒性試験は、0、250、1000 及び 4000ppm の投与用量で開始された。しかし、最高用量の 4000ppm で投与第 1 日目に、嘔吐、飼料摂取量の拒絶等がみられたことから、投与は 4 日で打ち切り、10 日間の回復期間を設けた後、最高用量を 2000ppm として試験を行った。

試験の結果、2000ppm 群でみられた所見は、体重増加の抑制、肝機能酵素 (ALAT, GLDH) の一過性の増加、T4 の低下と TBC の増加傾向、肝薬物代謝酵素 (N-デメチラーゼ) の誘導であり、1000ppm 群では T4 の低下と TBC の増加傾向が認められた。

これらのことから、慢性毒性試験での用量は 0、40、100、250、1000ppm と設定した。

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。

### 【試験項目及び結果】

#### 1) 臨床症状

全動物の外観と行動を毎日数回観察した。

検体に起因した臨床症状は認められなかった。

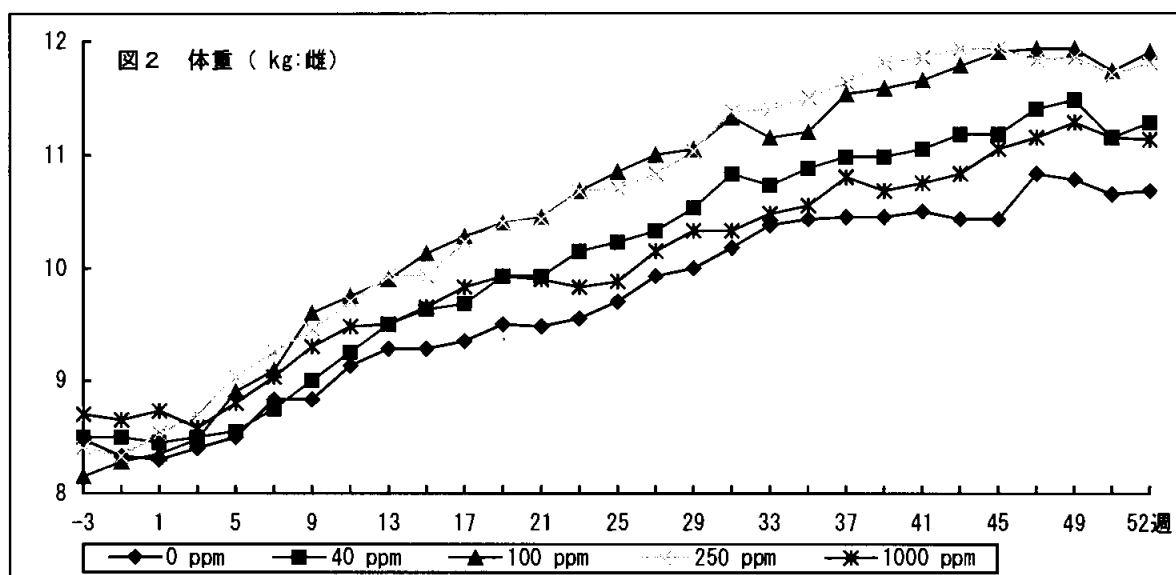
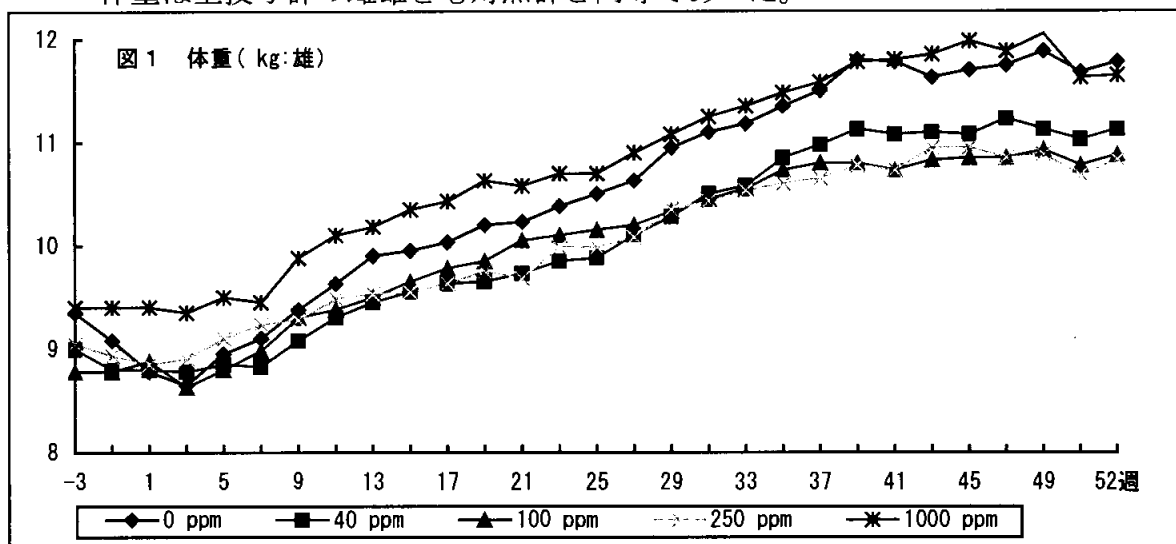
#### 2) 死亡率

52 週間の試験期間中、全動物が生存し、死亡は認められなかった。

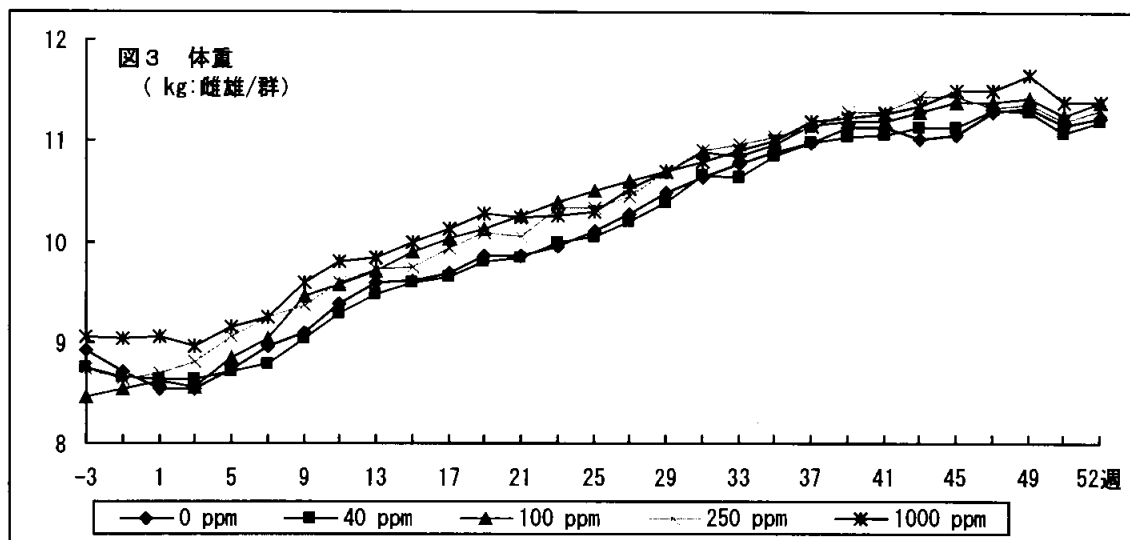
#### 3) 体重変化 (図 1, 図 2, 図 3)

週に 1 回体重を測定し、その値を群毎に平均値で示した (下図)。

体重は全投与群の雌雄とも対照群と同等であった。



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。



#### 4) 摂餌量及び検体摂取量

毎日、摂餌量を測定した。平均摂餌量は週毎に集計して比較した。

摂餌量について、1000ppm 群の雌で給与された飼料を残すことがあったが、体重増加の抑制に影響を及ぼすほどではなかった。

投与期間中の平均検体摂取量は以下のとおりであった。

投与用量 (ppm)		40	100	250	1000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	1.42	3.60	8.88	34.4
	雌	1.39	3.27	8.30	33.8

#### 5) 眼科学的検査

各動物の眼科学的な検査について、試験開始前、投与後 6、14、26、39、52 週に実施した。

どの検査時においても、検体に起因する所見は認められなかった。

#### 6) 心電図

心電図 (ECG) 及びその他の測定を試験開始前、投与後 6、14、26、39、52 週にそれぞれの投与開始前と 2 時間後に実施した。また、心拍数も測定した。

どの検査時においても、検体に起因する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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

#### 7) 臨床神経学的検査

反射（瞳孔、角膜、膝蓋腱、伸筋、屈筋、背筋）と体温、脈拍数の測定を試験開始前と投与後 6、14、26、39、52 週に実施した。

どの検査時においても、検体に起因する所見は認められなかった。

#### 8) 前立腺の形態像

投与後 8、17、26、35、44、51 週の各検査時に、前立腺を触診し、その大きさ、固さ、表面状態及び境界の明瞭さをチェックし記録した。また、5-MHz 凸型トランスジューサーを用いたソノグラフィ解析により前立腺の大きさや構造に関するデータを得た。大きさとしては、矢状断面での各葉の最大巾と最大高、横断面での各葉の最大巾及び二葉あわせた最大巾を計測した（下表）。

表 1 前立腺のソノグラフィ解析（計測）

	検査週	主群 (ppm)				中間屠殺 (ppm)	
		40	100	250	1000	100	1000
横断面/左葉巾	17			↑ 133			
	26			↑ 119			
	51	↑ 115		↑ 119	↑ 133	—	—
横断面/右葉巾	17			↑ 123			
横断面/左右葉巾	17			↑ 136			

—：計測せず、表中の値は、対照群に対する変動率(%), Dunnett-t 検定

横断面での前立腺の巾に特に 250ppm 群の増加傾向が散見されたが、用量相関性がみられなかったことから、性成熟の発達の差異によるもので、検体に起因する所見とは考えられなかった。

中間屠殺群では、いずれの検査時期においても検査した全項目に有意差は認められなかった。

#### 9) 血液学的検査

試験開始前、投与後 6、14、26、39、52 週に血液を頸静脈から採取し、以下の項目の測定を行った。

赤血球数、白血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、メトヘモグロビン濃度、血小板数、

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。

トロンボプラスチン時間 (PT)、部分トロンボプラスチン時間 (PTT)、網赤血球数、ハイツ小体数、赤血球沈降速度 (ESR)。

対照群に比較し投与群に異常を認めなかった。

また、桿状核好中球、分葉核好中球、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球及び正赤芽球の百分比についても同様に検査した。

対照群と投与群の動物で大差はなかった。

#### 10) 血液生化学的検査

試験開始前、投与後 6、14、26、39、52 週に血液を頸静脈から採取し、以下の項目の測定を行った。

アスパギン酸アミノトランスフェラーゼ (ASAT/GOT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALAT/GPT)、アルカリホスファターゼ (APh)、グルタメートデヒドロゲナーゼ (GLDH)、 $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT)、ラクテートデヒドロゲナーゼ (LDH)、クレアチンキナーゼ (CK)、血糖、コレステロール、トリグリセリド、クレアチニン、尿素、ビリルビン (総)、総蛋白、アルブミン、血清電解質 (ナトリウム、カリウム、カルシウム、塩素、無機リン、鉄分及びマグネシウム) 並びに甲状腺ホルモンのトリヨードチロニン (T3)、チロキシシン (T4)、チロキシシン結合能 (TBC)

その結果、1000ppm 群雄の 26 週 (15 nmol/L) と 39 週 (14 nmol/L) でチロキシシンの減少が認められたが、背景対照データの 2s の範囲内 (11~31nmol/L) にあるので自然発生的な変動であるとみなされた。その他の項目に検体投与群と対照群と比べてみて、目立った違いはみられなかった。

表 2 血液生化学的検査 (雄)

	検査 週	主群 (ppm)			
		40	100	250	1000
チロキシシン	26				↓65
	39				↓64

表中の値は、対照群に対する変動率(%)、

↑ ↓ : p<0.05 (Dunnett 多重比較検定)

#### 11) 尿検査

試験開始前、投与後 6、14、26、39、52 週に全動物で外観、比重、ビリルビン、潜血、糖、ケトン体、pH、ウロビリノーゲン、白血球、蛋白、亜硝酸及び尿沈渣に

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

ついて尿検査を実施した。

その結果、本検体に関連した変動は認められなかった。

#### 12) 剖検

試験終了時に、全動物を Narcoren®麻酔下で放血致死させ剖検した。

その結果、本検体に関連した変動は認められなかった。

#### 13) 臓器重量

全例について、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、卵巣、甲状腺、副腎、胸腺、前立腺、脳、下垂体、膵臓、子宮の重量を測定すると共に、対体重比についても算出した。

臓器重量では、対照群と比較して全投与群に統計学的な有意差は認められなかった。

中間屠殺の 1000ppm 群雄の肝重量に僅かな増加がみられ（実重量 4%、体重比重量 6%）、検体に対する反応と考えられた。

主群の 1000ppm 群の前立腺重量の増加がみられた。これは、主として 1 匹の動物 (B813) の前立腺重量 (25.1g) が極めて大きいことによるものであった。他群における重量は変動が大きいものの、背景データ範囲内（平均値 8.6g、範囲 0.58～21.5g）であった。

#### 14) 肝臓の酵素活性

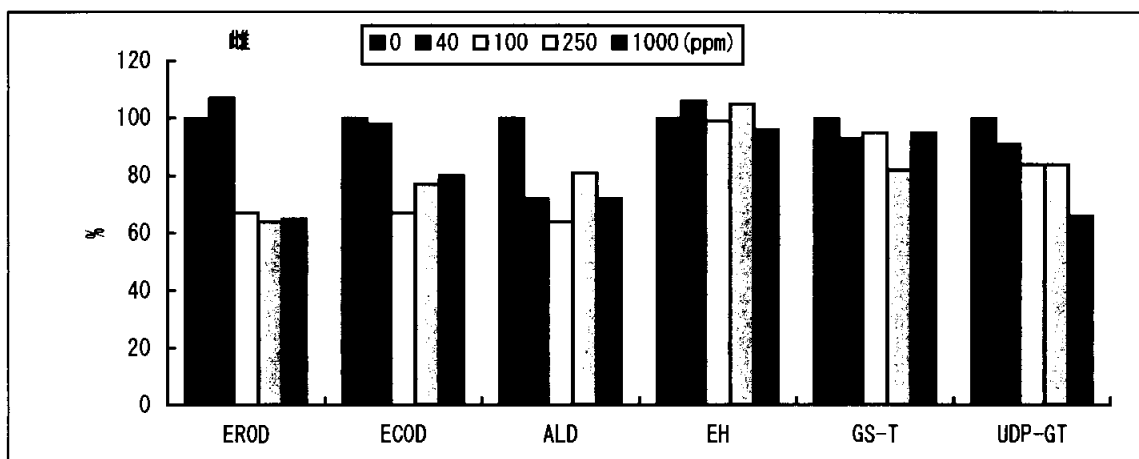
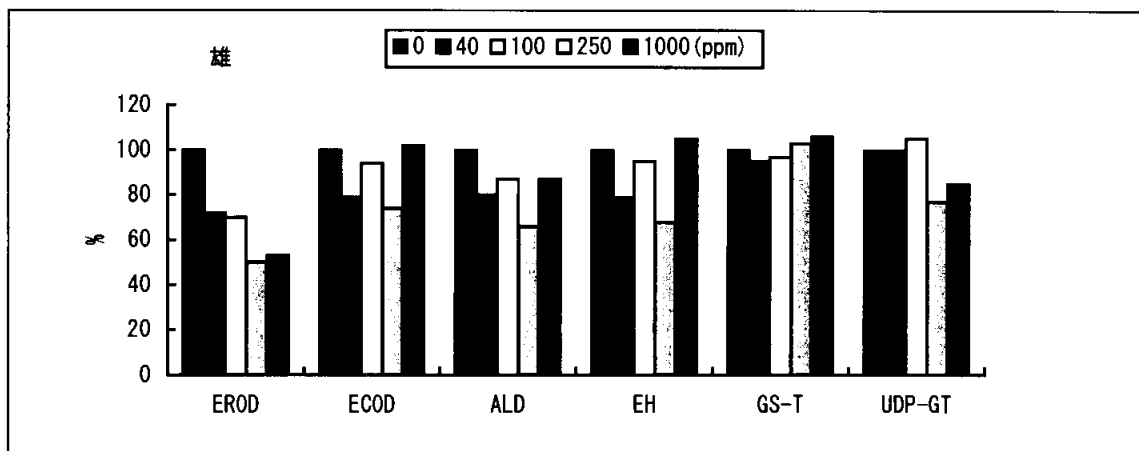
52 週の試験終了時に全動物の肝臓のチトクローム P450、チトクローム P450 依存性モノオキシゲナーゼ酵素 (ECOD, EROD, ALD, N-デメチラーゼ, O-デメチラーゼ), エポキシドヒドロラーゼ (EH) 及び抱合酵素 (GS-T, UDP-GT) を測定した。

250ppm と 1000ppm 群の EROD 活性は、対照群の約 50～60%にまで減少の傾向を示したが、有意差 ( $p < 0.05$ ) がみられたのは 250ppm の雄群のみであった。また、1000ppm 群雌の UDP-GT 活性は、有意差がみられなかったが減少傾向を示した。これらの変動に明らかな用量関連性は認められなかった。

その他の酵素活性に変化は認められなかった。

これらのことから、1 年間の検体投与後におけるイヌの肝酵素活性に、誘導作用は生じていないと考えられた。

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。



### 15) 病理組織学的検査

全動物を対象として、以下の臓器について病理標本を作製し、鏡検した。

脳（大脳，小脳，脳幹），脊髄（頸部，胸部，腰部），神経（視神経，坐骨神経），心臓，大動脈，気管，肺，舌，食道，胃，小腸（十二指腸，空腸，回腸），盲腸，結腸，直腸，肝臓，胆のう，膵臓，腎臓，膀胱，精巣，精巣上体，前立腺，卵巣，卵管，子宮，下垂体，甲状腺，上皮小体，副腎，脾臓，骨（胸骨，大腿骨，肋骨）、骨髓，胸腺，腸間膜リンパ節，咽頭後方リンパ節，唾液腺，皮膚，眼球，筋肉、乳腺及び肉眼的異常組織

衛星群の検査（雄のみ、26週での検査）では、1000ppm群で中心静脈周囲の肝細胞のスリガラス様細胞質変化が認められた。この肝での変化は、52週後の検査では認められなかったことから、肝の検体に対する適応反応が生じたことが窺われた。

主群の52週後の検査で観察された他の所見は、出現頻度に用量相関性はなく、またこの供試年齢のイヌの対照群でも通常認められたものであった。したがって、

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。

これらの所見は検体に起因するものではなく自然発生性のものであると考えられる。

以上の結果から、本剤のイヌに対する 52 週間飼料混入投与による慢性毒性試験における影響として、1000ppm 群では摂餌量のわずかな低下（雌）、肝臓重量の増加（26 週、雄）、肝細胞のスリガラス様細胞質変化（26 週、雄）が認められた。

従って、本試験条件下における無毒性量（NOAEL）は、250ppm（雄；8.8 mg/kg/日、雌；8.3 mg/kg/日）であると判断した。



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

主要な病理所見

項目	用量(ppm)	雄					雌				
		0	40	100	250	1000	0	40	100	250	1000
【検査数】		4(3)	4	4(3)	4	4(3)	4	4	4	4	4
副腎											
空胞化		(2)		(1)		(1)					
脾臓											
充血/うっ血		2	2	1	1		1				
胆嚢											
リンパろ胞		2	3	4(3)	4	1(1)	3	2	3	2	4
単核細胞浸潤		4(1)	4	2(1)	1	4(1)	2	4	3	3	3
腎臓											
色素沈着	程度1	2	3	2	3	1	2	2	2	2	
	程度2	2	1	2		1	2	2	2	1	
	程度3				1	2				1	4
脂肪		2	3	3	1	2	3	4	4	3	4
好塩基性尿細管						(1)					
肝臓											
色素沈着		4	4	4	4	4	4	4	4	4	3
脂肪変性			1	1	2				1	1	
スリガラス様細胞質変化						(3)					
細胞質好酸性封入体		(1)		(3)		(3)					
褐色色素/クッパー細胞											1
褐色色素/マクロファージ											1
肺											
炎症性浸潤		3(1)	3	1(2)	1	(2)				2	
マクロファージ							1		1		
下垂体											
のう胞		(3)		(3)		(3)					
前立腺											
単核細胞浸潤		1(1)				1(1)					
精巣											
精細管低形成		1				2(1)					
巨細胞		1			2	2(1)					
胃											
リンパろ胞		4(3)	4	4(3)	4	4(3)	4	3	3	3	3
円形細胞浸潤		1(1)	4	4(1)	3	4(1)	3	4	3	2	3
うっ血		1	3	1	2	3	2	2	1	2	3
子宮											
炎症性浸潤											1
胸腺											
出血		1					1				
甲状腺											
単核細胞浸潤				1							
のう胞		(2)		(1)			1				

\* : p<0.05 で有意 (χ<sup>2</sup>検定), ( ): 26 週屠殺動物の所見

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

(2) チアクロプリドのラットを用いた飼料混入投与による慢性毒性/発がん性併合試験  
(資料 No. 原体-18)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 1998年5月14日

検体の純度： 97.2～98.6%

試験動物： ウィスター系 SPF ラット

[試験開始時 5～6 週齢、体重 雄；94～141g、雌；79～113g]

主群： 1 群雌雄各 50 匹 衛星群：雌雄各 10 匹 (12 ヶ月に計画屠殺)

試験期間： 24 ヶ月 (1995年3月～1997年3月)

【試験方法】

検体を 0 (対照群)、25、50、500 及び 1000ppm となるように粉末飼料 (1% のピーナツ油添加) に混ぜ、24 ヶ月間ラットに投与した。

用量設定の根拠；

本試験における用量は、先に実施したウィスター系ラットにおける亜急性毒性試験 (資料 No. 原体-9) の試験成績に基づいて設定した。この試験では、検体を 0、25、100、400 及び 1600ppm の飼料中濃度でラットに 13 週間混餌投与した (影響の回復性を検査するため、5 週間の無処理期間を設定した追加群も含む)。この試験において、1600ppm の雌雄では体重増加抑制が認められた。400 及び 1600ppm では第 I 相及び第 II 相の肝薬物代謝酵素誘導とそれに関連した肝細胞肥大が観察された。

以上の結果から本慢性毒性試験における用量は、0、25、50、500、1000ppm を選択した。

【試験項目及び試験結果】

1) 臨床症状

動物を少なくとも 1 日 2 回 (週末と休日は 1 回) 観察し、臨床症状と異常を記録した。各個体の詳細な検査は週 1 回実施し、体表、体孔、姿勢、一般行動、呼吸及び排泄物についてもすべて記録した。

その結果、全ての用量群において、検体投与に関連した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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

## 2) 死亡率(表 1)

本検体の投与は、雌雄全用量群共に、死亡率に関して影響を示さなかった。

表 1. 死亡率 (104 週までの累積死亡数から求めた。動物数 50 匹)

投与量 (ppm)		0	25	50	500	1000
死亡率 (%)	雄	22	24	28	20	18
	雌	56	44	28	38	34

## 3) 体重(図 1, 2)

投与開始時から 13 週までは毎週、その後は 105 週まで 2 週間毎に生存動物の体重を測定した。

更に、臓器の対体重比の計算のため、計画屠殺直前に体重を測定した。

雌雄とも 50ppm 群までは体重への影響が認められなかった。雄の 500ppm 群において、第 1 から 10 週の間におよそ一時的な体重増加抑制が認められた。体重差は最大で 7%であった。雌の 500ppm 群において、発育の遅れは第 8 週に始まり、その後、第 57 から 77 週までの間に対照群との差が約 15%に達し、その他の期間では 10%以上で継続した。雄の 1000ppm 群では第 1 及び 2 週に対照群との最大体重差 12%が認められ、その後、第 6 から 12 月の間に 5%以内の差となったが、再び 9%まで差が拡大した(第 93 週)。雌の 1000ppm 群では高度の体重増加抑制が第 5 週に始まり、ほぼ一定の割合で対照群との体重差が広がり、21%にまで達した (69/71 週)。

約 10%の体重増加抑制をひとつの MTD 基準に定義した場合、最高用量群の雄では基準を満たしており、500 及び 1000ppm 群の雌では基準を超えていることが示唆された。

[申請者追記]500ppm 群雄 (25. 2mg/kg/日) でみられた第 1 週の体重増加抑制 (対照群との比較↓94) と 143 頁の摂餌量減少(対照群との比較↓90)は、一週間毎の測定であることと軽微な変化であることから単回投与による急性毒性影響とは考えなかった。

↓ : p<0. 01 (ANOVA+Dunnnett 検定)

∨ : p<0. 01 (Kruskal-Wallis+Steel 検定)

図1 体重(雄)

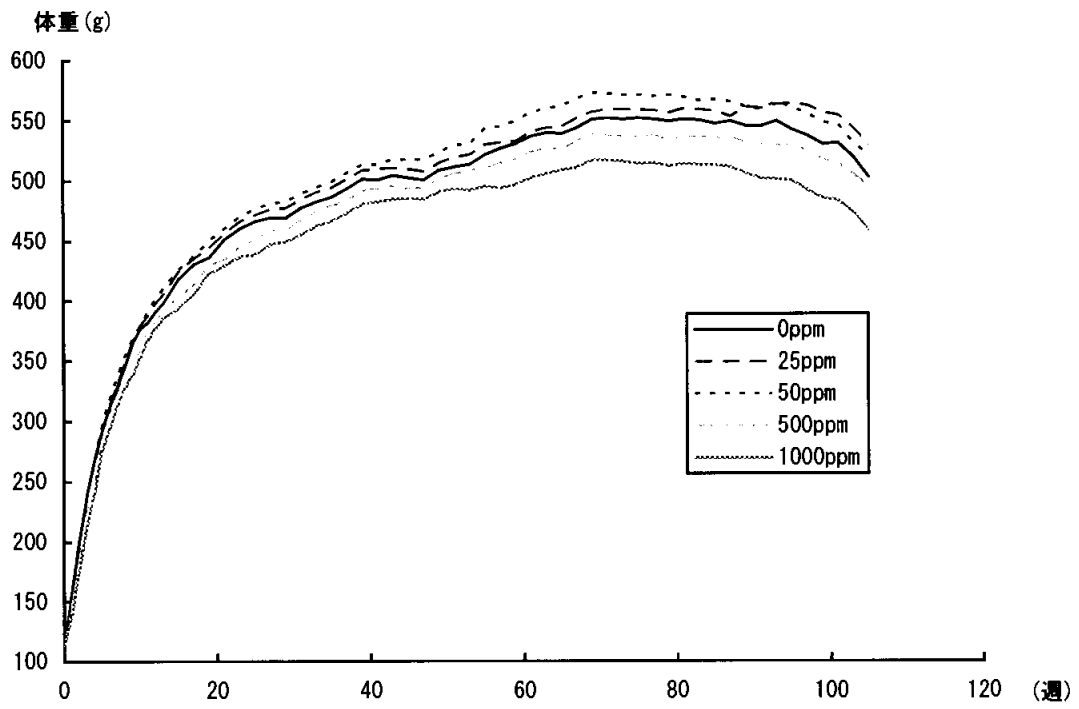
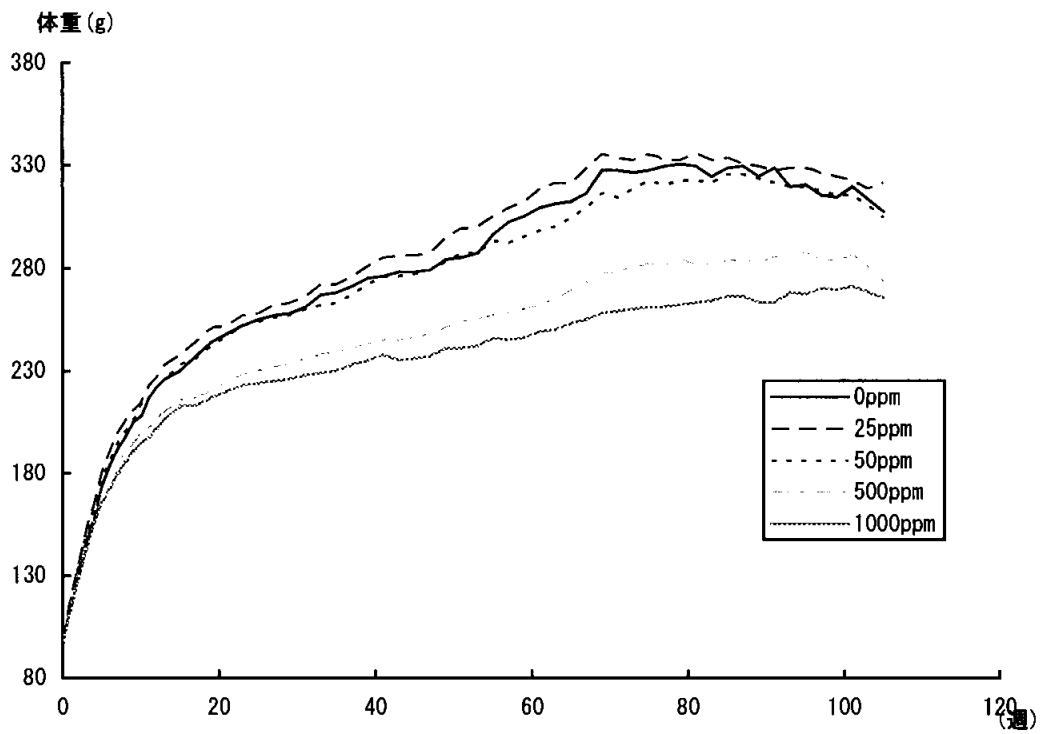


図2 体重(雌)



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。

#### 4) 摂餌量及び検体摂取量 (表 2)

摂餌量を全例について個体毎に 13 週まで週 1 回の間隔で、その後は 4 週間に 1 回の間隔で測定し、これを基に検体摂取量を算定した。

25 及び 50ppm 群雌雄については、摂餌量に影響は認められなかった。500 及び 1000ppm 群において、雄では、主に試験開始後の早い時期にしばしば摂餌量が有意に(しかし全体的にはわずかに)減少した。雌では、試験開始 10~85 週に 10~20% 程度の減少が有意にみられた。

全体的な検体摂取量は、設定用量間差とほぼ一致するものであった。

表 2. 検体摂取量 (mg/kg/日)

投与量 (ppm)		25	50	500	1000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	1.2	2.5	25.2	51.7
	雌	1.6	3.3	33.5	69.1

#### 5) 飲水量

飲水量を全例について個体毎に 13 週まで週 1 回の間隔で、その後は 4 週間に 1 回の間隔で測定した。

飲水量に毒性学的に意味のある影響は認められなかった。

#### 6) 検査

下記に示す日程で検査を行った。

表 3 検査日程

検査	動物数 /群/性 <sup>*)</sup>	実施週			
血液一般検査	10	26/29	53	78	105
血液生化学的検査	10	26	53	78	105
尿検査	10	25	52	77	104
肝臓サンプル/ 薬物代謝酵素測定	5/10 <sup>*</sup>		54/55		
眼科学的検査	全例 <sup>**</sup>	0	52/53		103/105

\*: 0 及び 25ppm では雌雄各 10 匹、50、500 及び 1000ppm では雌雄各 5 匹

\*\* : 試験開始前及び 2 年後の最終剖検前では全例、投与開始 1 年では、0 及び 1000ppm 群全例 (最終屠殺動物)

6-1) 血液学的検査 (表 4)

非絶食、エーテル麻酔下の動物の眼窩静脈叢から採取した末梢血において、白血球百分率、赤血球形態、赤血球数、白血球数、ヘモグロビン量(HB)、ヘマトクリット値(HCT)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球色素濃度(MCHC)、平均赤血球容積(MCV)、血小板数(THRO)及びトロンボプラスチン時間(HQUICK)を測定又は算定した。

いくつかの検査値で対照群との間に有意差が認められたが、その差はごくわずかなものであり、また、投与用量及び時間との関連性がないことから、毒性学的な関連はないと判断された。

表 4 血液学的検査 (有意差の認められた項目)

検査時期	26/29 週				53 週				78 週				105 週			
	25	50	500	1000	25	50	500	1000	25	50	500	1000	25	50	500	1000
<b>雄</b>																
白血球							↑131									
MCV				↓95												
MCHC				↑103			↑102									
白血球百分率/ LYM / SEGM				↓96											↓69	
<b>雌</b>																
赤血球		↑110	↑110													
白血球									↓68	↓65	↓75	↓68				↑159
HB		↑109	↑109													
HCT		↑110	↑111													
MCV													↑107			
MCHC				↓98											↓96	
THRO		↑131	↑125	↑132				↑126								
白血球百分率/MONO	↓13															

↑ ↓ : p<0.05, ↑ ↓ : p<0.01 (ANOVA+Dunnett 検定)

表中の数値は、対照群に対する変動率 (%)

6-2) 血液生化学的検査 (表 5)

以下の項目について測定した。

アルカリホスファターゼ (APh), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ASAT), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALAT), γ-グルタミルトランスフェラーゼ (GGT), グルコース (GLU), ビリルビン (BIL), 総蛋白 (PROT), 尿素 (UREA), クレアチニン (CRE), コレステロール (CHOL), トリグリセリド (TG), アルブミン (ALB), クロリド (CL), カルシウム (Ca), カリウム (K), ナトリウム (Na), 無機リン (P), トリヨードチロニン (T3), チロキシン (T4), チロキシン結合能 (TBC), 甲状

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。

腺刺激ホルモン(TSH)、アルブミン/グロブリン比(ALB/GLOB)

なおこれら項目のうち、グルコースは無麻酔下、非絶食の動物の尾静脈から採血し除蛋白処理した全血を用い測定した。その他の項目の測定には、エーテル麻酔下で、非絶食のラットの後部眼窩静脈叢から採血した末梢血の血漿を用いて行った。

最高用量群において、ASAT(雄)、A<sub>Ph</sub>(雄)、ビリルビン(雄)の減少、トリグリセリドの減少(雌)、コレステロールの増加(雌雄)及び総蛋白の僅かな増加(雌雄)等が有意に、且つ散在してみられた。500ppm群では、ビリルビンの減少(雄)、トリグリセリドの減少(雌)等がそれぞれ有意にみられた。これらの項目において、明らかな用量関連性や経時的に一貫した推移を示す変動あるいは他の血液生化学的検査所見との関連性を示唆する変動は認められなかった。しかし、高用量群において認められた有意な変動は、著しい肝薬物代謝酵素の誘導もみられていることから、その影響も否定できないと考えられる。

他の項目についても対照群と比較して、わずかではあるが有意な差が認められた。これらの値と対照群との差はごくわずかなものであり、投与用量及び時間との関連性がないことから、毒性学的な関連はないと判断された。

血液中電解質濃度においては、検体に関連する影響は認められなかった。対照群と比較して有意な差を示す値が散発的に認められた。しかし、これらは用量依存性は認められず、個体値は生物学的正常範囲内であることから、毒性学的な関連はないと判断した。

T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>及びTSHのホルモン及びTBCを測定した結果、全測定時期において、有意ではないがわずかなTSH濃度の増加が1000ppm群の雄で認められた。これは、第26週以後、幾分高値を示す少数の個体によって影響がより明確となった。この時期のTSHは500ppm群の雄の数例でも増加していた。一方雌では、TSH値は1000ppm群で第26及び105週に有意に増加した。

その他の測定結果からは検体投与に関連した影響は認められなかった。

#### [申請者追記]

甲状腺ホルモンについては直近の背景対照データを用いて分析し直し、以下の変動を投与による変化と判断した。日周性リズムを考慮して背景対照データの2s-範囲内の変動であれば投与に関連した変化とは考えなかった。

- ・ TSH : 1000ppm群雌で増加傾向

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（有意差の認められた項目）

検査時期	26週				53週				78週				105週			
投与量 (ppm)	25	50	500	1000	25	50	500	1000	25	50	500	1000	25	50	500	1000
<b>雄</b>																
ASAT								↓73								
Aph								↓79								
CHOL				↑131												
CREA	↑116			↑118												
BILI			↓73	↓80			↓78	↓78			↓75	↓75				↓67
PROT				↑107									↑105			
Na						↓99	↓99	↓99			↑101					
K		↑113	↑115	↑113												↓91
CL							↑103									
Ca		↓96	↓95	↓97												
P								↑113								
TBC			↓88													↑112
<b>雌</b>																
CHOL				↑130												
TRIGL							↓46	↓46								↓52
CREA					↓92	↓90										
UREA	↓83		↓85	↓83		↓83	↓76				↓83					
PROT																↑107
ALB		↑109														
ALB/GLOB																↓83
Na			↓99		↓99		↓99			↓99		↓99		↑101	↑101	↑101
K		↑125	↑118													
CL	↑103		↑103	↑103												
Ca		↓95	↓94	↓97		↓96										
P									↓72		↓81	↓79				
T4			↓74			↑150										
TBC											↑115	↑115		↓89		
TSH		↑175		↑226					↓45		↓54					↑235

↑ ↓ : p<0.05, ↑ ↓ : p<0.01 (ANOVA+Dunnett 検定)

表中の数値は、対照群に対する変動率 (%)

### 6-3) 尿検査 (表6)

各動物とも血液採取前後数日に、16時間蓄尿した。尿採取に先立ってラットには20mL/kg体重の水を投与した。サンプリング中は、給水のみ行い、給餌しなかった。潜血、ビリルビン、糖、ケトン体、pH、蛋白、沈渣、ウロビリノーゲンを半定量的に、比重、尿量、蛋白質、カルシウム(Ca)、カリウム(K)、ナトリウム



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。

(Na)、リン(P)を定量的に測定した。また、蛋白質及び電解質については、尿中の総排泄量を計算した(濃度×尿量)。

半定量的に測定した潜血、ビリルビン、糖、蛋白質、ウロビリノーゲン及びケトン体濃度、さらに pH についても、特筆すべき所見は認められなかった。尿沈渣では雌雄いずれにも異常は観察されなかった。

定量的尿検査では、検体に関連した腎臓における悪影響は検出されなかった。少数例(部分的には有意)で認められた変動は、排泄された尿量がわずかに異なることから容易に説明できると考えられた。(申請者註)雌における K あるいは Ca の低下は、対照群の尿量が少なかったため、相対的に対照群の濃度が上昇したものと考えられた。この傾向は、有意差が認められなかった P においても同様であった。

表 6 尿検査 (有意差の認められた項目)

検査時期	25 週				52 週				77 週				104 週			
	25	50	500	1000	25	50	500	1000	25	50	500	1000	25	50	500	1000
投与量 (ppm)																
雌																
比重										↓ 99				↓ 99	↓ 99	↓ 99
K							↓ 59							↓ 68	↓ 64	↓ 62
Ca									↓ 70		↓ 49		↓ 76	↓ 54	↓ 65	↓ 48
総排泄量																
K								↓ 62								
Ca								↓ 52				↓ 38				

↑ ↓ : p<0.05, ↑ ↓ : p<0.01 (ANOVA+Dunnett 検定)  
表中の数値は、対照群に対する変動率 (%)

#### 6-4) 肝臓ホモジネートを用いた薬物代謝酵素測定(表 7)

肝臓ホモジネートを用い、以下の項目について測定した。

チトクローム P450 依存モノオキシゲナーゼとして 7-エトキシマリンデエチラーゼ (ECOD), 7-エトキシレゾルフィンデエチラーゼ (EROD), アルドリンエポキシダーゼ (ALD), 第二相酵素としてエポキシドヒドロラーゼ (EH), グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GS-T), UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ (UDP-GT)

肝臓ホモジネートの酵素測定により、測定したすべての薬物代謝酵素 (EROD を除く) 誘導が雌雄で確認された。

雄では ECOD、ALD 及び EH に用量依存性 (50ppm 以上) の有意な誘導が認められ、1000ppm 群ではそれぞれ 4 倍、2 倍、2 倍の増加が認められた。

第 II 相薬物代謝酵素の GS-T は 500 及び 1000ppm 群で、UDP-GT は 1000ppm 群で、

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。

それぞれ有意な誘導が認められた(1000ppm 群ではそれぞれ 1.5 倍程度)。25ppm 群では、いずれの項目にも有意な増加は認められなかった。

雌でも同様の酵素誘導は認められた。ECOD は 50ppm 以上の群で、ALD は 500 及び 1000ppm 群において有意に誘導され、1000ppm 群では ECOD が 3.7 倍、ALD が 2.3 倍に増加した。EH の誘導は、雄に比べてより著しいものであり、その活性は 1000ppm 群で 2.9 倍に増加し、50ppm 以上の用量群で統計学的有意差が認められた。第Ⅱ相薬物代謝酵素の GS-T 活性は、500ppm 以上の群で増加 (1.3~1.6 倍) した。また UDP-GT 活性は、1000ppm 群で 1.5 倍に増加した。

これらの測定結果から、最も鋭敏に誘導された酵素は、雄では ECOD、雌では ECOD 及び EH であった。

以上のことから、検体は 25ppm では酵素誘導作用がないと結論した。

表 7 肝薬物代謝酵素の測定 (有意差の認められた項目)

性別	雄				雌			
	25	50	500	1000	25	50	500	1000
ECOD		↑ 148	↑ 257	↑ 414		↑ 132	↑ 226	↑ 374
ALD		↑ 148		↑ 186			↑ 212	↑ 231
EH			↑ 131	↑ 221		↑ 142	↑ 250	↑ 288
GS-T			↑ 140	↑ 156			↑ 132	↑ 155
UDP-GT				↑ 148				↑ 160

↑ ↓ : p<0.05, ↑ ↓ : p<0.01 (Student t 検定)

表中の数値は、対照群に対する変動率 (%)

#### 6-5) 眼科学的検査

表 3 に示した日程で眼検査を行った。

試験開始後 1 年の時点での眼検査では、1000ppm 群で検体に関連した眼病変は認められなかった。

試験終了時では、雌雄に水晶体の変化(水晶体皮質水腫性裂隙, 水晶体皮質あるいは核の混濁)が認められた。水晶体の両所見は老齢ラットにおいて様々な程度で自然発生することが知られている。

これら水晶体における皮質/核の変化の出現頻度には、雄では用量依存性の分布が認められなかった(17-31-37-23-23%)ため、検体に関連した影響であるとは考えられなかった(次頁表参照)。雌では水晶体における皮質/核の変化の発生頻度は 2-15-13-18-32%であった。対照群における発生頻度が非常に低いのは比較的生存率が低かったことにも影響を受けていると推察される。また 500ppm までの群で用量相関性がなかったため、投与の影響があったとは考えられなかった。しかし、1000ppm 雌群については、この群で特に脊髄及び坐骨神経における病理

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。

組織学的変化の発生頻度が増加していたことから、同様に検体投与の影響(過剰投与による加齢の促進)が考えられた。

表 8 眼科学的検査 (最終屠殺時の水晶体における皮質/核の変化の出現頻度)

性	雄					雌				
	用量(ppm)	0	25	50	500	1000	0	25	50	500
検査眼数	78	74	76	80	86	46	55	72	65	66
出現数	13	23	28	18	20	1	8	9	12	21
出現頻度	17%	31%	37%	23%	23%	2%	15%	13%	18%	32%

角膜混濁及び血管新生等の他の眼所見は、用量に依存していなかった。

眼底あるいは瞳孔反射の観察において、特筆すべき所見は認められなかった。

7)臓器重量 (表 9)

試験 1 年における中間屠殺例及び試験最終屠殺例の脳、肝臓、脾臓、心臓、腎臓 (両側)、副腎 (両側)、卵巣 (両側) 及び精巣 (両側) の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

中間屠殺時において、1000ppm 群の雌で肝臓対体重比が有意に増加した。この用量では雄においても肝臓重量が増加する傾向が認められた (有意差なし)。

最終屠殺時において、1000ppm 群の雄では肝臓実重量及び対体重比が、1000ppm 群の雌では対体重比が有意に高値であった。

表 9 臓器重量 (有意差の認められた項目)

性別	雄								雌										
	1 年				2 年				1 年				2 年						
	投与量	25	50	500	1000	25	50	500	1000	25	50	500	1000	25	50	500	1000		
体 重									↓91	↑118							↓91	↓85	
脳	実重量																		
	対体重比								↑109								↑109	↑117	
副 腎	実重量													↓74					
	対体重比													↓70					
心 臓	実重量								↓91						↓90	↓78	↓79		
	対体重比									↓90				↓85	↓85				
肝 臓	実重量								↑119										
	対体重比								↑131			↑116						↑116	
腎 臓	実重量																		
	対体重比													↓86					

↑ ↓ : p<0.05, ↑ ↓ : p<0.01 (ANOVA+Dunnnett 検定), 表中の数値は対照群に対する変動率(%)

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

その他の実重量あるいは対体重比におけるいくつかの対照群との差は、用量と関連せず、偶発的に観察された。これらの値は主に体重増加の抑制を反映しているものと考えられるため、検体が直接これらの臓器に影響を与えたとはみなさなかった。

## 8) 剖検

途中死亡動物、中間計画屠殺動物（1年）及び最終計画屠殺動物の全動物を剖検した。

### 8-1) 中間計画屠殺動物

投与に起因すると考えられる肉眼所見は認められなかった。

### 8-2) 最終計画屠殺動物及び途中死亡動物（表10）

肉眼的病理検査によって、肝臓では1000ppm群の雄において“変色域”、500ppm群以上の雌では“のう胞”の発生頻度が明らかに増加した。甲状腺では500ppm群以上の雄で“肥大”及び“結節”の発生頻度が対照群に比べて増加した。子宮では1000ppm群で“結節”の発生頻度が増加した。また眼では500ppm群以上の雌で混濁がわずかに増加した。

これらの所見は、検体に起因する影響を窺わせるものと思われた。

表10 主要な剖検所見

投与量 (ppm)		0	25	50	500	1000	0	25	50	500	1000
		雄					雌				
肝	検査数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	変色域	2	2	1	1	7	1	4	1	3	3
	のう胞	3	3	3	3	4	4	1	3	9	9
甲状腺	検査数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	肥大	2	0	0	4	4	0	0	1	1	0
	結節	0	0	0	1	3	0	0	2	0	0
子宮	検査数						50	50	50	50	50
	結節						14	6	11	16	22
眼	検査数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	混濁	1	4	5	1	2	0	1	2	4	4

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) 病理組織学的検査 (表 11~16)

以下の臓器について病理標本を作製した。なお骨組織(大腿骨, 胸骨及び脊椎の入った脊椎)はまず脱灰した後、他のすべての臓器と同様にヘマトキシリン及びエオジン(H&E)で染色した。ホルマリン固定した肝臓から作製した凍結切片は Oil Red O (ORO)で染色した。その他の特殊染色法または免疫組織学的方法は、主として主群の腫瘍性病変の診断の目的で、いくつかの例について実施した。

副腎, 大動脈, 脳(大脳, 小脳, 橋/延髄), 盲腸, 大腸, 十二指腸, 精巣上体, 食道, 眼, 涙腺, 大腿骨(骨髄及び膝関節を含む), ハーダー氏腺, 心臓, 回腸, 空腸, 腎臓, 肝臓, 肺, リンパ節(顎下及び腸間膜), 乳腺, 視神経, 卵巣(卵管を含む), 膵臓, 下垂体, 前立腺, 直腸, 唾液腺, 坐骨神経, 精嚢(凝固腺を含む), 骨格筋, 皮膚(乳腺部分), 脊髄(頸部, 胸部, 腰部), 脾臓, 胸骨(骨髄を含む), 胃(前胃及び腺胃), 精巣, 胸腺(存在した場合), 甲状腺(上皮小体を含む), 舌, 気管, 膀胱, 子宮(頸部を含む), 膣, 肉眼的異常部位

これら病理標本のうち、以下の様に病理組織学的検査を行った。

最終計画屠殺動物; 上記臓器について全用量群で行った。

途中屠殺動物; 対照群及び 1000ppm 群では上記臓器について行った。25、50 及び 500ppm 群については、肺, 肝臓, 腎臓, 心臓, 甲状腺, 上皮小体, 食道, 気管, 全肉眼的病変部位について行った。

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

9-1) 中間計画屠殺動物の非腫瘍性病変 (表 11, 17)

12 ヶ月中間屠殺例についての病理組織学的検査の結果、いくつかの臓器及び組織において病理学的変化が記録された。検体投与に関連した変化は 500 及び 1000ppm 群の肝臓及び甲状腺での変化であり、以下に示すとおりであった。

500 及び 1000ppm 群のほぼすべての動物の肝細胞において肥大が認められた。この所見は薬物代謝酵素誘導の際に適応現象として生じることが知られている。雄においては限局性脂肪浸潤が付随して観察された。

コロイド変性の増加を伴う甲状腺ろ胞上皮細胞の肥大が、500 及び 1000ppm 群の雄と 1000ppm 群の雌で観察された。

子宮の腺過形成が 500 及び 1000ppm 群で統計学的な有意差を伴わないもののわずかな増加を示した。この病変は生理学的な退縮の過程で生じる自然発生的な所見を示し、また子宮内膜炎や間質ポリープによる反応性変化として生じる可能性がある。しかしこの所見は投与によるホルモンの不均衡が影響している可能性も否定できないと考えられた。

本系統、同週齢のラットの通常的环境下においてみられる変性性及び炎症性変化も観察された。各用量群における所見の種類、数及び分布からは、検体に関連した影響は認められなかった。

表 11 非腫瘍性病変 (中間屠殺例)

臓器/所見	投与量性	0	25	50	500	1000	0	25	50	500	1000
		雄					雌				
<b>肝臓</b>	検査数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
肝細胞肥大		§0	0	0	5+	9++	§0	0	0	5+	8++
限局性脂肪浸潤		§0	0	0	5+	7++	0	1	2	0	0
<b>甲状腺</b>	検査数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
ろ胞上皮細胞肥大		§1	1	1	7+	8++	#0	0	0	0	4+
コロイド変性		§3	5	3	10++	10++	§1	1	1	1	8++
<b>子宮</b>	検査数	-	-	-	-	-	10	10	10	10	10
腺過形成		-	-	-	-	-	1	0	2	4	4
子宮内膜炎		-	-	-	-	-	1	0	0	3	0
拡張		-	-	-	-	-	1	0	1	3	2
粘液化の増加/子宮頸部		-	-	-	-	-	0	1	1	0	0

傾向検定 [Armitage-Cochran] : #; p<0.05, §; p<0.01, 群間比較 (Fisher 検定) : +; p<0.05, ++; p<0.01

9-2) 死亡/切迫屠殺動物と最終計画屠殺動物の非腫瘍性病変 (表 12, 17)

最終屠殺例及び途中死亡/切迫屠殺例の臓器及び組織を病理組織学的に検査した結果、投与との関連が疑われる非腫瘍性所見がいくつか観察された。

a) 神経系及び骨格筋

脊髄神経根のコレステロール裂の発生頻度が 1000ppm 群雌で増加した。また、神経根神経症の雌における発生頻度はわずかに (500ppm 群)、または有意に (1000ppm 群) 増加した。本所見の程度はほとんどの例で軽微から非常に軽度であり、程度の差に用量関連性は認められなかった。坐骨神経の変性が 500ppm 群以上の雌雄で増加した。骨格筋の萎縮は 500ppm 群以上の雌において有意に増加し、変性及び単球浸潤は 1000ppm 群において有意に増加した。

これらの所見は無処理のラットにも認められ、場合によっては同程度の強度であった。このような所見は 12 ヶ月後の途中計画殺動物においても過去のラットにおける試験、とりわけ、より高濃度を用いた神経毒性試験で 1600ppm の用量 (資料 No. 原体-15) においても観察されなかった事実から、これらの影響は自然発生的な加齢病変であり、検体そのものが神経毒性を引き起こす可能性はないと考えられる。また、これらの影響は肝臓の代謝能力への負荷、肝臓への著しい形態学的変化及び強い体重抑制を引き起こす用量範囲で認められたため、高用量に特有の現象と考えられた。

b) 眼

雌において、網膜の萎縮が 50ppm 群以上で、水晶体線維の変性 (白内障) が 500ppm 群以上で増加した。

c) 肝臓

50ppm 群以上の雄及び 500ppm 群以上の雌において肝細胞の細胞質変化 (細胞質は均一な好酸性ですり硝子状変化を含む) 及び主として小葉中心性肝細胞肥大が観察された。肝細胞空胞化の発生頻度は 1000ppm 群の雄で増加し、巣状壊死及び胆管のう胞が 500ppm 群以上の雌でわずかに増加した。混合型好酸性/明細胞性変異肝細胞巣は 50ppm 群以上の雄及び 1000ppm 群の雌において有意に増加した。好塩基性変異肝細胞巣の発生頻度は 500ppm 群以上の雌雄で、明細胞性変異肝細胞巣の発生頻度は 500ppm 群以上の雌で減少した。これらの減少は、摂餌量の減少に伴う体重増加抑制の影響に加え、検体投与による薬物代謝第 II 相酵素特に GST の機能 (解毒機能) 亢進に起因した抑制作用も関与しているものと考えられた。

d) 甲状腺

50ppm 群以上の雄と 500ppm 群以上の雌において、甲状腺ろ胞上皮細胞肥大が有意に増加した。ろ胞上皮のコロイド変性及び色素沈着が 500ppm 群以上の雌雄で有意に増加した。

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。

その他いくつかの所見に、特に高用量と対照群との発生頻度の差が認められたが、体重あるいは摂餌量の減少に関係していると考えられ、毒性の評価においてこれらは重要な変化ではないと判断された。



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

表 12 主な非腫瘍性病変 (主群)

臓器/所見	投与量 性	0	25	50	500	1000	0	25	50	500	1000
		雄					雌				
脊髄	検査数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
神経根神経症		33	35	43	39	33	#31	32	32	37	39+
コレステロール裂		9	11	8	14	11	\$ 3	4	8	4	13++
坐骨神経	検査数	50	50	49	48	49	48	50	50	49	50
変性		\$ 24	28	26	37++	34+	\$ 20	18	19	28	36++
眼	検査数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
網膜萎縮		17	21	19	19	25	\$ 15	20	24+	25+	32++
水晶体変性		21	27	22	21	22	\$ 9	18	16	20++	30++
肝臓	検査数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
胆管のう胞		3	3	0	5	3	6	3	3	10	9
細胞質変化 <sup>注)</sup>		\$ 0	0	8++	41++	47++	\$ 0	1	0	30++	34++
小葉中心性肝細胞肥大		\$ 0	0	12++	44++	49++	\$ 0	1	0	30++	36++
好酸性-明細胞性混合型 変異肝細胞巣		\$ 1	2	5+	15++	22++	\$ 2	1	3	6	10++
好塩基性変異肝細胞巣		\$ 16	9	9	6	7	\$ 19	19	19	6	2
明細胞性変異肝細胞巣		33	34	33	36	33	\$ 15	14	15	7	4
壊死		7	4	1	2	2	9	3	6	12	15
空胞化		\$ 8	14	8	12	24++	6	7	4	3	4
腸間膜リンパ節	検査数	50	50	48	49	50	49	50	49	50	48
洞内組織球症		8	5	9	7	13	\$ 12	10	14	19	25++
下垂体	検査数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
コレステロール裂		\$ 0	1	2	4+	4+	0	0	0	0	0
甲状腺	検査数	50	50	50	50	49	50	50	50	50	48
ろ胞細胞過形成		1	2	2	6	3	#0	0	1	1	3+
ろ胞上皮細胞肥大		\$ 12	10	22+	27++	34++	\$ 6	2	6	16++	23++
コロイド変性		\$ 17	16	21	37++	41++	\$ 6	2	5	17++	28++
色素沈着		\$ 16	11	23	30++	32++	\$ 0	0	2	4+	4+
卵巣	検査数						50	49	50	48	50
のう胞							#16	15	19	22	24
乳腺	検査数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
乳腺のう胞		1	3	4	1	1	18	15	10	12	6
乳腺症		0	0	0	0	0	3	3	4	2	0
骨格筋	検査数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
萎縮		19	19	16	20	25	\$ 6	3	5	14+	20++
変性		9	14	16	14	14	\$ 9	5	10	10	18+
単細胞浸潤		5	5	7	1	7	#0	1	2	2	4+

傾向検定 [Armitage-Cochran] : #; p<0.05, \$ ; p<0.01, 群間比較 (Fisher 検定) : +; p<0.05, ++; p<0.01

注) [申請者追記] 細胞質は均一な好酸性ですり硝子状変化を含む。

9-3) 中間計画屠殺動物の腫瘍性病変 (表 13)

以下の腫瘍性病変が認められたが、甲状腺 (雄) を除き検体投与に関連した所見とは考えられなかった。(申請者追記)甲状腺ろ胞細胞腺腫は、1000ppm 群で1例 (雄) のみに認められたが、最終解剖時においてはその出現頻度が増加していることから、検体投与との関連を完全に否定することはできないと考えられる。

表 13 腫瘍性病変 (中間屠殺例)

臓器/所見	投与量 性	0	25	50	500	1000	0	25	50	500	1000
		雄					雌				
甲状腺	検査数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
ろ胞細胞腺腫 (b)		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
C-細胞腺腫 (b)		0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
肝臓	検査数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
肝細胞腺腫 (b)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
下垂体	検査数	10	0	0	0	10	10	1	1	1	10
腺腫 (b)		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
乳腺	検査数	-	-	-	-	-	10	1	1	0	10
冬眼腫 (b)		-	-	-	-	-	0	1	0	0	0
子宮	検査数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
間質ポリープ (b)		-	-	-	-	-	0	0	1	1	0
顆粒細胞腫 (b)		-	-	-	-	-	0	0	1	0	0

9-4) 死亡/切迫屠殺動物と最終屠殺動物の腫瘍性病変 (表 15~16, 18)

腫瘍は組織型、良悪性、部位について分類した。

500 及び 1000ppm 群の雄において、甲状腺ろ胞細胞腺腫が有意に、用量依存性に増加した。この腫瘍の発生頻度は 1000ppm 群の雌においてもわずかに増加した。前述のように途中計画殺においても 500 及び 1000ppm 群の雄及び 1000ppm 群の雌で甲状腺ろ胞上皮細胞の肥大が観察され、1000ppm 群の雄の 1 例にはろ胞細胞腺腫が認められている。また、最終解剖においては、非腫瘍性病変として 50ppm 群以上の雄及び 500ppm 群以上の雌でろ胞上皮細胞の肥大の発生頻度が有意に増加し、500ppm 群以上の雌雄ではろ胞上皮細胞のコロイド変性及び色素沈着が有意に増加した。これは、肝臓の薬物代謝酵素誘導に伴う甲状腺機能の亢進に続発する病変として、しばしばラットにおいて観察されることが知られている。特に UDP-GT の誘導は循環血中の甲状腺ホルモンを減少させ、TSH の増加の結果、慢性的な甲状腺機能亢進症を引き起こすことが知られている。末梢血中の甲状腺ホルモン T3 及び T4 を測定したところ、注目すべき変化は認められなかった。このことは、本試験において認められた甲状腺ホルモンの分解は甲状腺活性の増加によって相殺されていることが窺われる。また、雄 (500 及び 1000ppm 群) 及び雌

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。

(1000ppm 群)で何度か観察された TSH 濃度の増加によっても証明することができる。

従って、ろ胞細胞腺腫は、高用量群における肝臓への影響特に UDP-GT の誘導に伴う甲状腺ホルモンの代謝分解が亢進し、次いで甲状腺が刺激されたことにより発現したものであり、検体の甲状腺ホルモン合成に対する直接的な作用ではないことが推察された。

500ppm 群以上における子宮腺癌の発生頻度は対照群及び低用量群に比べて著しく増加した (下表参照)。

表 18-7 から抜粋 子宮の腫瘍性病変

性別	雌				
	0	25	50	500	1000
投与量 (ppm)	0	25	50	500	1000
所見\検査動物数	50	50	50	50	50
<b>子宮</b>					
間質ポリープ(B)	11	11	11	7	9
腺上皮ポリープ(B)	0	1	0	0	1
腺腫(B)	0	0	1	1	2
腺癌(M)	§ 6	3	3	14+	18++
扁平細胞癌(M)	2	0	0	1	0
混合ミューラー腫(M)	0	0	0	1	1
扁平上皮/腺癌(M)	0	0	0	1	2
間質肉腫(M)	1	1	1	0	0
神経鞘腫(M)	0	0	2	0	0
顆粒細胞腫(B)	0	0	0	0	1

(M) : 悪性腫瘍 (B) : 良性腫瘍

§ : Peto 法  $p < 0.01$ , 群間比較 (Fisher 検定) : +;  $p < 0.05$ , ++;  $p < 0.01$

表 14 子宮内膜 (被覆上皮及び腺上皮細胞) における細胞増殖活性

投与量 (ppm)	被覆上皮		腺上皮	
	平均 (%)	SD (%)	平均 (%)	SD (%)
0	48.53	15.66	31.01	13.43
25	39.74	15.82	19.06	13.27
50	53.02	18.82	31.20	11.31
500	45.86	18.87	25.16	15.66
1000	55.74	15.89	23.47	13.41

[申請者追記]-

その後に実施したメカニズム試験 (資料 No. 原体-18-1~18-8) から、ラットにおける子宮腺癌発生は、検体が卵胞 (第一標的) に影響を及ぼし、卵胞から分泌されるステロイド性ホルモンに影響し、その結果血中のプロゲステロンとエストラジオー

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。

ルの濃度が変化し、これらのホルモンの変化は、若齢成獣では発情周期に影響することはなく正常な周期を保てるが、老齢成獣では一般的な加齢に伴う卵巣ホルモン分泌の変化が生じているところに高用量の検体投与によってさらにそれが増幅され、やがて子宮が変化し、最終的には腫瘍が増加したと考えられた。

上記の腫瘍以外の全ての腫瘍は各群とも同程度の発生頻度であり、またそれらの発生頻度は、本系統のラットを用いて以前に行われた実験と同程度であった。

表 15 に発性腫瘍の数及びそれらの発生した動物の数を総括した。

1000ppm 群の雄において、1つ以上の腫瘍が発生した動物数がわずかに増加したが、これは甲状腺ろ胞細胞腺腫の発生頻度が増加したことによると考えられた。雌では悪性腫瘍の転移が認められる動物が増加したが、これは子宮腺癌の発生頻度が高かったためと考えられた。

表 15 腫瘍数及び腫瘍を有する動物数

投与量 (ppm)	雄					雌				
	0	25	50	500	1000	0	25	50	500	1000
腫瘍を有する動物数	32	30	31	33	37	42	37	41	41	42
1つ以上の原発性腫瘍を有する動物数	14	9	8	11	19	20	17	13	22	18
複数の腫瘍を有する動物数	2	1	1	1	2	6	1	4	11	13
原発性腫瘍数*	56	42	42	47	61	70	63	62	72	73
良性腫瘍数*	44	35	37	37	52	53	54	51	50	43
悪性腫瘍数*	12	7	5	10	9	17	9	11	22	30

\*対の臓器での両側に腫瘍ある場合は、この表では2つとして計算している。

表 16 には、自然死あるいは切迫殺動物における腫瘍の経時的発生状況を示した。この表からもみられるように、検体に関係した影響は認められなかった。

表 16 腫瘍を有する動物の経時的発生数

投与量 (ppm)	雄					雌					
	0	25	50	500	1000	0	25	50	500	1000	
期間	雄					雌					
週	0 - 52	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0
	53 - 65	0	1	0	0	0	1	0	2	0	0
	66 - 78	0	0	0	0	2	6	4	6	2	4
	79 - 91	3	4	3	4	0	14	11	5	9	4
	92 - 104	5	4	10	1	2	13	14	7	14	12
	105 - 屠殺	0	0	2	2	3	1	7	7	3	2

\*対の臓器での両側に腫瘍ある場合は、この表では2つとして計算している。

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。

以上の結果から、本剤のラットに対する 24 カ月間飼料混入投与による慢性毒性／発がん性併合試験における影響として、1000ppm 群では体重増加抑制（雌雄）、摂餌量の低下（雌雄）、ASAT 及び APh の減少（雄）、コレステロールの僅かな増加（雌雄）、トリグリセリドの僅かな減少（雌）、ビリルビンの減少（雄）、総蛋白の増加（雌雄）、TSH の増加（雌）、薬物代謝酵素誘導（雌雄）、眼（水晶体における皮質/核の変化：雌）や神経系（坐骨神経の変性：雌雄）での病変の増加、肝重量の増加（雌雄）、肝細胞肥大の増加（雌雄）、甲状腺の肥大／結節や子宮結節の増加、腫瘍（甲状腺ろ胞細胞腺腫：雄、子宮腫瘍）の増加がみられた。500ppm 群では、体重増加抑制（雌雄）、摂餌量の低下（雌雄）、ビリルビンの減少（雄）、トリグリセリドの僅かな減少（雌）、薬物代謝酵素誘導（雌雄）、肝細胞肥大の増加（雌雄）、甲状腺の腫大／結節の増加、腫瘍（甲状腺ろ胞細胞腺腫：雄、子宮腫瘍）の増加がみられた。また、50ppm 群では、薬物代謝酵素誘導（雌雄）がみられたのみであった。

したがって、本試験条件下における無毒性量（NOAEL）は、25ppm（雄：1.2mg/kg/日、雌：1.6mg/kg/日\*）であると判断した。

---

\*:申請者註 報告書では雌群の無毒性量を 50ppm としているが、同群では僅かながら肝薬物代謝酵素の誘導が認められていることから、雌の無毒性量を 25ppm とした。

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 17-1 主要な非腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄					雌				
	投与群 (ppm)	0	25	50	500	1000	0	25	50	500	1000
	所見\検査動物数										
1年	甲状腺	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	ろ胞上皮細胞肥大	1	1	1	7+	8++	0	0	0	0	4+
	コロイド変性	3	5	3	10++	10++	1	1	1	1	8+
	肝臓	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	肝細胞肥大	0	0	0	5+	9++	0	0	0	5+	8++
	限局性脂肪浸潤	0	0	0	5+	7++	0	1	2	0	0
死 亡・ 切 迫 殺	脊髄	12	12	14	11	10	30	25	16	20	18
	神経根神経症	8	7	12	9	8	15	11	8	11	10
	コレステロール裂	0	0	1	3	4	0	1	1	1	2
	坐骨神経	12	12	14	9	9	28	25	16	20	18
	変性	2	2	4	5	5	4	6	3	8	7
	眼	12	12	14	11	10	30	25	16	20	18
	網膜萎縮	2	3	3	2	3	8	8	5	5	9
	水晶体変性	3	4	10	7	4	1	9	1	5	9
	肝臓	12	12	14	11	10	30	25	16	20	18
	胆管のう胞	0	0	0	0	0	5	2	0	1	2
	細胞質変化	0	0	1	2	7	0	1	0	4	5
	肝細胞肥大/小葉中心	0	0	1	5	9	0	1	0	5	6
	好酸性・明細胞性混合型 変異肝細胞巣	0	0	1	2	2	0	0	1	0	1
	好塩基性変異肝細胞巣	2	0	1	0	1	2	2	2	1	0
	明細胞性変異肝細胞巣	2	3	6	4	3	3	3	3	1	0
	壊死	4	2	0	1	1	7	1	4	10	11
	空胞化	5	7	3	2	3	5	6	3	1	3
	腸間膜リンパ節	12	12	12	10	10	29	25	15	20	16
	洞内組織球症	2	4	3	4	3	9	6	5	6	3
	下垂体	12	12	14	11	10	30	25	16	20	18
	コレステロール裂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	甲状腺	12	12	14	11	9	30	25	16	20	17
	ろ胞細胞過形成	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
	ろ胞上皮細胞肥大	1	0	4	2	3	2	1	1	5	5
	コロイド変性	2	3	5	5	6	2	1	1	4	3
	色素沈着	1	1	4	2	0	0	0	2	4	3
卵巣	/	/	/	/	/	30	24	16	18	18	
のう胞	/	/	/	/	/	7	5	6	8	7	
乳腺	12	12	14	11	10	30	25	16	20	18	
乳腺のう胞	0	0	2	0	0	8	9	4	3	1	
乳腺症	0	0	0	0	0	2	3	1	0	0	

傾向検定[Armitage-Cochran] : #; p<0.05, §; p<0.01, 群間比較(Fisher 検定) : +; p<0.05, ++; p<0.01

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 17-2 主要な非腫瘍性病変

検査時期	性別	雄					雌				
	投与群 (ppm)	0	25	50	500	1000	0	25	50	500	1000
死亡切迫殺	所見\検査動物数										
死亡切迫殺	骨格筋	12	12	14	11	10	30	25	16	20	18
	萎縮	4	3	2	4	2	1	1	0	5	4
	変性	0	2	5	0	2	5	5	3	4	6
	単核細胞浸潤	0	2	2	0	1	0	1	0	1	0
最	脊髓	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32
	神経根神経症	25	28	31	30	25	16	21	24	26	29
	コレステロール裂	9	11	7	11	7	3	3	7	3	11
	坐骨神経	38	38	35	39	40	20	25	34	29	32
	変性	22	26	22	32	29	16	12	16	20	29
	眼	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32
	網膜萎縮	15	18	16	17	22	7	12	19	20	23
	水晶体変性	18	23	12	14	18	8	9	15	15	21
	肝臓	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32
	胆管のう胞	3	3	0	5	3	1	1	3	9	7
終	細胞質変化	0	0	7	39	40	0	0	0	26	29
	肝細胞肥大/小葉中心性	0	0	11	39	40	0	0	0	25	30
	好酸性・明細胞性混合型変異肝細胞巢	1	2	4	13	20	2	1	2	6	9
	好塩基性変異肝細胞巢	14	9	8	6	6	17	17	17	5	2
屠	明細胞性変異肝細胞巢	31	31	27	32	30	12	11	12	6	4
	壊死	3	2	1	1	1	2	2	2	2	4
	空胞化	3	7	5	10	21	1	1	1	2	1
	腸間膜リンパ節	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32
殺	洞内組織球症	6	1	6	3	10	3	4	9	13	22
	下垂体	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32
	コレステロール裂	0	1	2	4	4	0	0	0	0	0
	甲状腺	38	38	36	39	40	20	25	34	30	31
	ろ胞細胞過形成	1	2	1	6	2	0	0	1	1	3
	ろ胞上皮細胞肥大	11	10	18	25	31	4	1	5	11	18
	コロイド変性	15	13	16	32	35	4	1	4	13	25
	色素沈着	15	10	19	28	32	0	0	0	0	1
	卵巣	/	/	/	/	/	20	25	34	30	32
	のう胞	/	/	/	/	/	9	10	13	14	17
	乳腺	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32
	乳腺のう胞	1	3	2	1	1	10	6	6	9	5
	乳腺症	0	0	0	0	0	1	0	3	2	0
	骨格筋	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32
萎縮	15	16	14	16	23	5	2	5	9	16	
変性	9	12	11	14	12	4	0	7	6	12	
単核細胞浸潤	5	3	5	1	6	0	0	2	1	4	

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 17-3 主要な非腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄					雌				
	投与群 (ppm)	0	25	50	500	1000	0	25	50	500	1000
	所見\検査動物数										
全 動 物 / 主 群	脊髄	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	神経根神経症	33	35	43	39	33	#31	32	32	37	39++
	コレステロール裂	9	11	8	14	11	§3	4	8	4	13++
	坐骨神経	50	50	49	48	49	48	50	50	49	50
	変性	§24	28	26	37++	34+	§20	18	19	28	36++
	眼	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	網膜萎縮	17	21	19	19	25	§15	20	24+	25+	32++
	水晶体変性	21	27	22	21	22	§9	18+	16	20+	30++
	肝臓	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	胆管のう胞	3	3	0	5	3	6	3	3	10	9
	細胞質変化	§0	0	8++	41++	47++	§0	1	0	30++	34++
	肝細胞肥大/小葉中心性	§0	0	12++	44++	49++	§0	1	0	30++	36++
	好酸性・明細胞性 混合型変異肝細胞巣	§1	2	5+	15++	22++	§2	1	3	6	10+
	好塩基性変異肝細胞巣	§16	9	9	6	7	§19	19	19	6	2
	明細胞性変異肝細胞巣	33	34	33	36	33	§15	14	15	7	4
	壊死	7	4	1	2	2	9	3	6	12	15
	空胞化	§8	14	8	12	24++	6	7	4	3	4
	腸間膜リンパ節	50	50	48	49	50	49	50	49	50	48
	洞内組織球症	8	5	9	7	13	§12	10	14	19	25++
	下垂体	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	コレステロール裂	§0	1	2	4+	4+	0	0	0	0	0
	甲状腺	50	50	50	50	49	50	50	50	50	48
	ろ胞細胞過形成	1	2	2	6	3	#0	0	1	1	3+
	ろ胞上皮細胞肥大	§12	10	22+	27++	34++	§6	2	6	16++	23++
	コロイド変性	§17	16	21	37++	41++	§6	2	5	17++	28++
	色素沈着	§16	11	23	30++	32++	§0	0	2	4	4
	卵巣	/	/	/	/	/	50	49	50	48	50
	のう胞	/	/	/	/	/	#16	15	19	22	24
乳腺	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
乳腺のう胞	1	3	4	1	1	18	15	10	12	6	
乳腺症	0	0	0	0	0	3	3	4	2	0	
骨格筋	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
萎縮	19	19	16	20	25	§6	3	5	14+	20++	
変性	9	14	16	14	14	§9	5	10	10	18+	
単核細胞浸潤	5	5	7	1	7	#0	1	2	2	4+	

傾向検定[Armitage-Cochran] : #; p<0.05, §; p<0.01, 群間比較(Fisher 検定) : +; p<0.05, ++; p<0.01



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 18-1 腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄					雌				
	投与群 (ppm)	0	25	50	500	1000	0	25	50	500	1000
1年	所見\検査動物数										
	甲状腺	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	ろ胞細胞腺腫(B)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	C-細胞腺腫(B)	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
	肝臓	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	肝細胞腺腫(B)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	下垂体	10	0	0	0	10	10	1	1	1	10
	腺腫(B)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	乳腺	/	/	/	/	/	10	1	1	0	10
	冬眠腫(B)	/	/	/	/	/	0	1	0	0	0
	子宮	/	/	/	/	/	10	10	10	10	10
間質ポリープ	/	/	/	/	/	0	0	1	1	0	
顆粒細胞腫(b)	/	/	/	/	/	0	0	1	0	0	
死 亡 切 迫 殺	大脳	12	12	14	11	10	30	25	16	20	18
	星状膠細胞腫(B)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	星状膠細胞腫(M)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	脊髄	12	12	14	11	10	30	25	16	20	18
	星状膠細胞腫(B)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	心臓	12	12	14	11	10	30	25	16	20	18
	心房中皮腫(M)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	胃	12	12	14	11	10	30	25	16	20	18
	扁平上皮乳頭腫(B)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	空腸	10	11	12	10	8	28	21	16	16	15
	平滑筋腫(B)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	肝臓	12	12	14	11	10	30	25	16	20	18
	肝細胞腺腫(B)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	肝細胞癌(M)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	脾臓	12	11	14	11	10	28	25	16	20	18
	腺房細胞腺腫(B)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	腎臓	12	12	14	11	10	30	25	16	20	18
	脂肪肉腫(M)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	精巣	12	12	14	10	10	/	/	/	/	/
	間質細胞腺腫(B)	0	0	1	0	0	/	/	/	/	/
	卵巣	/	/	/	/	/	30	24	16	18	18
	莢膜細胞腫(B)	/	/	/	/	/	1	0	0	0	0
	莢膜細胞腫(M)	/	/	/	/	/	0	0	1	0	0
	子宮	/	/	/	/	/	30	25	16	20	18
	間質ポリープ(B)	/	/	/	/	/	5	6	5	0	3
	腺上皮ポリープ(B)	/	/	/	/	/	0	1	0	0	0
	腺腫(B)	/	/	/	/	/	0	0	1	0	0
腺癌(M)	/	/	/	/	/	4	2	1	11	9	
扁平細胞癌(M)	/	/	/	/	/	2	0	0	0	0	
混合ミューラ腫(M)	/	/	/	/	/	0	0	0	0	1	
扁平上皮/腺癌(M)	/	/	/	/	/	0	0	0	1	1	
間質肉腫(M)	/	/	/	/	/	1	0	0	0	0	
神経鞘腫(M)	/	/	/	/	/	0	0	1	0	0	

M ; 悪性腫瘍, B ; 良性腫瘍

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 18-2 腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄					雌				
	投与群 (ppm)	0	25	50	500	1000	0	25	50	500	1000
	所見\検査動物数										
死 亡 切 迫 殺	腫	/	/	/	/	/	30	25	16	19	15
	扁平上皮細胞癌 (M)	/	/	/	/	/	0	1	0	0	0
	顆粒細胞腫 (B)	/	/	/	/	/	0	0	0	2	0
	陰核腺	/	/	/	/	/	1	1	0	0	1
	扁平上皮細胞癌 (M)	/	/	/	/	/	1	0	0	0	0
	下垂体	12	12	14	11	10	30	25	16	20	18
	前葉腺腫 (B)	1	2	4	0	1	11	12	7	5	3
	前葉癌 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	甲状腺	12	12	14	11	9	30	25	16	20	17
	C-細胞腺腫 (B)	2	0	0	0	0	1	2	1	0	0
	ろ胞細胞腺腫 (B)	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	上皮小体	12	12	12	9	7	10	11	9	9	7
	腺腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	副腎	12	12	14	11	10	30	25	16	20	17
	皮質腺腫 (B)	1	0	2	0	0	0	1	0	0	0
	髓質腫瘍 (B)	0	3	3	2	1	1	2	0	2	0
	髓質腫瘍 (M)	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	全身性腫瘍	0	3	0	0	0	1	2	0	0	3
	組織球肉腫 (M)	0	2	0	0	0	0	2	0	0	2
	白血病 (M) n. o. s.	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
	リンパ腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	脾臓	12	12	14	10	10	30	25	16	20	18
	血管肉腫 (M)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	胸腺	11	12	13	9	8	27	25	13	16	15
	胸腺腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	神経鞘腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	リンパ節	1	2	0	0	0	6	1	3	4	6
	血管腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	腸間膜リンパ節	12	12	12	10	10	29	25	15	20	16
	血管腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	唾液腺	12	12	14	11	10	30	25	16	20	18
	神経鞘腫 (M)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	乳腺	12	12	14	11	10	30	25	16	20	18
	線維腺腫 (B)	0	0	0	0	0	4	4	1	2	1
	腺癌 (M)	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
	腺腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
	皮膚	12	12	14	11	10	30	25	16	20	18
	角化棘細胞腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	脂肪腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	線維性組織球腫 (M)	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
神経鞘腫 (M)	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	

M ; 悪性腫瘍, B ; 良性腫瘍

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 18-3 腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄					雌				
	投与群 (ppm)	0	25	50	500	1000	0	25	50	500	1000
	所見\検査動物数										
死亡 ・ 切迫 殺	骨格筋	12	12	14	11	10	30	25	16	20	18
	脂肪肉腫 (M)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	線維性組織球腫 (M)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	耳*	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	線維腫 (B)	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	体腔*	0	4	0	0	1	4	2	2	11	10
最 終 屠 殺	中皮腫 (M)	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
	脂肪肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	大脳	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32
	星状膠細胞腫 (B)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	星状膠細胞腫 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	髄膜腫 (B)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	顆粒細胞腫 (B)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	小脳	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32
	顆粒細胞腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	脳幹	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32
	星状膠細胞腫 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	心臓	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32
	心房中皮腫 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	神経鞘腫 (M)	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	肺	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32
	細気管支肺胞腺腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	細気管支肺胞癌 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	胃	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32
	扁平上皮乳頭腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	盲腸	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32
	平滑筋肉腫 (M)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	空腸	38	38	35	38	40	20	25	34	30	32
	平滑筋腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	肝臓	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32
	肝細胞腺腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
	胆管腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	脾臓	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32
	腺房細胞腺腫 (B)	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
ラ氏島腺腫 (B)	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	
腎臓	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32	
脂肪腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	

M ; 悪性腫瘍, B ; 良性腫瘍

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 18-4 腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄					雌				
	投与群 (ppm)	0	25	50	500	1000	0	25	50	500	1000
	所見\検査動物数										
最 終 屠 殺	膀胱	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32
	移行上皮細胞乳頭腫(B)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	精巣	38	38	36	39	40	/	/	/	/	/
	間質細胞腺腫(B)	4	1	1	2	5	/	/	/	/	/
	精巣上体	38	38	36	39	40	/	/	/	/	/
	中皮腫(B)	1	1	0	0	0	/	/	/	/	/
	包皮腺	1	0	0	1	0	/	/	/	/	/
	腺癌(M)	1	0	0	0	0	/	/	/	/	/
	腺腫(B)	0	0	0	1	0	/	/	/	/	/
	卵巢	/	/	/	/	/	20	25	34	30	32
	管状間質腺腫(B)	/	/	/	/	/	0	0	0	1	1
	顆粒細胞腫(M)	/	/	/	/	/	0	0	0	0	1
	黄体腫(B)	/	/	/	/	/	1	0	0	0	0
	莢膜細胞腫(B)	/	/	/	/	/	1	0	0	0	0
	莢膜細胞腫(M)	/	/	/	/	/	0	0	0	0	1
	子宮	/	/	/	/	/	20	25	34	30	32
	間質ポリープ(B)	/	/	/	/	/	6	5	6	7	6
	腺上皮ポリープ(B)	/	/	/	/	/	0	0	0	0	1
	腺腫(B)	/	/	/	/	/	0	0	0	1	2
	腺癌(M)	/	/	/	/	/	2	1	2	3	9
扁平細胞癌(M)	/	/	/	/	/	0	0	0	1	0	
混合ミューラー腫(M)	/	/	/	/	/	0	0	0	1	0	
扁平上皮/腺癌(M)	/	/	/	/	/	0	0	0	0	1	
間質肉腫(M)	/	/	/	/	/	0	1	1	0	0	
神経鞘腫(M)	/	/	/	/	/	0	0	1	0	0	
顆粒細胞腫(B)	/	/	/	/	/	0	0	0	0	1	
下垂体	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32	
前葉腺腫(B)	6	10	7	7	13	8	5	11	13	11	
中葉腺腫(B)	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	
甲状腺	38	38	36	39	40	20	25	34	30	31	
C-細胞腺腫(B)	8	4	0	8	9	6	4	6	5	3	
ろ胞細胞腺腫(B)	0	0	1	4	7	0	1	1	1	2	
C-細胞癌(M)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
上皮小体	38	38	36	38	40	20	25	30	28	30	
腺腫(B)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	

M; 悪性腫瘍, B; 良性腫瘍

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 18-5 腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄					雌				
	投与群 (ppm)	0	25	50	500	1000	0	25	50	500	1000
	所見\検査動物数										
最 終 屠 殺	副腎	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32
	皮質腺腫 (B)	0	1	0	1	2	1	1	0	0	0
	髓質腫瘍 (B)	11	6	11	4	4	1	1	0	2	1
	髓質腫瘍 (M)	1	1	0	1	2	0	0	0	0	1
	全身性腫瘍	2	0	1	1	0	0	0	0	2	0
	組織球肉腫 (M)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	リンパ腫 (M)	2	0	1	0	0	0	0	0	2	0
	脾臓	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32
	血管肉腫 (M)	1	1	0	2	3	1	0	0	0	0
	胸腺	38	38	36	39	40	19	25	34	30	31
	胸腺腫 (B)	1	0	1	0	0	0	2	0	2	1
	腸間膜リンパ節	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32
	血管腫 (B)	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0
	ハーダ氏腺	0	0	0	0	0	20	25	34	30	32
	神経鞘腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	乳腺	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32
	線維腺腫 (B)	0	1	0	0	0	3	3	3	4	2
	腺癌 (M)	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2
	腺腫 (B)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
	皮膚	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32
線維腫 (B)	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	
線維肉腫 (M)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
角化棘細胞腫 (B)	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	
脂肪腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
眼	38	38	36	39	40	20	25	34	30	32	
ぶどう膜黒色腫 (M)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
四肢*	5	1	5	6	7	3	4	0	2	1	
骨腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
全 動 物 ・ 主 群	大脳	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	星状膠細胞腫 (B)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	星状膠細胞腫 (M)	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	髄膜腫 (B)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	顆粒細胞腫 (B)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	小脳	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	顆粒細胞腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
脳幹	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
星状膠細胞腫 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

\*通常の検査臓器/組織ではない

M ; 悪性腫瘍, B ; 良性腫瘍

傾向検定[Peto法]; #: p<0.05, §: p<0.01, 群間比較(Fisher検定):+;p<0.05, ++;p<0.01

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 18-6 腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄					雌				
	投与群 (ppm)	0	25	50	500	1000	0	25	50	500	1000
所見\検査動物数											
全 動 物 主 群	脊髄	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	星状膠細胞腫 (B)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	心臓	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	心房中皮腫 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	神経鞘腫 (M)	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	肺	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	細気管支肺胞腺腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	細気管支肺胞癌 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	胃	50	50	50	49	50	50	50	50	50	50
	扁平上皮乳頭腫 (B)	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
	盲腸	47	49	47	48	49	50	46	49	48	48
	平滑筋肉腫 (M)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	空腸	48	49	47	48	48	48	46	50	46	47
	平滑筋腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
	肝臓	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	肝細胞腺腫 (B)	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0
	肝細胞癌 (M)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	胆管腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	膵臓	50	49	50	49	50	48	50	50	50	50
	腺房細胞腺腫 (B)	1	0	0	1	0	0	2	0	0	0
	ラ氏島腺腫 (B)	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
	腎臓	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	脂肪腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	脂肪肉腫 (M)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	膀胱	50	50	50	49	50	50	50	50	50	50
	移行上皮細胞乳頭腫 (B)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	精巣	50	50	50	49	50	/	/	/	/	/
	間質細胞腺腫 (B)	4	1	2	2	5	/	/	/	/	/
精巣上体	50	50	50	49	50	/	/	/	/	/	
中皮腫 (B)	1	1	0	0	0	/	/	/	/	/	
包皮腺	1	0	0	1	0	/	/	/	/	/	
腺癌 (M)	1	0	0	0	0	/	/	/	/	/	
腺腫 (B)	0	0	0	1	0	/	/	/	/	/	

M ; 悪性腫瘍, B ; 良性腫瘍

傾向検定[Peto 法]; #; p<0.05, §: p<0.01, 群間比較(Fisher 検定):+;p<0.05, ++;p<0.01

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 18-7 腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄					雌				
	投与群(ppm)	0	25	50	500	1000	0	25	50	500	1000
	所見\検査動物数										
全 動 物 ・ 主 群	卵巣	/	/	/	/	/	50	49	50	48	50
	管状間質腺腫(B)	/	/	/	/	/	0	0	0	1	1
	顆粒細胞腫(M)	/	/	/	/	/	0	0	0	0	1
	黄体腫(B)	/	/	/	/	/	1	0	0	0	0
	莢膜細胞腫(B)	/	/	/	/	/	2	0	0	0	0
	莢膜細胞腫(M)	/	/	/	/	/	0	0	1	0	1
	子宮	/	/	/	/	/	50	50	50	50	50
	間質ポリープ(B)	/	/	/	/	/	11	11	11	7	9
	腺上皮ポリープ(B)	/	/	/	/	/	0	1	0	0	1
	腺腫(B)	/	/	/	/	/	0	0	1	1	2
	腺癌(M)	/	/	/	/	/	§6	3	3	14+	18++
	扁平細胞癌(M)	/	/	/	/	/	2	0	0	1	0
	混合ミューラ腫(M)	/	/	/	/	/	0	0	0	1	1
	扁平上皮/腺癌(M)	/	/	/	/	/	0	0	0	1	2
	間質肉腫(M)	/	/	/	/	/	1	1	1	0	0
	神経鞘腫(M)	/	/	/	/	/	0	0	2	0	0
	顆粒細胞腫(B)	/	/	/	/	/	0	0	0	0	1
	膣	/	/	/	/	/	50	50	50	49	47
	扁平上皮細胞癌(M)	/	/	/	/	/	0	1	0	0	0
	顆粒細胞腫(B)	/	/	/	/	/	0	0	0	2	0
	陰核腺	/	/	/	/	/	1	1	0	0	1
	扁平上皮細胞癌(M)	/	/	/	/	/	1	0	0	0	0
	下垂体	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	前葉腺腫(B)	7	12	11	7	14	19	17	18	18	14
	中葉腺腫(B)	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0
	前葉癌(M)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	甲状腺	50	50	50	50	49	50	50	50	50	48
	C-細胞腺腫(B)	10	4	0	8	9	7	6	7	5	3
	ろ胞細胞腺腫(B)	§0	0	1	5+	8++	0	1	1	1	2
	C-細胞癌(M)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
上皮小体	50	50	48	47	47	48	49	45	47	47	
腺腫(B)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
副腎	50	50	50	50	50	50	50	50	50	49	
皮質腺腫(B)	1	1	2	1	2	1	2	0	0	0	
髓質腫瘍(B)	11	9	14	6	5	2	3	0	4	1	
髓質腫瘍(M)	2	1	0	1	2	1	0	0	0	1	
全身性腫瘍	2	3	1	1	0	1	2	0	2	3	
組織球肉腫(M)	0	2	0	1	0	0	2	0	0	2	
白血病(M) n. o. s.	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	
リンパ腫(M)	2	0	1	0	0	0	0	0	2	1	

n. o. s. ; 鑑別診断せず

M ; 悪性腫瘍, B ; 良性腫瘍

傾向検定[Peto法]; #: p<0.05, §: p<0.01, 群間比較(Fisher定): +; p<0.05, ++; p<0.01

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 18-8 腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄					雌				
	投与群 (ppm)	0	25	50	500	1000	0	25	50	500	1000
	所見\検査動物数										
全 動 物 ・ 主 群	脾臓	50	50	50	49	50	50	50	50	50	50
	血管肉腫 (M)	1	1	0	3	3	1	0	0	0	0
	胸腺	49	50	49	48	48	46	50	47	46	46
	胸腺腫 (B)	1	0	1	0	0	0	2	0	2	1
	胸腺腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	神経鞘腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	リンパ節*	1	2	1	0	0	6	1	3	4	6
	血管腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	腸間膜リンパ節	50	50	48	49	50	49	50	49	50	48
	血管腫 (B)	0	1	1	1	1	0	0	2	1	0
	ハーダ氏腺	50	50	50	50	50	50	50	49	50	50
	神経鞘腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	唾液腺	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	神経鞘腫 (M)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	乳腺	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	線維腺腫 (B)	0	1	0	0	0	7	7	4	6	3
	腺癌 (M)	0	0	0	0	0	2	1	1	0	2
	腺腫 (B)	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
	皮膚	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	線維腫 (B)	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	線維肉腫 (M)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	角化棘細胞腫 (B)	0	0	0	1	2	0	0	1	0	0
	脂肪腫 (B)	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	線維性組織球腫 (M)	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	神経鞘腫 (M)	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	骨格筋	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	脂肪肉腫 (M)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	線維性組織球腫 (M)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	眼	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	ふどう膜黒色腫 (M)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	耳*	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	線維腫 (B)	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
体腔*	0	4	1	0	1	5	2	2	12	16	
中皮腫 (M)	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	
脂肪肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
四肢*	5	2	5	6	7	3	4	0	2	1	
骨腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	

\*通常の検査臓器/組織ではない

M; 悪性腫瘍, B; 良性腫瘍

傾向検定[Peto 法]; #: p<0.05, §: p<0.01, 群間比較 (Fisher 検定): +; p<0.05, ++; p<0.01



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。

チアクロプリドの H295R 細胞を用いた *in vitro* 系でのステロイド性ホルモン分泌への影響

(資料No. 原体-18-1)

試験機関：

報告書作成年月日： 2010 年 1 月 13 日

検体の純度 : 98.7%

試験系 : H295R 細胞 (ヒト副腎がん由来)

### 【目的】

H295R 細胞はヒト副腎がん由来し、ステロイド性ホルモン(例えばプロゲステロン、テストステロン、エストラジオール)の生合成に必要な主要酵素をすべて有している。本試験の目的は、ラット子宮腺癌の作用機序の解明に供するため、検体が H295R 細胞のステロイド性ホルモン産生に及ぼす影響を調べることである。このため、さまざまな濃度の検体を 24 あるいは 48 時間細胞に暴露させ、培地中に分泌されたステロイド性ホルモンを測定した。

### 【試験方法】

#### 試験用量設定の理由及び対照物質

試験用量は細胞毒性測定結果および細胞形態評価結果に基づいて設定した。検体の細胞毒性は 500  $\mu$ M および 1mM の濃度で 48 時間処理した後、XTT (2,3-ビス(2-メトキシ-4-ニトロ-5-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム-5-カルボキサニリド)法を用いて細胞毒性を評価した。処理条件は本試験と同一とした。陽性対照物質として、H295R 細胞のステロイド性ホルモン分泌を刺激する物質ではフォルスコリン、H295R 細胞のステロイド性ホルモン分泌を抑制する物質としてケトコナゾールを用いた。溶媒には DMSO (1%)を用いた。

#### 培養条件

H295R 細胞を  $3 \times 10^6$  個の密度で 24 ウェルプレートに接種し約 22 時間培養後、交換した培地に各濃度の検体を添加して 48 時間処理した。化合物、濃度および処理時間の各条件につき、4 個のウェルを用いた。処理期間中、細胞は 37°C、5%CO<sub>2</sub>の環境に維持した。その後、培地/ウェルのアリコート 3 個を採取してホルモン濃度の分析を行うまで約-80°Cで冷凍保存した。

## ホルモン分析

各ウェルから得た培地について、特異的ラジオイムノアッセイキットを用いてプロゲステロン、テストステロンおよびエストラジオールの濃度を測定した。

### 【結果及び考察】

#### 1. 細胞毒性

500  $\mu$ M の処理では細胞毒性は観察されなかった。1mM で処理では、生存率が 87% で、細胞の形態にわずかな変化が認められた。本試験では 50  $\mu$ M ~ 1mM で処理した。

#### 2. ホルモン濃度

24 時間処理では、プロゲステロンの分泌量が用量に関連して増加し、テストステロンの分泌量は用量に関わらず一貫性して抑制された。エストラジオールでは明確な影響は認められなかった。

48 時間処理では、プロゲステロンの分泌量には明確な影響が認められなかった。テストステロンの分泌量は用量に関連して抑制された。エストラジオール濃度は対照群の濃度が低いうえにばらつきがあったため、検体のエストラジオール分泌に及ぼす影響は解釈が困難であった。

ホルモン分泌刺激の陽性対照として用いたフォルスコリンは、24 時間処理ではプロゲステロンおよびエストラジオールの分泌量を有意に増加させたが、テストステロンの分泌量には影響を与えなかった。48 時間処理ではプロゲステロンおよびエストラジオールの分泌量が有意に増加し、テストステロンもわずかに増加した。

ホルモン分泌抑制の陽性対照として用いたケトコナゾールの 48 時間処理では、プロゲステロンおよびテストステロンの分泌が有意に抑制され、エストラジオールの分泌量はわずかに増加した。

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 1 24 時間処理

群	濃度	プロゲステロン (ng/ml)		テストステロン (ng/ml)		エストラジオール (pg/ml)	
		Mean±SD	変化%	Mean±SD	変化%	Mean±SD	変化%
溶媒対照	0	0.9±0.06		1.3±0.5		9.6±1.2	
チアクロプリド	50 μM	0.9±0.09	nc	0.7±0.2	58	7.8±0.8*	82
	100 μM	1.0±0.1*	117	0.6±0.1*	43	8.0±0.6	84
	500 μM	2.2±0.4**	252	0.5±0.2*	39	8.6±1.0	90
	1mM	2.4±0.3**	278	0.8±0.1	60	10.9±1.9	114
フォルスコリン	1 μM	2.1±0.3**	236	1.2±0.5	98	27.7±3.8**	290

nc : 対照群と比較して変化なし。\* : p≤ 0.05 \*\* : p≤ 0.01 (t-検定)

表 2 48 時間処理

群	濃度	プロゲステロン (ng/ml)		テストステロン (ng/ml)		エストラジオール (pg/ml)	
		Mean±SD	変化%	Mean±SD	変化%	Mean±SD	変化%
溶媒対照	0	3.0±1.4		2.4±0.7		5.5±3.0	
チアクロプリド	50 μM	2.5±1.53	83	1.1±0.3**	46	6.5±0.8	118
	100 μM	2.8±1.6	94	1.1±0.4**	44	6.2±0.4	113
	500 μM	3.7±2.1	123	0.8±0.2**	33	5.7±1.6	104
	1mM	2.7±0.8	90	0.8±0.1**	31	9.8±1.0**	178
フォルスコリン	1 μM	2.3±0.2*	138	3.2±0.8	114	36.3±5.1**	442
ケトコナゾール	10 μM	2.1±0.1**	49	0.03±0.03**	0.1	3.4±1.6	119

\* : p≤ 0.05 \*\* : p≤ 0.01 (t-検定)

本試験の所見の概要を以下に要約する。

1. テストステロンの分泌量が 24 及び 48 時間処理後に用量に関連して、かつ、一貫して抑制された。
2. プロゲステロンの分泌量は 24 時間処理後では有意に増加したが、48 時間処理では明確な影響は認められなかった。
3. エストラジオールの分泌量には明確な影響が認められず結果の解釈が困難であった。
4. 陽性対照は予想通りの反応を示した。すなわち、フォルスコリンは H295R 細胞を刺激しプロゲステロンおよびエストラジオールの分泌量を増加させた。一方、ケトコ

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。

ナゾールはプロゲステロンおよびテストステロンの分泌量を抑制させた。

以上のことから、検体は H295R 細胞におけるステロイド性ホルモンの分泌に影響を及ぼすことが示唆された。

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。

チアクロプリドのラット前胞状卵胞を用いた *in vitro* 系でのステロイド性ホルモン分泌への影響

(資料No. 原体-18-2)

試験機関：

報告書作成年月日：2010年1月13日

検体の純度：98.7%

試験系：ウィスター系ラット、試験開始時；7週齢

試験期間：24時間、48時間

### 【目的】

本試験の目的は、ラット子宮腺癌の作用機序の解明に供するため、その後に実施されたメカニズム試験より、検体投与により血漿中のステロイド性ホルモン濃度が変化し、老齢ラットに28日間投与すると発情周期は乱れることが判明した。ステロイド性ホルモンのプロゲステロンとエストラジオールの生合成に関与するのは卵巣（特に卵巣皮質内の卵胞）であるため、これらの結果からこのホルモン変化は卵巣機能の変化に起因すると推測された。このため、卵巣が検体の主要な標的臓器かどうかを確認するために若齢成獣から得られた卵胞に検体を処理して、ステロイド性ホルモンの分泌に及ぼす影響を調べた。

なお、この試験は2つの独立した試験から得られた結果をまとめたものである。

### 【試験方法】

#### 試験用量設定の理由及び対照物質

試験用量は H295R 細胞を用いた試験（資料 No. 原体-18-1）の結果に基づいて、50、100 および 500  $\mu$ M を設定した。参照物質として、性ホルモン分泌の刺激のために卵胞刺激ホルモン (FSH) およびフォルスコリンを用いた。溶媒には DMSO (1%) を用いた。

#### 前胞状卵胞の調整

ラットをイソフルラン吸入による深麻酔下で放血することにより屠殺し、卵巣を摘出した。卵巣は少量の DMEM/F12 培地をいれたペトリ皿に一つずつ入れて細かく切り刻み、組織を機械的に分離することにより卵胞を採取した。大きさを基に前胞状卵胞を区別した。

## 培養条件

ITS+プレミックスおよび2.5%Nu血清Iを加えたDMEM/F12培地を入れた24ウェルプレートに少なくとも4個の前胞状卵胞/ウェルを入れて、37℃、5%CO<sub>2</sub>の環境で一晩培養した後、交換した培地に各濃度の検体を添加して24時間または48時間同様の条件で培養した。

## ホルモン分析

各ウェルから得た培地について、特異的ラジオイムノアッセイキットを用いてプロゲステロン、テストステロンおよびエストラジオールの濃度を測定した。

## **【結果及び考察】**

試験1 プロゲステロンの分泌量は、24時間処理では500μMで増加した。48時間処理でも同濃度でプロゲステロンの分泌量の増加が認められた。エストラジオールの分泌量は、24時間処理ではいずれの用量でも明らかな影響は認められなかった。48時間処理では500μMでわずかに増加した。

FSHでは、プロゲステロン分泌量は24時間処理では3個のサンプルのうち1個のみでしか検出されなかった。48時間処理では増加した。エストラジオール分泌量は24時間では明らかな影響を及ぼさなかったが、48時間処理では増加した。

試験2 プロゲステロンの分泌量は、24時間および48時間処理では500μMで増加した。48時間処理の50μMでの増加は4個のサンプルのうち1個のサンプルで大きく増加したためであった。エストラジオールの分泌量は24時間および48時間処理ともに用量に関連して増加した。

フォルスコリン処理ではプロゲステロンは48時間処理で増加したが、24時間処理では4個のサンプルのうち1個のみで検出されただけであった。エストラジオールは24時間および48時間処理ともに増加し、48時間処理のほうが明らかであった。

FSHはエストラジオールの分泌量に影響を及ぼさなかったが、プロゲステロンは24および48時間ともに増加した。

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 1 試験 1

処理時間	化合物	濃度	プロゲステロン (ng/ml)		エストラジオール (pg/ml)	
			Mean±SD	変化%	Mean±SD	変化%
24 時間	溶媒対照	0	0.47±0.21		7.15±0.60	
	チアクロプリド	50 μM	0.63±0.40	134	7.02±1.44	98
		100 μM	0.47±0.29	nc	7.52±1.45	105
		500 μM	1.27±0.61	270	7.96±0.55	111
	FSH	5IU	1.20 <sup>A</sup>	255	4.85±1.94	68
48 時間	溶媒対照	0	3.66±0.65		14.08±2.32	
	チアクロプリド	500 μM	9.03±3.62	247	17.43±2.71	124
	FSH	5IU	13.48±8.41	368	32.74±12.53	233

nc : 対照群と比較して変化なし。(t-検定)

<sup>A</sup> : 3 個のサンプルのうち 1 個のみで検出された。

表 2 試験 2

処理時間	化合物	濃度	プロゲステロン (ng/ml)		エストラジオール (pg/ml)	
			Mean±SD	変化%	Mean±SD	変化%
24 時間	溶媒対照	0	0.61±0.29		8.70±0.32	
	チアクロプリド	50 μM	0.58±0.36	95	9.13±0.09*	105
		100 μM	0.48±0.16	79	9.74±0.56**	112
		500 μM	1.70±0.13**	279	10.11±0.57**	116
	FSH	5IU	1.06±0.54	174	8.68±0.71	nc
	フォルスコリン	1 μM	2.21±3.11	362	9.64±0.67*	111
48 時間	溶媒対照	0	0.34±0.04		8.83±0.64	
	チアクロプリド	50 μM	1.79±2.07	526	9.08±1.21	103
		100 μM	0.29±0.06	85	9.79±0.76	111
		500 μM	1.92±1.45	565	10.22±0.66*	116
	FSH	5IU	1.68±1.14	494	8.97±0.21	nc
	フォルスコリン	1 μM	1.72±1.76	506	11.11±2.75	126

nc : 対照群と比較して変化なし。\* : p≤ 0.05 \*\* : p≤ 0.01 (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。

本試験の所見の概要を以下に要約する。

1. 500  $\mu$ M の用量では、24 および 48 時間処理ともにプロゲステロンの明らかな増加が認められた。エストラジオール濃度も 24 時間及び 48 時間で増加した。
2. フォルスコリンはプロゲステロンおよびエストラジオールの濃度を増加させた。
3. FSH はプロゲステロン濃度は増加させたが、エストラジオール濃度に対しては一貫した明白な影響は認められなかった。

以上のように、検体 500  $\mu$ M 処理による前胞状卵胞のプロゲステロンおよびエストラジオール濃度が一貫して増加したことから、卵巣(卵胞)が検体の主要な標的臓器であり、ステロイド性ホルモンの分泌に影響を及ぼすことが示唆された。



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。

## チアクロプリドのラットを用いた子宮肥大試験

(資料No. 原体-18-3)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：2007年9月27日

検体の純度：99%

試験動物：ウィスター系ラット、1群雌7匹

試験開始時；19日齢(36.4～51.2g)

試験期間：2006年10月4日～2007年2月16日(実験開始日～実験完了日)

### 【目的】

本試験の目的は、検体が未成熟ラットの子宮を刺激する可能性を評価することである。このため、皮下注射によって検体に3日間暴露させ、子宮内液を吸い取ったあとの子宮重量を測定し、顕微鏡検査を実施した。なお、陽性対照群として、間接的な作用機序による子宮肥大反応の誘発ではアンドロステンジオンの投与群を、エストロゲン受容体の直接刺激物質による子宮肥大反応の誘発では17β-エストラジオールの投与群を設けた。

### 【投与方法】

7匹の動物からなる2つの群に検体をラッカセイオイルに懸濁させ0(対照群)、70mg/kg/日の用量で、投与液量は4ml/kgで3日間毎日皮下注射した。アンドロステンジオンあるいは17β-エストラジオールを陽性対照物質として同様に皮下注射した。さらに2つの群のうち一方には皮下注射に加えて同時に3日間にわたって、ラッカセイオイルを5ml/kgの容量で経口投与した。

細胞増殖評価のため、BrdU5-ブromo-2'-デオキシウリジン)を含む飲料水(0.8mg/mL)をボトルに入れ投与開始日の前夜から投与期間中自由に摂取させた。

最終投与24時間後に検査のため動物を屠殺した。

### 投与用量設定の根拠；

本試験の用量設定は、発がん性試験(資料No. 原体-18)の最高用量(1000ppm、69mg/kg/日)をもとにした。

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 投与群および用量

群	皮下注射 (投与量= 4 ml/kg)		経口投与 (投与量=5 ml/kg)		動物数 /群
	化合物	用量(mg/kg)	化合物	用量(mg/kg)	
1	ラッカセイオイル	0	ラッカセイオイル	0	7
2	チアクロプリド	70	ラッカセイオイル	0	7
3	17β-エストラジオール	10μg	ラッカセイオイル	0	7
4	アンドロステンジオン	30	ラッカセイオイル	0	7
5	ラッカセオイル	0	-	-	7
6	チアクロプリド	70	-	-	7
7	17β-エストラジオール	10μg	-	-	7
8	アンドロステンジオン	30	-	-	7

【試験項目及び結果】

1) 臨床症状及び死亡率

生死を少なくとも 1 日 2 回観察した。全動物について、症状の性質、発現時期、重症度、回復性および持続時間、排泄などについて 1 日 1 回以上観察した。

試験期間中に死亡例は認められなかった。

一般状態では投与による変化は認められなかった。

2) 体重

試験前日から試験 3 日まで全動物の体重を測定した。また、剖検前に測定した（最終体重）。

表 2 体重

用量 mg/kg	第 2 群 (g)			第 6 群 (g)		
	1 日後	2 日後	3 日後	1 日後	2 日後	3 日後
0	42.8	46.2	51.9	41.9	45.1	50.6
70	43.1	↓40.3	↓41.6	44.5	42.0	↓41.4

↓ : p<0.05, ↓↓ : p<0.01 (T 検定)

検体投与群の第 2 群と 6 群でそれぞれの対照群と比較して試験 2 日ないし 3 日に統計学的に有意に減少した。

他の群では体重に対照群との差は認められなかった。

### 3) ホルモン分析

採血は剖検日の午前中にイソフルラン吸入により深部麻酔した動物の腹部大動脈より行った。

プロゲステロン、テストステロンおよびエストラジオールの濃度は、リチウムヘパリン加血漿を検査試料とし、特異的ラジオイムノアッセイキットを用いて測定をした。

表3 血漿中のホルモン濃度

	化合物	用量(mg/kg)	プロゲステロン ng/ml	テストステロン ng/ml	エストラジオール pg/ml
1	対照	0	1.83(7)	0.07(1)	—
2	チアクロプリド	70	1.18(5)	0.03(1)	9.44(2)
3	17 $\beta$ -エストラジオール	10 $\mu$ g	1.73(7)	—	—
4	アンドロステンジオン	30	1.93(6)	0.84(6)	—
5	対照	0	2.76(6)	0.1(3)	10.03(1)
6	チアクロプリド	70	2.53(4)	—	—
7	17 $\beta$ -エストラジオール	10 $\mu$ g	2.72(5)	—	16.85(5)
8	アンドロステンジオン	30	1.71(7)	↑ 0.85(7)	11.06(1)

— : 検出されず、( ) 内の数値は検出された動物数。

第2~4群は第1群と比較、第6~7群は第5群と比較、 $\uparrow$   $\downarrow$  :  $p < 0.01$  (T検定)。

検体投与群では、プロゲステロンについては、得られた全サンプル(47匹)から検出できたが、投与群と対照群との間に統計学的な有意差は認められなかった。

テストステロンおよびエストラジオールについては、未成熟動物のため3種のホルモン全てを分析するのに必要な量の血液を得ることができなかったことと、多くのサンプルについて検出限界以下であったことから、結果については決定的なものではなかった。

17 $\beta$ -エストラジオールを投与した第7群の5/7匹においてエストラジオールが検出された。プロゲステロンは検出することができたが対照群との間に統計学的な有意差は認められなかった。

アンドロステンジオンを投与した第4群と第8群については低濃度のテストステロンが検出された。プロゲステロンは検出することができたが対照群との間に統計学的な有意差は認められなかった。

#### 4) 剖検

全生存動物はイソフルラン吸入による深麻酔下で放血後、全動物の臆開口を検査その後剖検した。

いずれの群にも臆開口を示す動物は認められなかった。

#### 5) 臓器重量

子宮を摘出し、脂肪や結合組織を除去後、子宮内液を吸い取り重量を測定した。また、肝臓と卵巣も摘出し、重量を測定し、それらの対体重比も算出した。

表 4 臓器重量 (有意差の認められた項目)

群	2	3	4	6	7	8
化合物	チアクロ ブリド	17β-エスト ラジオール	アンドロス テンジオン	チアクロ ブリド	17β-エスト ラジオール	アンドロス テンジオン
最終体重	↓ 78			↓ 75		
肝臓	実重量	84		↓ 81		
	対体重比					
卵巣	実重量			↓ 66		
子宮	実重量*		↑ 254	↑ 245		↑ 252
	対体重比		↑ 250	↑ 241	↑ 133	↑ 256

↑ ↓ : p<0.05、↑ ↓ : p<0.01 (DUNNETT 検定または DUNN 検定)、

表中の数値は対照群に対する変動率 (%)

\* : 子宮重量は子宮内液を吸い取って測定した重量

最終体重については、検体投与群において対照群と比較して統計学的に有意に低下した。いずれの陽性対照群においても統計学的な有意差は認められなかった。

肝臓では検体投与群の実重量が減少し、第 6 群では統計学的に有意であった。対体重比では対照群と比較して有意差がみられなかったことから、最終体重の減少によるものと考えられた。いずれの陽性対照群においても肝重量に統計学的な有意差は認められなかった。

卵巣では検体投与の第 6 群では有意に減少したが、第 2 群では対照群とほぼ同等であった。いずれの陽性対照群においても統計学的な有意差は認められなかった。

子宮では検体投与群では投与による変動は認められなかった。第 6 群の子宮の対体重比が有意に増加したが、病理組織学的検査では所見が認められなかったことか

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。

ら、生物学的に重要な変化とは考えられなかった。いずれの陽性対照群においても対照群と比較し、統計学的に有意に増加した。

#### 6) 病理組織学的検査

子宮および十二指腸を 10%中性緩衝ホルマリンで固定後、組織学的検査用切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色(H&E)を施し、病理組織学的検査を実施した。子宮については上皮細胞（内腔と腺）および内膜間質細胞について、有糸分裂（40 倍の倍率で 10 カ所の視野を観察したときの有糸分裂指数）を計測し、また、10 カ所のスライドの代表的部位について内膜上皮の高さおよび内膜の厚さを測定した。

表 5 子宮の病理所見

群		1	2	3	4	5	6	7	8
化合物		対照	チアクロ プリド	17β-エスト ラジオール	アンドロステ ンジオン	対照	チアクロ プリド	17β-エスト ラジオール	アンドロステ ンジオン
検査動物数		7	7	7	7	7	7	7	7
子宮内膜増 殖	軽微	0	0	0	4	0	0	5	5
	軽度	0	0	5	2	0	0	2	2
	中等度	0	0	2	0	0	0	0	0
	合計	0	0	7	6	0	0	7	7
間質混合細 胞浸潤	軽微	0	0	3	0	0	0	1	0
	合計	0	0	3	0	0	0	1	0
内膜上皮細 胞残屑	軽微	0	0	1	4	0	0	1	4
	軽度	0	0	4	0	0	0	4	0
	中等度	0	0	2	0	0	0	2	0
	合計	0	0	7	4	0	0	7	4

子宮において、検体投与群では投与に関連した影響は認められなかった。陽性対照群では、内膜上皮の増殖および細胞残屑が認められた。また 17β-エストラジオール投与群の動物では軽微な間質混合細胞浸潤が認められた。

表6 子宮の有糸分裂指数

群	1	2	3	4	5	6	7	8
化合物	対照	チアクロ プリド	17β-エスト ラジオール	アンドロス テ ンジオン	対照	チアクロ プリド	17β-エスト ラジオール	アンドロス テ ンジオン
検査動物数	7	7	7	7	7	7	7	7
子宮内膜間質	0.57	0.29	43.57	32.86	0.43	0.29	59	37.57
上皮細胞	0.29	0.14	33.29	56.86	0.14	0	51.86	49.43

子宮内膜間質および上皮細胞における平均有糸分裂指数については、検体投与群では投与に関連した影響は認められなかった。陽性対照群では有糸分裂指数が対照群と比較して増加した。

表7 子宮上皮の高さおよび内膜の厚さ

群	1	2	3	4	5	6	7	8
化合物	対照	チアクロ プリド	17β-エスト ラジオール	アンドロス テ ンジオン	対照	チアクロ プリド	17β-エスト ラジオール	アンドロス テ ンジオン
検査動物数	7	7	7	7	7	7	7	7
上皮の高さ	12.39	12.69	15.63	12.68	10.58	11.86	14.97	10.56
内膜の厚さ	80.96	86.70	117.93	106.40	87.29	103.58	115.99	85.31

上皮の高さおよび内膜の厚さの測定については、検体投与群では投与による影響は認められなかった。陽性対照群の17β-エストラジオール投与群では上皮の高さおよび内膜の厚さともに対照群と比較して増加した。アンドロステンジオン投与群では上皮の高さおよび内膜の厚さともに対照群との間に差は認められなかった。

#### 7) 組織の凍結保存

卵巣と肝臓は液体窒素中で急速冷凍した。

#### 8) 細胞増殖の評価

子宮の内腔上皮細胞、腺上皮および内膜間質細胞のそれぞれについて免疫組織化学的手法を用いて細胞増殖活性を評価した。十二指腸は増殖率が高いため、陽性対照として用いた。十二指腸のスライドにBrdUに対する陽性標識が存在することでBrdUへの暴露を確認した。

表 8 BrdU 標識指数\*

群	1	2	3	4	5	6	7	8
化合物	対照	チアクロ プリド	17β-エスト ラジオール	アンドロス テングイオン	対照	チアクロ プリド	17β-エスト ラジオール	アンドロス テングイオン
検査動物数	4	6	5	4	4	5	5	3
子宮内膜間質細胞	3.62	2.31	48.15	23.31	3.91	8.97	48.77	33.89
内腔上皮細胞	0.28	0.21	19.92	5.08	0.40	0.49	8.63	2.86

\* : 500 細胞あたりの BrdU 陽性細胞数

内膜間質細胞の増殖指数については、検体投与群では対照群との差は認められなかった。17β-エストラジオール投与群およびアンドロステングイオン投与群では、対照群と比較して増加した。

内腔上皮細胞の増殖指数については、検体投与群では対照群との差は認められなかった。17β-エストラジオール投与群およびアンドロステングイオン投与群では対照群と比較して増加した。

本試験の所見の概要を以下に要約する。

1. 検体投与群では死亡例および一般症状の変化は認められなかった。膣開口は観察されなかった。体重増加抑制が認められた。血漿中のホルモン濃度はプロゲステロンでは対照群と同等であった。テストステロンとエストラジオールについては未成熟動物のため分析に必要な血液を得ることができなかったこと及びほとんどのサンプルが検出限界以下であったことから正確な結果を導くことができなかった。肝実重量の低下が認められたが、体重低下によるものと考えられた。卵巣の実重量は第 6 群で有意に低下したが第 2 群では投与による変化は認められなかった。子宮内液を吸い取った子宮重量には投与による変化は認められなかった。子宮の病理組織学的所見はなく、有糸分裂指数の増加も細胞増殖指数の増加も認められなかった。また、上皮細胞の高さおよび内膜の厚さに影響を与えなかった。
2. 17β-エストラジオール投与群では死亡例および一般状態の変化、体重変化は認められなかった。膣開口は観察されなかった。肝臓および卵巣重量には変化はみられなかった。子宮への影響では、子宮内液を吸い取った子宮重量が統計学的に有意に増加した。病理所見では内膜増殖、内膜上皮の細胞残屑ならびに混合細胞浸潤がみられた。有糸分裂指数および細胞増殖指数が増加した。上皮細胞の高さおよび内膜の厚さが増加した。

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。

3. アンドロステンジオン投与群では死亡例および一般状態の変化、体重変化は認められなかった。膣開口は観察されなかった。血漿中のホルモン濃度では低濃度のテストステロンが検出された。肝臓および卵巣重量には変化はみられなかった。子宮への影響では、子宮内液を吸い取った子宮重量が統計学的に有意に増加した。病理所見では内膜増殖および内膜上皮の細胞残屑がみられたが、重症度は $17\beta$ -エストラジオール投与群より低かった。有糸分裂指数および細胞増殖指数が増加した。上皮細胞の高さおよび内膜の厚さには変化が認められなかった。

以上のことから、検体 70mg/kg/日投与は子宮肥大反応を誘発せず、従って、エストロゲン作用を有さないことが示された。なお、陽性対照化合物の $17\beta$ -エストラジオールおよびアンドロステンジオンについては、同一の試験条件下で子宮への有意な影響がみられ、本試験方法の有効性も確認された。



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。

チアクロプリドのラットを用いた4日間連続投与後24時間におけるホルモン濃度  
(資料No. 原体-18-4)

試験機関：

報告書作成年月日：2009年12月10日

検体の純度：98.7%

試験動物：ウィスター系ラット、若齢成獣、1群雌各15匹

試験開始時：11週齢(231~264g)

試験期間：2007年1月24日~2007年8月28日(実験開始日~実験完了日)

### 【目的】

本試験の目的は、ラット子宮腺癌の作用機序の解明に供するため、検体を雌の若齢成獣に4日間経口投与し、最終投与24時間後の血漿中ステロイド性ホルモン濃度に及ぼす影響を評価することである。さらに卵巣、肝臓および副腎において検体がステロイド性ホルモンの合成と代謝に関与する遺伝子の発現に及ぼす影響についても調べた。

### 【投与方法】

検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁させ、60mg/kg/日の用量で4日間連続強制経口投与とした。対照群として溶媒のみが投与された。投与容量は5mL/kgとした。

表1 群サイズおよび投与の詳細

群	検体	用量 (mg/kg)	屠殺時間	動物数
1	対照	0	24時間	15
2	チアクロプリド	60		15

### 投与用量及び試験期間の設定根拠；

投与用量は、経口毒性を調べた予備試験結果に基づいて設定した。なお、この用量はラットを用いた発がん性試験(資料No. 原体-18)の最高濃度とほぼ同じであり、この用量で子宮腺癌が観察された。

## 【試験項目及び結果】

### 1) 臨床症状及び死亡率

生死を少なくとも1日2回観察した。全動物について、症状の性質、発現時期、重症度、回復性および持続時間、排泄などについて1日1回以上観察した。

投与群の2匹が試験4日および屠殺日に死亡した。投与群の全動物に下記に示す臨床症状が試験3日および4日に認められたため、これらの死亡は投与に関連していると考えられた。

臨床症状として、投与群全動物が糞量が少なかったかまたは全く糞をしなかった。さらに一部の動物に頭部/口周囲の被毛の汚れ、円背位、立毛等が認められた。

### 2) 体重

各投与直前にすべての動物の体重を測定した。剖検前にも全動物の体重を測定した。

表2 体重

用量 mg/kg	1日後	2日後	3日後	4日後
0	244	245	248	249
60	245	240	↓230	↓223

↓ :  $p < 0.01$  (T検定)

投与群では、試験3日および試験4日目ともに対照群と比較して統計学的に有意に低下し、累積体重増加量も-23gと減少した。これらは投与による変化と考えられた。

### 3) 膣塗抹標本

発情周期を段階を決定するため膣垢を採取した。

投与に関連した発情周期の変化は認められなかった。

### 4) ホルモン分析

採血は最終投与24時間後にイソフルラン吸入により深部麻酔した動物の腹部大動脈より行った。

プロゲステロン、エストラジオール、卵胞刺激ホルモン(FSH)およびテストステロンの濃度は、リチウムヘパリン加血漿を検査試料とし、特異的ラジオイムノアッセイキットを用いて測定をした。

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 3 にホルモン濃度の検査結果を示した。

表 3 血漿中のホルモン濃度

	プロゲステロン	エストラジオール	FSH	テストステロン
チアクロプリド 60mg/kg	↑ 174	128	114	150

↑ ↓ : p<0.05 (T 検定)

表中の数値は、対照群に対する変動率 (%)

プロゲステロンについては、統計学的な有意な増加が認められ、この上昇は生物学的に意味のあるものと考えられた。

エストラジオールについては、わずかに上昇したが統計学的に有意ではなかった。

テストステロンについては、対照群ではこのホルモンが検出できたのが 2 匹のみであったため結果に関しては必ずしも正しい評価を導き出せるものとは考えられなかった。なお、投与群では対照群より多く検出できた (9/13 匹)。

FSH についても、わずかに上昇したが統計学的に有意ではなかった。

#### 5) 剖検および臓器重量

動物の剖検は最終投与 24 時間後にイソフルラン吸入による深麻酔下で放血後行った。全生存動物から以下の臓器を取り出し、重量を測定し、それらの対体重比も算出した。

肝臓、卵巣、子宮、副腎。

表 4 臓器重量 (有意差の認められた項目)

投与量 (mg/kg)		60
最終体重		↓ 91
肝臓	対体重比	↑ 122
副腎	実重量	↑ 147
	対体重比	↑ 163
卵巣	実重量	↓ 75
	対体重比	↓ 83
子宮	実重量	↓ 75
	対体重比	↓ 83

↑ ↓ : p<0.05、↑ ↓ : p<0.01 (T 検定)、表中の数値は対照群に対する変動率 (%)

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

最終体重が、対照群と比較して統計学的に有意な低下した。

肝臓では対体重比が有意に増加した。副腎では実重量および対体重比ともに増加した。卵巣および子宮では実重量および対体重比ともに有意に低下した。これらの臓器重量の変動は病理組織学的検査を実施しなかったため、その重要性は不明である。

[申請者追記] 副腎について、4週間混餌投与試験（資料 No. 原体-9-1）において重量低下が認められていないこと及び同様に4日間投与した試験（資料 No. 原体-18-5）において病理所見が認められていないことから重要な変化とは考えられなかった。卵巣および子宮重量の有意な低下について、卵巣は4週間混餌投与試験（資料 No. 原体-9-1）において重量低下が認められていないこと、また、子宮は本試験と同様に4日間投与した試験（資料 No. 原体-18-5）において重量低下および関連する病理所見が認められていないことから重要な変化とは考えられなかった。

#### 6) 組織の採取

全生存動物から以下の組織を採取した。

肝臓、卵巣、子宮、副腎

肝臓、卵巣、副腎および子宮角 1 個を液体窒素で急速冷凍し-80℃で保存した。残りの子宮角は、10%中性緩衝ホルマリンで固定した。

病理組織学的検査は行わなかった。

#### 7) 定量的 PCR 解析（表 5）

全動物の肝臓、卵巣および副腎の各試料から全 RNA を単離した。全 RNA 10µg を用いて定量的 PCR (Polymerase Chain Reaction) 解析を行い、下表に示す遺伝子の転写産物量を測定し、対照群と比較した。

表 5 qPCR 解析結果

遺伝子 (主要機能)	アイソフォーム	卵巣	肝臓	副腎
ステロイド性ホルモン産生				
ステロイド産生急性調節タンパク質 (ミトコンドリア内膜へのコレステロール輸送)	StAR	↑167	↑159	113
チトクロム P450 11a1 (コレステロールの側鎖を開裂させてプレグネノロンを形成する。)	Cyp11a1	113	566	↑160
チトクロム P450 17a1 (プレグネノロン→17 $\alpha$ ヒドロキシプレグネノロン) (プロゲステロン→アンドロステンジオン)	Cyp17a1	123	707	228
ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ 3b1 (プレグネノロン→プロゲステロン)	Hsd3b1	↑177	↑213	↑117
ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ 17b3 (アンドロステンジオン→テストステロン)	Hsd17b3	139	↑260	↑156
ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ 17b1 (エストロン→エストラジオール)	Hsd17b1	114	118	↑143
チトクロム P450 19a1 (アロマターゼ) (テストステロン→エストラジオール; アンドロステンジオン→エストロン)	Cyp19a1	198	ND	7
核内受容体サブファミリー5a1 (内分泌組織におけるステロイド産生チトクロム P450 遺伝子の発現を制御する転写調節因子)	Nr5a1	98	↑290	95
インスリン様 3 (卵巣の莢膜細胞と関連がある。)	Insl3	73	ND	ND

遺伝子 (主要機能)	アイソフォーム	卵巣	肝臓	副腎
代謝				
チトクロム P450 1a1 (不活性化: エストラジオール→2ヒドロキシエストラジオール)	Cyp1a1	54	↑962	59
チトクロム P450 3a3 (不活性化: テストステロン→6 $\beta$ ヒドロキシテストステロン)	Cyp3a3 <sup>註)</sup>	1953	↑6278	1330
アルド・ケトレダクターゼ 1c18 (不活性化: プロゲステロン→20 $\alpha$ ヒドロキシプロゲステロン)	Akr1c18	117	↑1108	↑189
ステロイド 5- $\alpha$ レダクターゼ 2 (テストステロン→DHT の転換)	Srd5a2	79	ND	115

表中の数値は遺伝子転写物の対照群に対する割合(%)

↑↓: p<0.05, ↑↓: p<0.01 (T検定)

卵巣では、ステロイド性ホルモン産生に関与する遺伝子では、StAR および Hsd3b1 の統計学的に有意な発現の増加が認められた。Cyp17a1、Hsd17b3 および Cyp19a1 は個体間のばらつきが大きかったため統計学的有意差は認められないものの明らかに増加した。代謝に関与する遺伝子の Cyp3a3<sup>註)</sup> は個体間のばらつきが大きかったため、統計学的に有意ではなかったが明らかに増加した。Akr1c18 はわずかに増加した。

肝臓では、ステロイド性ホルモン産生に関与する遺伝子では、StAR および Hsd17b3 は統計学的に有意に増加し、Cyp17a1 は個体間のばらつきが大きく統計学的有意差がなかったが増加した。また、対照群および投与群ともに Cyp19a1 および Insl3 遺伝子発現を検出することができなかった。それ以外の多くの遺伝子は弱く発現しただけで、Nr5a1、Hsd3b1 および Cyp11a1 は増加したものの対照群および投与群いずれも肝臓サンプル中での発現が弱かったため結果の解釈が困難であった。代謝に関与する遺伝子、Cyp11a1、Cyp3a3<sup>註</sup> および Akr1c18 が統計学的に有意に増加した。

副腎では、ステロイド性ホルモン産生に関与する遺伝子では StAR、Cyp11a1、Hsd3b1 および Nr5a1 が容易に検出され、このうち Cyp11a1 および Hsd3b1 は統計学的に有意に増加した。これ以外の遺伝子は発現が弱いか検出されなかった。代謝に関する遺伝子はすべて弱く発現しただけであった。従って Akr1c18 は統計学的に有意な増加を示したが対照群および投与群ともに発現が弱いことからその重要性は不明である。また Cyp3a3<sup>註</sup> は個体間のばらつきが大きくこの大幅な発現の増加の解釈は困難であった。

本試験の所見の概要を以下に要約する。

1. 4日間連続経口投与では2匹が死亡し、一般状態の変化として糞量の減少、円背位、立毛および被毛の汚れなどが認められた。発情周期には影響が認められなかった。
2. 血漿中のプロゲステロン濃度が有意に増加し、エストラジオールもわずかに増加した。
3. 体重および臓器重量の変化が認められた。対照群と比較して統計学的に有意に体重が低下し、体重増加量も減少した。対照群と比較して、肝臓では対体重比が有意に増加した。副腎では実重量及び対体重比が有意に増加し、卵巣および子宮では実重量および対体重比が有意に低下した。しかしながら、副腎、子宮および卵巣については、長期間投与した試験では重量変化が認められなかったことあるいは同様に4日間投与した試験では顕微鏡所見で形態的变化が認められなかったことから、これらの所見の重要性は少ないと考えられた。
4. 卵巣、肝臓および副腎ともに、ステロイドホルモン産生に関与する遺伝子が上方調節される傾向があった。卵巣ではほとんどの遺伝子に発現の増加が認められ、StAR (ミトコンドリア内膜へのコレステロールの輸送) および Hsd3b1 (プレグネノロンのプロゲステロンへの転換) は統計学的に有意な増加であった。肝臓では StAR、Hsd17b3

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。

(アンドロステンジオンのテストステロンへの転換) が統計学的に有意に増加し、Cyp17a1 (プロゲステロンのアンドロステンジオンへの転換) の発現も統計学的に有意ではなかったが著しく増加した。副腎ではCyp11a1 (コレステロールのプレグネロンへの転換) およびHsd3b1 が統計学的に有意に増加した。代謝に関与する遺伝子では、卵巣において、Cyp3a3<sup>注)</sup> およびAkr1c18 の発現の増加が観察された。肝臓ではCyp1a1 (エストラジオールの2-ヒドロキシエストラジオールへの代謝)、Cyp3a3<sup>注)</sup> (テストステロンの6βヒドロキシテストステロンへの代謝) およびAkr1c18 (プロゲステロンの20-α-ヒドロキシプロゲステロンへの代謝) の発現について統計学的に有意な増加が記録された。

5. 全体として、検体を4日間連続経口投与する事により誘発された血漿中のステロイド性ホルモンの変化(プロゲステロンおよびエストラジオールの増加)は、卵巣、肝臓および副腎におけるステロイドホルモン産生に関与する遺伝子の発現の増加と関連があった。また、ステロイドホルモン代謝に関与する遺伝子の発現も増加したことにより遺伝子レベルにおいてステロイドホルモン産生の緩和効果が認められた。

以上のことから、60mg/kg/日の用量で4日間連続経口投与後24時間における血漿中のステロイド性ホルモン濃度の変化ならびに卵巣、副腎および肝臓におけるステロイド性ホルモン調節に関与する遺伝子発現の増加は検体の投与に起因し、生物学的に意味のある変化と考えられた。

注) : [申請者追記] CYP3A3は、現在は CYP3A23/3A1 である。

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

チアクロプリドのラットを用いた4日間連続投与後2および8時間におけるホルモン濃度  
(資料No. 原体-18-5)

試験機関：

報告書作成年月日：2009年12月10日

検体の純度：98.7%

試験動物：ウィスター系ラット、若齢成獣、1群雌各15匹

試験開始時：11週齢(236~270g)

試験期間：2007年1月31日~2007年7月31日(実験開始日~実験完了日)

### 【目的】

本試験の目的は、ラット子宮腺癌の作用機序の解明に供するため、検体を雌の若齢成獣に4日間経口投与し、最終投与2および8時間後の血漿中ステロイド性ホルモン濃度に及ぼす影響を評価することである。

### 【投与方法】

検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁させ、60mg/kg/日の用量で4日間連続強制経口投与とした。対照群として溶媒のみが投与された。投与容量は5mL/kgとした。なお、ホルモン濃度のばらつきを最小限に抑えるために、採血時間が同じくなるように投与時間を調整した。

表1 群サイズおよび投与の詳細

群	検体	用量 (mg/kg)	屠殺時間	動物数
1	対照	0	2時間	15
2	チアクロプリド	60		15
3	対照	0	8時間	15
4	チアクロプリド	60		15

### 投与用量及び試験期間の設定根拠：

投与用量は、経口毒性を調べた予備試験結果と、先に実施した試験(資料No. 原体-18-4)に基づいて設定した。なお、この用量はラットを用いた発がん性試験(資料No. 原体-18)の最高濃度とほぼ同じで、この濃度で子宮腺癌が観察された。



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。

### 【試験項目及び結果】

#### 1) 臨床症状及び死亡率

生死を少なくとも1日2回観察した。全動物について、症状の性質、発現時期、重症度、回復性および持続時間、排泄などについて1日1回以上観察した。

試験期間中に死亡例は認められなかった。8時間後屠殺予定の1匹が試験2および3日に糞を排泄しなかった。

#### 2) 体重

各投与直前にすべての動物の体重を測定した。

表2 体重

用量 mg/kg	8時間屠殺群 (g)			2時間屠殺群 (g)		
	1日後	2日後	3日後	1日後	2日後	3日後
0	252	253	253	252	251	250
60	250	↓243	↓233	248	↓242	↓233

↓ :  $p < 0.05$ , ↓↓ :  $p < 0.01$  (T検定)

投与群では、試験2日および試験3日目ともに対照群と比較して統計学的に有意に低下し、累積の体重増加量もそれぞれ-17g、-15gと減少した。これらは投与による変化と考えられた。

#### 3) 膣塗抹標本

発情周期の段階を決定するため膣垢を採取した。

投与に関連した発情周期の変化は認められなかった。

#### 4) ホルモン分析

採血は最終投与2あるいは8時間後にイソフルラン吸入により深部麻酔した動物の腹部大動脈より行った。

プロゲステロン、エストラジオール、卵胞刺激ホルモン(FSH)及びテストステロンの濃度は、リチウムヘパリン加血漿を検査試料とし、特異的ラジオイムノアッセイキットを用いて測定をした。

表3にホルモン濃度の検査結果を示した。

表3 血漿中のホルモン濃度

屠殺時間	用量 (mg/kg)	プロゲステロン (ng/ml)	エストラジオール (pg/ml)	FSH (ng/ml)	テストステロン (ng/ml)
2時間	0	23.69	ND	5.8	ND
	60	40.34 ↑ 170	ND	5.8 (nc)	0.07
8時間	0	20.98	ND	6.5	0.05*
	60	32.35 ↑ 154	ND	6.5 (nc)	0.05

↑↓ : p<0.01 (T検定) 表中の下段の数値は対照群に対する変動率 (%)

ND : 検出限界未満、(nc) : 変化なし \* : 1匹のみから検出

プロゲステロンについては、2 および 8 時間後に統計学的な有意な増加が認められ、この上昇は生物学的に意味のあるものと考えられた。

FSH 濃度に投与による変化は認められなかった。

エストラジオールとテストステロンについては以下の理由により評価できるものとは考えられなかった。

エストラジオールについては、全群全動物で検出限界未満であったため、外部の研究機関[ (Marcy l' Etoile、フランス) ]において異なるラジオイムノアッセイキットを用いて再検査したが、全群全動物ともに検出限界未満または検出限界に近い濃度であることが確認された。成獣においてこのような状況は通常では考えられないため、技術的問題が関係していると考えられた。

テストステロンについては、対照群ではこのホルモンが検出できたのが1匹のみであったため、結果が必ずしも評価できるものとは考えられなかった。なお、投与群では対照群より多く検出できた (2時間後 : 9/15 匹、8時間後 : 8/15 匹)。

#### 5) 剖検および臓器重量

動物の剖検は最終投与 2 あるいは 8 時間後にイソフルラン吸入による深麻酔下で放血後行った。全生存動物から以下の臓器を取り出し、重量を測定し、それらの対体重比も算出した。

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。

肝臓、卵巣、子宮、副腎。

表 4 臓器重量 (有意差の認められた項目)

屠殺時間		2 時間	8 時間
投与量 (mg/kg)		60	60
最終体重		↓ 88	↓ 91
肝臓	実重量	↓ 85	↓ 84
	対体重比		↓ 92
副腎	実重量	↑ 136	↑ 121
	対体重比	↑ 154	↑ 132
卵巣	実重量	↓ 88	↓ 85

↑ ↓ :  $p < 0.05$  , ↑ ↓ :  $p < 0.01$  (T 検定)

表中の数値は対照群に対する変動率 (%)

いずれの投与群においても最終体重に対照群と比較して統計学的に有意な低下が認められた。

肝臓ではいずれの投与群においても実重量の低下が認められた。対体重比では投与から 2 時間後に屠殺した群では変化は認められなかったが、8 時間後に屠殺した群では有意に低下した。肝臓では病理組織学的検査を実施しなかったためこれらの変化の重要性は不明である。[申請者追記] 検体の反復経口投与試験 (90 日、1 年/2 年) ではいずれも肝重量の増加及び肝細胞肥大が認められていることから、今回の所見は体重低下に起因し、また、比重量の低下もわずかであることから、毒性学的に重要な変化とは考えられなかった。

副腎ではいずれの投与群においても実重量および対体重比ともに増加した。卵巣ではいずれの投与群においても実重量が有意に低下した。いずれの動物においてもそれぞれの臓器に病理組織学的検査では関連する形態的变化が認められなかったためこれらの変化の重要性は小さいものと考えられた。

子宮重量は投与による変化は認められなかった。

#### 6) 病理組織学的検査

全動物から以下の組織を採取した。

肝臓、卵巣、子宮、副腎、膣

肝臓の一部および子宮角 1 個を液体窒素で急速冷凍し -80°C で保存した。残りの子宮

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。

角、膣、卵巣および副腎は、10%中性緩衝ホルマリンで固定後、組織学的検査用切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色(H&E)を施した。肝臓を除き病理組織学的検査を実施した。

副腎および卵巣には投与による影響は認められなかった。

また、子宮および膣を用いて発情周期の段階を確定したが投与による影響は認められなかった。

本試験の所見の概要を以下に要約する。

1. 4日間連続経口投与による死亡は認められなかった。一般状態の変化として1匹に糞の排泄が認められなかった。発情周期には影響が認められなかった。
2. 血漿中のプロゲステロン濃度は投与から2時間および8時間後に有意な増加が認められたが、FSH濃度には投与に関連した変化が認められなかった。エストラジオールはおそらく技術的な問題により検出することができず、テストステロンは測定できた対照群のサンプル数不足により明確な評価ができなかった。
3. 体重および臓器重量の変化が認められた。いずれの投与群においても対照群と比較して統計学的に有意に体重が低下し、体重増加量も減少した。いずれの投与群においても対照群と比較して、肝臓では実重量ないし対体重比の有意な低下、副腎では実重量および対体重比ともに有意な増加、卵巣では実重量の有意な低下が認められた。しかしながら、肝臓では軽度な変化で今回病理組織学的検査を実施しなかったが長期投与の試験では肝重量増加や肝細胞肥大が認められていること、副腎および卵巣では顕微鏡所見で形態的变化が認められなかったことから、これらの所見の重要性は少ないと考えられた。

以上のことから60mg/kg/日の用量で4日間連続投与後2あるいは8時間における血漿中のプロゲステロン濃度の明らかな増加は生物学的に意味のある変化と考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び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。

チアクロプリドのラットを用いた単回投与後 2、8 および 24 時間におけるホルモン濃度  
(資料No. 原体-18-6)

試験機関：

報告書作成年月日： 2009 年 11 月 20 日

検体の純度 : 98.7%

試験動物 : ウィスター系ラット、若齢成獣、1 群雌各 15 匹

試験開始時 ; 11 週齢 (217~269g)

試験期間 : 2007 年 6 月 27 日~2007 年 8 月 28 日 (実験開始日~実験完了日)

### 【目的】

本試験の目的は、ラット子宮腺癌の作用機序の解明に供するため、検体を雌の若齢成獣に単回経口投与し、2、8 および 24 時間後の血漿中ステロイド性ホルモン濃度に及ぼす影響を評価することである。さらに投与 24 時間後の卵巣および肝臓において検体がステロイドホルモンの合成と代謝に関与する遺伝子の発現に及ぼす影響についても調べた。

### 【投与方法】

検体を 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁させ、60mg/kg/日の用量で強制経口投与とした。対照群として溶媒のみが投与された。投与容量は 5mL/kg とした。なお、ホルモン濃度のばらつきを最小限に抑えるために、採血時間が同じくなるように投与時間を調整した。

表 1 群サイズおよび投与の詳細

群	検体	用量 (mg/kg)	屠殺時間	動物数
1	対照	0	2 時間	15
2	チアクロプリド	60		15
3	対照	0	8 時間	15
4	チアクロプリド	60		15
5	対照	0	24 時間	15
6	チアクロプリド	60		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。

#### 投与用量及び試験期間の設定根拠：

投与用量は、経口毒性を調べた予備試験結果と、先に実施した試験（資料 No. 原体-18-4 および 5）に基づいて設定した。なお、この用量はラットを用いた発がん性試験（資料 No. 原体-18）の最高濃度とほぼ同じで、この濃度で子宮腺癌が観察された。

#### **【試験項目及び結果】**

##### 1) 臨床症状及び死亡率

生死を少なくとも 1 日 2 回観察した。投与後 24 時間屠殺用動物について、症状の性質、発現時期、重症度、回復性、持続時間および排泄などについて一回以上観察した。

試験期間中に臨床症状は認められなかった。死亡例は認められなかった。

##### 2) 体重

投与直前すべての動物の体重を測定し、24 時間後屠殺用動物は剖検前にも体重測定した。

剖検前の最終体重に投与による変化は認められなかった。

##### 3) 膣塗抹標本

発情周期の段階を決定するため、投与 24 時間後屠殺用動物を対象に剖検前に膣垢を採取した。

投与に関連した発情周期の変化は認められなかった。

##### 4) ホルモン分析

採血は投与から 2、8 あるいは 24 時間後にイソフルラン吸入により深部麻酔した動物の腹部大動脈より行った。

プロゲステロン、エストラジオールおよびテストステロンの濃度は、リチウムヘパリン加血漿を検査試料とし、特異的ラジオイムノアッセイキットを用いて測定をした。

表 2 にホルモン濃度の検査結果を記した。

表 2 血漿中のホルモン濃度

チアクロプリド 60mg/kg	プロゲステロン	エストラジオール	テストステロン
2	111	114	78
投与後屠殺時間 8	↑ 157	167	84
24	↑ 181	87	92

↑↓ : p<0.01 (T 検定)

表中の数値は、対照群に対する変動率 (%)

プロゲステロンについては、検体投与から 8 及び 24 時間後に統計学的に有意な増加が認められ、この上昇は生物学的に意味のあるものと考えられた。

エストラジオールについては、いずれの時間においても統計学的に有意な変化は認められなかった。

テストステロンについては、対照群ではこのホルモンが検出できたのが比較的少数の動物のみ (2 時間後 : 7/15 匹、8 時間後 : 3/15 匹、24 時間後 : 4/15 匹) であったため今回得られた測定結果から検体の影響について必ずしも確定した評価ができるものではないと考えられた。なお、投与群では対照群より多く検出できた (2 時間後 : 12/15 匹、8 時間後 : 9/15 匹、24 時間後 : 5/15 匹)。

#### 5) 剖検および臓器重量

動物の剖検はイソフルラン吸入による深麻酔下で放血後行った。投与 24 時間後計画屠殺する動物から以下の臓器を取り出し、臓器重量を測定し、それらの対体重比も算出した。

肝臓、卵巣、子宮 (子宮頸部含む)、副腎、下垂体

臓器重量の実重量および対体重比ともに投与による変化は認められなかった。

#### 6) 定量的 PCR 解析 (qPCR) (表 3)

各時間における全生存動物から肝臓、卵巣、子宮 (子宮頸部を含む)、副腎及び下垂体を取り出し、液体窒素で速やかに冷凍し -80℃ で保存した。投与後 24 時間の計画屠殺動物の肝臓および卵巣の各試料から全 RNA を単離した。全 RNA 10µg を用いて qPCR (定量的ポリメラーゼ連鎖反応法) 解析を行い、下表に示す遺伝子の転写産物量を測定し、対照群と比較した。

表 3 PCR 解析結果

遺伝子 (主要機能)	アイソフォーム	卵巣	肝臓
ステロイドホルモン産生			
ステロイド産生急性調節タンパク質 (ミトコンドリア内膜へのコレステロール輸送)	StAR	109	↑122
チトクロム P450 11a1 (コレステロールの側鎖を開裂させてプレグネノロンを形成する。)	Cyp11a1	93	157
チトクロム P450 17a1 (プレグネノロン→17 $\alpha$ ヒドロキシプレグネノロン) (プロゲステロン→アンドロステンジオン)	Cyp17a1	75	↑200
ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ 3b1 (プレグネノロン→プロゲステロン)	Hsd3b1	170	150
ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ 17b3 (アンドロステンジオン→テストステロン)	Hsd17b3	157	↑161
ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ 17b1 (エストロン→エストラジオール)	Hsd17b1	100	100
チトクロム P450 19a1 (アロマターゼ) (テストステロン→エストラジオール; アンドロステンジオン→エストロン)	Cyp19a1	133	ND
核内受容体サブファミリー5a1 (内分泌組織におけるステロイド産生チトクロム P450 遺伝子の発現を制御する転写調節因子)	Nr5a1	100	130
インスリン様 3 (卵巣の莢膜細胞と関連がある。)	Insl3	225	ND
代謝			
チトクロム P450 1a1 (不活性化: エストラジオール→2ヒドロキシエストラジオール)	Cyp1a1	125	↑329
チトクロム P450 3a3 (不活性化: テストステロン→6 $\beta$ ヒドロキシテストステロン)	Cyp3a3 <sup>(注)</sup>	3375	↑3106
アルド・ケトレダクターゼ 1c18 (不活性化: プロゲステロン→20 $\alpha$ ヒドロキシプロゲステロン)	Akr1c18	88	663
ステロイド 5- $\alpha$ レダクターゼ 2 (テストステロン→DHT の転換)	Srd5a2	78	53

表中の数値は遺伝子転写物の対照群に対する割合(%)

↑↓: p<0.05, ↑↓: p<0.01 (T検定)

卵巣では、統計学的な有意差は認められなかったが、ステロイドホルモン産生に関与する遺伝子では Hsd3b1、Hsd17b3 および Insl3 のわずかな発現の増加が認められた。代謝に関与する遺伝子の Cyp3a3<sup>(注)</sup>の増加は 1 匹の値が大きかったことによるもので、この発現の増加は投与とは関係ないものと考えられた。

肝臓では、特に代謝に関与する遺伝子、Cyp1a1 および Cyp3a3<sup>(注)</sup>が統計学的に有意に上昇し、Akr1c18 も統計学的有意差が認められないものの上昇した。ステロイドホルモン産生に関与する遺伝子では、Cyp17a1 および Hsd17b3 が統計学的に有意に増加し、StAR



は統計学的に有意であったが増加の程度はわずかであった。Cyp19a1 と Ins13 は発現しなかった。

本試験の所見の概要を以下に要約する。

1. 単回経口投与から 2、8 および 24 時間後では、それぞれ死亡および一般状態の変化は認められなかった。また投与から 24 時間後では、発情周期、最終体重および臓器重量に影響を及ぼさなかった。
2. 血漿中のプロゲステロン濃度は投与から 8 時間および 24 時間後に有意な増加が認められたが、エストラジオール濃度には変化が認められず、テストステロンは測定できた対照群のサンプル数不足により明確な評価ができなかった。
3. 投与から 24 時間後の卵巣における遺伝子発現は統計学的な有意差がなかったものの Hsd3b1 (プレグネノロンのプロゲステロンへの転換)、Hsd17b3 (アンドロステンジオンのテストステロンへの転換) および Ins13 (莢膜細胞の活性に関与) のわずかな発現の増加が認められ、転写レベルではステロイドホルモン産生に何らかの影響があることを示唆している。肝臓では、統計学的に有意な変化が認められ、特にステロイド性ホルモンの代謝を引き起こす酵素の遺伝子である Cyp1a1 および Cyp3a3<sup>注)</sup>、また、ステロイド性ホルモン産生に関与する遺伝子である Cyp17a1 (プロゲステロンのアンドロステンジオンへの転換) および Hsd17b3 (アンドロステンジオンのテストステロンへの転換) の転写活性の増加が認められた。

以上のことから、60mg/kg/日の単回投与による血漿中のプロゲステロン濃度の増加、ステロイド性ホルモン産生の調節に関与するいくつかの遺伝子の発現の有意な増加はいずれも生物学的に意味のある変化と考えられた。

注) : [申請者追記] CYP3A3 は、現在は CYP3A23/3A1 である。

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

チアクロプリドの若齢成獣ラットを用いた飼料混入投与による 28 日間経口毒性試験  
(資料No. 原体-18-7)

試験機関：

報告書作成年月日： 2009 年 12 月 21 日

検体の純度 : 98.7%

試験動物 : ウィスター系ラット、1 群雌 15 匹

試験開始時 ; 雌 7 週齢 (180~212g)

試験期間 : 28 日間 (2008 年 3 月 26 日~2008 年 4 月 24 日)

**【目的】**

本試験の目的は、ラット子宮腺癌の作用機序の解明に供するため、検体を雌の若齢成獣に 28 日間混餌投与し、ステロイド性ホルモン合成に関するさまざまなパラメータに及ぼす影響を評価することである。このため、肝臓におけるチトクロム P450 アイソザイム活性をアロマターゼ活性も含めて調べ、また卵巣におけるアロマターゼ酵素活性も調べた。さらに血漿中のステロイド性ホルモン濃度に及ぼす影響、卵巣および肝臓におけるステロイドホルモンの合成および代謝に関与する遺伝子発現を調べた。

**【投与方法】**

検体を、0(対照群)、100、1000 及び 1600ppm の濃度で飼料に混入し、28 日間にわたって摂食させた。

投与用量設定の根拠 ;

本試験の用量設定として、最高用量 1600ppm は 90 日間反復経口投与毒性試験 (資料No. 原体-9) に基づいて設定し、中間用量の 1000ppm は発がん性試験 (資料 No. 原体-18) の最高用量をもとにした。

**【試験項目及び結果】**

1) 臨床症状及び死亡率

生死を少なくとも 1 日 2 回観察した。全動物について、症状の性質、発現時期、重症度、回復性および持続時間、排泄などについて 1 日 1 回以上観察した。

試験期間中に死亡例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。

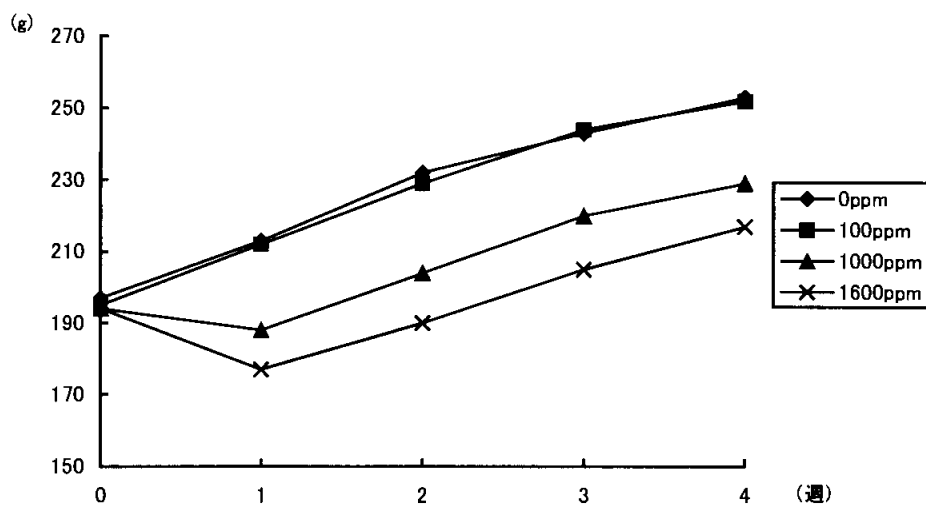
1600ppm 群の全動物にやせが観察された。また、2 匹に脱毛の発生がみられた。

## 2) 体重 (図 1)

投与初日とその後週 1 回すべての生存動物の体重を測定した。また、計画剖検前に測定した (最終体重)。

1600 および 1000ppm 群では体重増加抑制が観察された。その結果、試験終了時まで対照値と比較して統計学的有意差がみられた。投与期間中、対照群と比較して 1600ppm 群では 14.2~18.1%、1000ppm 群では 9.5~12.1%低下した。100ppm 群では体重増加に投与の影響はなかった。

図 1



## 3) 摂餌量及び検体摂取量

全動物の摂餌量を週 1 回個体毎に測定した。

1600ppm 群では対照群と比較して 21.8~59.3%、1000ppm 群では 8.4~49.7% 統計学的に有意に減少した。また、100ppm 群でもわずかに減少した。

検体摂取量は、次の表 1 に示した。

表 1 検体摂取量 (mg/kg/日)

投与量 (ppm)	100	1000	1600
検体摂取量 (mg/kg/日)	8.0	75.2	107.7

#### 4) 膣塗抹標本

発情周期の段階を決定するため膣垢を採取した。

投与に関連した発情周期の変化は認められなかった。

#### 5) ホルモン分析

採血は剖検日にイソフルラン吸入により深部麻酔した動物の腹部大動脈より行った。なお、ホルモン濃度のばらつきを最小限に抑えるために、採血は8時30分から11時の間に行った。

プロゲステロン、エストラジオール、卵胞刺激ホルモン(FSH)およびテストステロンの濃度は、リチウムヘパリン加血漿を検査試料とし、特異的ラジオイムノアッセイキットを用いて測定をした。

表2 血漿中のホルモン濃度

用量(ppm)	プロゲステロン	エストラジオール	FSH	テストステロン
100	126	103	123	143
1000	140	↑165	108	229
1600	134	↑160	160	157

↑↓ :  $p < 0.01$  (DUNNETT 検定)

表中の数値は、対照群に対する変動率 (%)

プロゲステロンについては、いずれの投与群においても統計学的に有意でない増加が認められた。

エストラジオールについては、100ppm 群では変化が認められなかったが、1000ppm および 1600ppm 群では統計学的に有意な上昇が認められ、生物学的に意味のあるものと考えられた。

FSH 濃度については、1000 および 100ppm 群では変化が認められなかった。1600ppm 群では統計学的に有意ではないが増加が認められた。

テストステロンについては、対照群ではこのホルモンが検出できたのが比較的少数の動物のみ (4/15 匹) であったため結果の評価はできなかった。なお、投与群では対照群より多く検出でき、100ppm 群では 6/15 匹、1000ppm 群では 10/15 匹、1600ppm 群では 11/15 匹であった。

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。

#### 6) 剖検および臓器重量

全生存動物はイソフルラン吸入による深麻酔下で放血後、主な臓器、組織および体腔を剖検した。また、以下の臓器を摘出し、重量を測定し、それらの対体重比も算出した。

肝臓、卵巣、子宮（頸部含む）、副腎。

表3 臓器重量（有意差の認められた項目）

投与量(ppm)		100	1000	1600
最終体重			↓ 90	↓ 85
肝臓	実重量		↑ 116	↑ 123
	対体重比		↑ 129	↑ 145
卵巣	実重量			
	対体重比		↑ 128	↑ 121

↑ ↓ :  $p < 0.05$ 、↑ ↓ :  $p < 0.01$  (DUNNETT 検定または DUNN 検定)、

表中の数値は対照群に対する変動率 (%)

最終体重については、1600 および 1000ppm 群において対照群と比較して統計学的に有意な低下した。

肝臓では 1600ppm および 1000ppm 群の実重量および対体重比が有意に増加した。

卵巣では 1600ppm および 1000ppm 群の対体重比が有意に増加したが、用量関連性もなく、また、病理組織学的検査を実施しなかったため、投与との関連は不明であった。

100ppm 群では、最終体重および臓器重量ともに投与による変化は認められなかった。

表4 主要な肉眼的病理所見

投与群 (ppm)	0	100	1000	1600
肝臓 検査動物数	15	15	15	15
肥大	0	0	14	15
暗色化	0	0	14	11

剖検では 1600ppm および 1000ppm 群の肝臓で、大部分の動物に肥大ならびに暗色化が観察された。

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。

#### 7) 病理組織学的検査

全生存動物から以下の組織を採取、10%中性緩衝ホルマリンで固定後、組織学的検査用切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色(H&E)を施した。発情周期を確定するために生存動物の子宮と膣の病理組織学的検査を実施した。

子宮、膣、副腎

発情周期に投与に起因する変化は認められなかった。

#### 8) 組織の凍結保存

全生存動物の卵巣と肝臓の2つ部分を液体窒素中で急速冷凍した。

#### 9) 肝臓ホモジネートを用いた薬物代謝酵素測定

6匹/群の動物から肝マイクロソームを調整し、総チトクローム P-450 量、各種 P-450 アイソザイム活性を測定した。

総チトクローム P-450 量；分光光度法によりマイクロソーム中の総 P-450 量を測定した。

表5 総チトクローム P-450 量

用量 (ppm)	100	1000	1600
総 P-450	108	159	170

数値は対照群に対する比(%)

1600ppm および 1000ppm 群の総 P-450 量は対照群に比べ増加した。

100ppm 群では変化は認められなかった。

P-450 アイソザイム活性；ペントキシレゾルフィンおよびベンゾキシレゾルフィンを基質として用いる蛍光分光分析により特定 P-450 アイソザイム (PROD、BROD) の活性を測定した。

表6 P-450 アイソザイム活性

用量 (ppm)	100	1000	1600
PROD	111	843	773
BROD	76	3297	5910

数値は対照群に対する比(%)

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。

1600ppm および 1000ppm 群の PROD および BROD 活性は対照群と比較すると、用量に関連して有意に増加した。

#### 10) アロマターゼ酵素活性

エストラジオールを測定する直接的な方法と、従来からのトリチウム化水測定による間接的に推定する方法の2つの方法で酵素活性を測定した。

エストラジオールの測定；肝ミクロソームおよび肝ミクロソームを調整した動物と同じ動物から得られた卵巣全細胞のホモジネートを、テストステロンを用いて培養した後にアロマターゼ反応の最終生成物であるエストラジオールを定量することにより、アロマターゼ酵素活性を直接測定した。肝ミクロソームおよび卵巣ホモジネート中に存在するエストラジオールのバックグランド濃度を測定するために特異的アロマターゼ阻害剤であるアナストロゾールの存在下および非存在下の両方について測定を行った。

表7 エストラジオール生成量\* (pg/ml)

用量 (ppm)	0	100	1000	1600
卵巣	2297.9	2219.2	1913.6(83)	1250.3(54)
肝臓	10.0	0.1	-7.1	-2.3

\*: エストラジオール濃度はバックグランドで補正した。  
(T 検定)、( ) 内の数字は対照群に対する比率(%)

卵巣ではアナストロゾールの非存在下で高濃度のエストラジオールが検出されアナストロゾールの存在下では著しく減少したことから、検出されたエストラジオールはアロマターゼ酵素活性によるものであることが確認された。エストラジオール生成量は1600ppm および1000ppm 群において、対照群と比較して統計学的に有意ではないが減少し、アロマターゼ酵素活性がわずかに阻害された。100ppm 群では変化は認められなかった。

肝臓ではアナストロゾールの非存在下で少量のエストラジオールしか検出されず、またアナストロゾールの存在下でもエストラジオールの生成量の減少がみられなかったことから肝臓ではアロマターゼ酵素活性がないことが確認された。いずれの

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。

群においてもエストラジオールの生成量は少なく、投与による変化は認められなかった。

トリチウム化水分析法：トリチウム化アンドロステンジオンを用いて肝マイクロソームを培養した後にアロマターゼ反応の副生成物であるトリチウム水を測定することにより、アロマターゼ酵素活性を間接的に推定した。

表 8 アロマターゼ酵素活性 (pmolxmin<sup>-1</sup>xg<sup>-1</sup>)

用量 (ppm)	0	100	1000	1600
肝臓	7.2	9.1	27.5(382)**	29.7(413)**

\*\* : p<0.01 (T検定)、()の数字は対照群に対する比率(%)

1600ppm および 1000ppm 投与群ではトリチウム水生成量が統計学的に有意に増加したことから、肝臓アロマターゼ活性の増加が間接的に明らかになった。

#### 11) 定量的PCR解析

全動物の肝臓および卵巣の各試料から全RNAを単離した。全RNA 10μgを用いて定量的PCR(Polymerase Chain Reaction)解析を行い、下表に示す遺伝子の転写産物量を測定し、対照群と比較した。

表 9 PCR解析結果

表 9-1 卵巣

ステロイド性ホルモン産生 アイソフォーム	全動物		
	100ppm	1000ppm	1600ppm
StAR	110	111	110
Cyp11a1	121	121	93
Cyp17a1	134	↑257	194
Cyp19a1	93	90	82
Hsd17b1	nc	↓78	78
Hsd3b1	117	109	nc



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。

ステロイド性ホルモン産生	発情後期/発情間期		
	100ppm	1000ppm	1600ppm
アイソフォーム			
StAR	119	116	113
Cyp11a1	127	134	95
Cyp17a1	164	256	↑338
Cyp19a1	84	nc	123
Hsd17b1	nc	78	91
Hsd3b1	122	134	112

代謝	全動物		
	100ppm	1000ppm	1600ppm
アイソフォーム			
POR	108	109	103
Cyp2b1	62	61	60
Cyp3a3 <sup>注)</sup>	89	nc	487
Akr1d1	69	116	125
Akr1c18	125	123	132
Srd5a1	121	104	121
Srd5a2	ND	ND	ND

代謝	発情後期/発情間期		
	100ppm	1000ppm	1600ppm
アイソフォーム			
POR	114	107	120
Cyp2b1	232	177	145
Cyp3a3 <sup>注)</sup>	116	124	677
Akr1d1	52	130	177
Akr1c18	158	↑164	↑211
Srd5a1	145	92	78
Srd5a2	ND	ND	ND

表中の数値は遺伝子転写物の対照群に対する割合(%)、nc：変化なし  
 ↑↓：p<0.05，↑↓：p<0.01 (T検定)

卵巣では、ステロイド性ホルモン産生に関与する遺伝子はすべて容易に検出された。投与群において Cyp17a1 が増加し、発情後期/発情間期の動物ではこの傾向はさらに顕著となり、1600ppm 群では統計学的に有意であった。これ以外の遺伝子の変化はいずれも偶発的なものと考えられた。

代謝に関与する遺伝子では、投与群において Akr1c18 が増加し、発情後期/発情間期の動物ではこの傾向はさらに顕著となり、1000ppm および 1600ppm 群では統計学的に有意であった。1600ppm の Cyp3a3<sup>注)</sup>の発現の増加は1匹の動物の大幅な増加が原因で投与とは関係ないと考えられた。これ以外の遺伝子の変化はいずれも偶発的なものと考えられた。

表 9-2 肝臓

ステロイドホルモン産生	全動物		
アイソフォーム	100ppm	1000ppm	1600ppm
StAR	112	112	133
Cyp11a1	80	105	139
Cyp17a1	118	↓69	nc
Cyp19a1	ND	ND	ND
Hsd17b1	119	nc	103
Hsd3b1	82	90	129
Nr5a1	ND	ND	ND

代謝	全動物		
アイソフォーム	100ppm	1000ppm	1600ppm
POR	97	↑272	↑409
Cyp2b2	↑1575	↑39444	↑48607
Cyp3a3 <sup>注)</sup>	129	↑4089	↑7840
Akr1d1	111	↑130	↑178
Akr1c18	114	79	145
Srd5a1	104	↓79	↓70
Srd5a2	ND	ND	ND

表中の数値は遺伝子転写物の対照群に対する割合(%)、nc：変化なし  
 ↑ ↓ : p<0.05 , ↑↓ : p<0.01 (T検定)

肝臓では、ステロイドホルモン産生に関与する遺伝子では、Cyp19a1 および Nr5a1 遺伝子発現を検出することができず、また、これ以外の遺伝子は弱く発現しただけであった。1600ppm 群において、StAR、Hsd3b1 および Cyp11a1 は統計学的有意差がないわずかな増加がみられた。

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。

代謝に関与する遺伝子は Akr1c18 および Srd5a2 を除いて容易に検出された。PDR、Cyp2b2、Cyp3a3<sup>註)</sup> および Akr1d1 の発現は用量に関連して増加し 1600ppm および 1000ppm 群では統計学的に有意であった。Cyp2b2 は 100ppm 群においても統計学的有意差が認められた。Srd5a1 の発現は 1600ppm および 1000ppm 群では統計学的に有意に減少した。

本試験の所見の概要を以下に要約する。

1. 1600ppm 群では一般症状の変化（やせ、脱毛）が認められ、1600 および 1000ppm 群では摂餌量の減少、体重増加抑制が認められ、最終体重は対照群と比較してそれぞれ 10% および 15% 減少した。摂餌量は 100ppm 群においてもわずかに減少した。また、1600ppm および 1000ppm 群では肝臓の実重量および対体重比ともに有意に増加し、剖検では肝臓の肥大、暗色化が認められた。
2. 膣塗抹標本及び子宮と膣の病理組織学的検査において発情周期に投与に起因する変化はみられなかった。
3. 肝臓の薬物代謝酵素は、1600ppm および 1000ppm 群において総 P450 量、BRD および PROD 活性の用量に関連した増加が認められた。これらの酵素活性の増加は 1600ppm および 1000ppm 群の肝臓サンプルにおいて PDR、Cyp2b2 および Cyp3a3<sup>註)</sup> の遺伝子発現が増加したことと一致する。
4. 肝臓アロマトラーゼ酵素測定を 2 つの方法を用いて実施したが矛盾する結果が得られた。トリチウム水生成量から推測する間接的な方法では 1600ppm および 1000ppm 群ともに有意な増加がみられ、肝臓アロマトラーゼ酵素活性の明らかな増加が示された。一方、エストラジオール産成量を測定する直接的な方法ではこの酵素が存在しないことが示された。さらにアロマトラーゼをコード化する遺伝子は肝臓サンプルから検出できなかった。これらの矛盾する結果はこの 2 種類の方法の特異性の差に原因がある可能性が高いと考えられた。
5. 血漿中のホルモン濃度では投与に起因する変化がみられた。プロゲステロンは有意な差はなかったがいずれの投与群でも増加した。エストラジオールは 1600ppm および 1000ppm 群で有意に増加した。FSH は 1600ppm 群で統計学的に有意ではないが増加した。
6. これらのホルモン濃度に関連して、卵巣および肝臓におけるステロイド性ホルモン合成の調節に関するさまざまな遺伝子発現が変化した。卵巣では Cyp17a1（プロゲス

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。

テロンのアンドロステンジオンへの転換) および *Akr1c18* (プロゲステロンの 20- $\alpha$ -ヒドロプロゲステロンへの転換) の用量に関連した増加が認められ、発情後期/発情間期の動物ではこの変化はより顕著であった。肝臓では、*StAR* (コレステロールのミトコンドリア内膜への輸送)、*Cyp11a1* (コレステロールのプレグネノロンへの転換) および *Hsd3b1* (プレグネノロンのプロゲステロンへの転換) が統計学的有意差のないわずかな増加を示した。*Akr1d1* (テストステロンの 5- $\beta$ -ジヒドロテストステロンへの転換) は 1600 および 1000ppm 群で有意に増加した。*Srd5a1* (テストステロンの 5- $\alpha$ -ジヒドロテストステロンへの転換) の発現は 1600ppm および 1000ppm 群では統計学的に有意に減少した。

以上のことから、1600ppm および 1000ppm の濃度で 28 日間混餌投与後に認められた肝酵素活性の増加、血漿中のステロイド性ホルモン濃度の変化およびステロイド性ホルモン合成の調節に関与するいくつかの遺伝子の発現の有意な増加はいずれも検体の投与に起因するものであり、生物学的に意味のある変化と考えられた。

#### [申請者追記]

検体がステロイド性ホルモン産生に影響することから性ホルモンバランスの異常が示唆されたが、膣塗抹標本および子宮と膣の病理組織学的検査において発情周期に影響は認められず、検体によるこれらのホルモンバランスの変化が生体に悪影響を与えないように維持されることが可能であると考えられた。

注) : [申請者追記] *CYP3A3* は、現在は *CYP3A23/3A1* である。

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

チアクロプリドの老齢成獣ラットを用いた飼料混入投与による 28 日間経口毒性試験  
(資料No. 原体-18-8)

試験機関：

報告書作成年月日： 2009 年 12 月 3 日

検体の純度 : 98.7%

試験動物 : ウィスター系ラット、1 群雌 25 匹

試験開始時；雌 72 週齢(357~470g)

試験期間 : 28 日間 (2008 年 12 月 9 日~2009 年 1 月 9 日)

【目的】

本試験の目的は、ラット子宮腺癌の作用機序の解明に供するため、検体を雌の老齢成獣に 28 日間混餌投与し、血漿中のステロイド性ホルモン濃度に影響を与えるか否かを決定することである。このため、若齢ラットにおいてホルモン変化を誘発することが既に明らかになっている試験条件を用いて、血漿中のステロイド性ホルモン濃度に及ぼす影響を調べ、また、発情周期段階を決定するために子宮および膣の病理組織学的検査を実施した。

【投与方法】

検体を、0(対照群)、1000 ppm の濃度で飼料に混入し、28 日間にわたって摂食させた。

投与用量設定の根拠；

本試験の用量設定として、90 日間反復経口投与毒性試験 (資料No. 原体-9)、発がん性試験 (資料 No. 原体-18) および若齢成獣を用いた 28 日間混餌試験 (資料 No. 原体-18-7) をもとにした。

【試験項目及び結果】

1) 臨床症状及び死亡率

生死を少なくとも 1 日 2 回観察した。全動物について、症状の性質、発現時期、重症度、回復性および持続時間、排泄などについて 1 日 1 回以上観察し、詳細な身体検査を週 1 回実施した。

投与群 1 匹を動物福祉の見地から試験 21 日目に屠殺した。

投与群の全動物が、試験 8 日以降糞量が少ないかまたは全く糞をしなかった。ま

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。

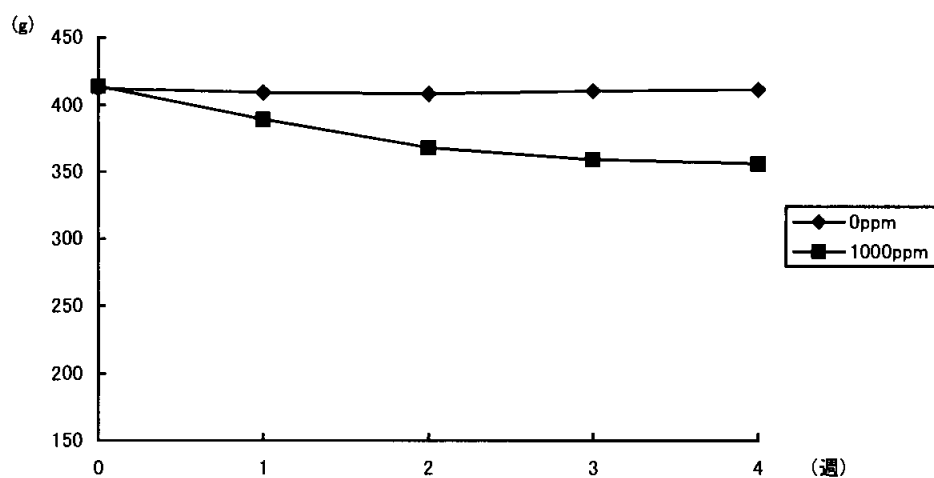
た数匹にやせが観察され、1匹に被毛の汚れ、別の1匹に運動量の低下が観察された。

## 2) 体重 (図 1)

投与初日とその後週 1 回すべての生存動物の体重を測定した。また、計画剖検前に測定した (最終体重)。

投与群では、対照群と比較して統計学的に有意に低下し、対照群と比較して 4.9% ( $p < 0.05$ , T 検定、試験 8 日) ~ 13.4% ( $p < 0.01$ , T 検定、試験 29 日) 減少した。

図 1



## 3) 摂餌量及び検体摂取量

全動物の摂餌量を週 1 回個体毎に測定した。

投与群では試験期間を通じて統計学的に有意に摂餌量が減少した。

検体摂取量は、次の表 1 に示した。

表 1 検体摂取量 (mg/kg/日)

投与量 (ppm)	1000
検体摂取量 (mg/kg/日)	31.5

#### 4) 膣塗抹標本

試験 1 日目と剖検直前に膣垢を採取し、膣の上皮細胞構造の評価に基づいた発情周期を調べた。

投与開始時と終了時の膣垢を比較したところ投与による発情周期への影響はみられなかった。

しかしながら、老齢ラットではエストラジオール/プロゲステロン比の生理学的変化が起こるため、その後、発情段階の長期化あるいは黄体期（反復性偽妊娠）の長期化といった発情周期に変化がみられる。したがって、若齢ラットで確立された発情周期の標準段階（発情前期、発情期、発情後期、発情間期）は老齢ラットには当てはまらないことから、老齢ラットにおける発情周期の評価には子宮および膣の病理組織学的評価が必要となった。この結果については、7) の病理組織学的検査の項に記載した。

#### 5) ホルモン分析

採血は剖検日にイソフルラン吸入により深部麻酔した動物の腹部大動脈より行った。なお、ホルモン濃度のばらつきを最小限に抑えるために、採血は 8 時 30 分から 11 時の間に行った。

プロゲステロン、テストステロンおよびエストラジオールの濃度は、リチウムヘパリン加血漿を検査試料とし、特異的ラジオイムノアッセイキットを用いて測定をした。

表 2 血漿中のホルモン濃度

発情周期の段階	動物数		プロゲステロン	エストラジオール	E/P 比
	対照群	投与群			
全段階	25	23	106	113	105
連続発情期	9	6	149	96	117
反復性偽妊娠期+ 不明瞭期	15	12	72	↑ 119	128

↓ ↑ :  $p < 0.05$  (T 検定)

表中の数値は、対照群に対する変動率 (%)

加齢による発情周期の変化は血漿中のエストラジオールおよびプロゲステロン濃度の変化と関連があり、特に、これら 2 つのホルモンの比と関連があるため、発情周期の段階とは無関係に、この試験で観察された周期の主要段階（連続発情期、

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。

不明瞭期<sup>注)</sup>を含む反復性偽妊娠期)にしたがって、分析した。

プロゲステロンの測定結果は、いずれの群においても大きなばらつきがあったため、プロゲステロン濃度の上昇(特に連続発情期)の重要性は明らかとはならなかった。

エストラジオールは、全段階の場合わずかに増加し、この傾向は反復性偽妊娠期と不明瞭期を併せて検討したときに統計学的に有意に明らかに上昇した。この上昇は投与と関連性があると考えられた。

テストステロンは、いずれの群においても大部分の動物から検出できなかった。

#### 6) 剖検および臓器重量

全生存動物はイソフルラン吸入による深麻酔下で放血後、主な臓器、組織および体腔を剖検した。また、以下の臓器を摘出し、重量を測定し、それらの対体重比も算出した。

肝臓、卵巣、子宮(頸部含む)、副腎。

表3 臓器重量(有意差の認められた項目)

投与量(ppm)		1000
最終体重		↓ 86
肝臓	実重量	
	対体重比	↑ 115

↑ ↓ :  $p < 0.05$ 、↑ ↓ :  $p < 0.01$  (T検定)、

表中の数値は対照群に対する変動率(%)

最終体重については対照群と比較して統計学的に有意に低下した。

肝臓対体重比が統計学的に有意に増加した。その他の臓器では対照群に比しいずれも重量に変化はみられなかった。

1匹の切迫屠殺動物には肉眼的所見は認められなかった。また計画殺動物にも投与による変化は認められなかった。

<sup>注)</sup> 膣と子宮の形態学的所見における発情段階が一致しない



### 7) 病理組織学的検査

全生存動物から以下の組織を採取し、子宮、膣および副腎（片側）を10%中性緩衝ホルマリンで固定後、組織学的検査用切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色(H&E)を施し、発情周期を確定するために生存動物の子宮と膣の病理組織学的検査を実施した。

肝臓、子宮（頸部を含む）、膣、卵巣、副腎

表4 子宮および膣における発情周期の段階

投与群 (ppm)	0	1000
検査動物数	25	22
発情周期 連続発情期	9 (36%) E <sub>2</sub> :P=2.2	6 (27.3%) E <sub>2</sub> :P=2.6
反復性偽妊娠期	13 (52%) E <sub>2</sub> :P=0.65	6 (27.3%) E <sub>2</sub> :P=0.64
連続発情休止期	1 (4%)	2 (9.1%)
発情前期	0	2 (9.1%)
不明瞭な発情周期	2 (8%) E <sub>2</sub> :P=0.9	6 (27.3%) E <sub>2</sub> :P=1.1

対照群の動物では、連続発情期(プロゲステロン濃度が低いので E<sub>2</sub>:P 比が高い状態)または反復性偽妊娠期(プロゲステロン濃度が上昇するので E<sub>2</sub>:P 比が低下した状態)にあることが観察された。これに対して投与群では、対照群と比較して偽妊娠期の動物数は少なく、また、不明瞭な発情周期の動物数が増加した。

表5 膣上皮の粘液化の程度

投与群 (ppm)	0	1000
検査動物数	25	22
粘液化 軽微	4	5
軽度	3	2
中等度	9	0
合計	16 (64%)	7 (31.8%)
膣粘液化の動物で反復性偽妊娠期の動物数	13/16 (81.25%)	5/7 (71.4%)

投与群では、膣上皮の粘液化の程度が、対照群と比較して低かった。膣上皮の粘液化は発情周期の段階を明らかにするのに有効な基準であるため、この結果は投与群のほ

うが不明瞭段階の発生が多いことを示している。

膣上皮の粘液化は、主として反復性偽妊娠期段階の動物で観察された。反復性偽妊娠期の動物数は、対照群より投与群のほうが少なかったため、投与群における膣上皮粘液化の発生率低下は重要性がないと考えられた。

本試験の所見の概要を以下に要約する。

1. 投与群では、動物福祉の見地から1匹を切迫屠殺した。一般症状の変化（糞の減少、やせ等）、摂餌量の減少、体重増加抑制が認められ、最終体重は対照群と比較して14%減少した。肝臓の対体重比が有意に増加した。
2. 血漿中のホルモン濃度では、エストラジオールが、発情期のさまざまな段階とは無関係に検討した場合（全動物）わずかに増加し、この傾向は反復性偽妊娠期と不明瞭期の雌を併せて検討したときに統計学的に有意に明らかに増加した。この増加は投与と関連性があると考えられた。プロゲステロンは個体間に大きなばらつきがあったため、投与による変化かどうか不明であった。テストステロンはいずれの群においても多くの動物で検出できなかった。
3. 発情周期の段階を確定するための子宮および膣の顕微鏡検査結果では、投与群のほうが対照群より反復性偽妊娠の発生率が少なかった。また、不明瞭な周期を示す動物の発生率は投与群のほうが多く、さらに膣上皮の粘液化の程度は対照群の動物よりも低かった。

以上のことから、72週の老齢ラットに1000ppmの濃度で28日間混餌投与後に認められた血漿中のエストラジオール濃度のわずかな増加、発情周期および膣上皮粘液化の程度の変化はいずれも検体の投与に起因するものであり、生物学的に意味のある変化と考えられた。

[申請者追記]

なお、検体が発情周期および膣上皮粘液化の程度に影響を及ぼした点で若齢成獣動物（資料No. 原体-18-7）に対する影響とは異なっていた。

☆以上の発がん性メカニズム試験（資料No. 原体-18-1～18-8）に基づいた子宮腺癌の発生メカニズムに関する考察は主所見の考察の「反復投与試験で観察された主な所見に対する考察」の子宮・腺癌に記載した。

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。

(3) チアクロプリドのマウスを用いた発がん性試験

(資料No. 原体-19)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 1998年3月5日

検体の純度： 97.2%

試験動物： B6C3F<sub>1</sub>系

[試験開始時 5~6 週齢、平均体重 雄；21g、雌；17g]

主群： 1 群雌雄各 50 匹

衛星群：雌雄各 10 匹 (0ppm と 2500ppm 群のみ / 1 年後に計画屠殺)

試験期間： 24 ヶ月 (1995年5月~1997年5月)

#### 【試験方法】

検体を 0 (対照群)、30、1250 及び 2500ppm となるように粉末飼料 (1% のピーナッツ油添加) に混ぜ 24 ヶ月間マウスに投与した。検体を混入した飼料は週毎に調製した。

#### 用量設定の根拠；

上記投与用量は、検体を 0 (対照群)、50、250、1250 及び 6250ppm の濃度で 14 週間、混餌投与した亜急性経口毒性試験 (資料 No. 原体-10) の結果に基づいて設定した。その結果において、6250ppm 群の雄で統計学的に有意な低体重 (14%) がみられ、1250 及び 6250ppm 群の雄で摂餌量が増加した。250ppm 雄群と 1250 及び 6250ppm 雌雄群において、ビリルビン (1250 及び 6250ppm 雌雄群)、コレステロール (6250ppm 雌雄群)、蛋白及びアルブミン濃度 (6250ppm 雌群) の減少、ならびに血漿中トリグリセリド量の増加 (6250ppm 雄群) や肝臓の組織サンプルにおける N-デメチラーゼ活性 (250ppm 雄群と 1250 及び 6250ppm 雌雄群) 及びチトクローム P450 量 (1250 及び 6250ppm 雌雄群) の増加に基づく肝機能への影響がみられた。このことは、肝臓重量の増加 (1250 及び 6250ppm 雌雄群) 及び適応性肝細胞肥大 (250ppm 雄群と 1250ppm 以上の雌雄群) と関連していた。さらに、腎臓の近位尿細管における性特異的 (雄) な空胞化が減少/消失もみられた (1250 及び 6250ppm 雄群)。

これらの結果に基づき、本試験における投与用量を 0、30、1250、2500ppm と設定した。

## 【試験項目及び試験結果】

### 1) 臨床症状

動物を少なくとも1日2回（週末と休日は1回）観察し、臨床症状と異常を記録した。各個体の詳細な検査は週1回実施した。

その結果、全ての用量群において、体表面、天然孔、一般行動、姿勢、呼吸及び排泄物に検体投与に関連した所見は認められなかった。

### 2) 死亡率(表 1-1, 1-2, 図 1-1, 1-2)

雌雄共に 2500ppm 群まで、死亡率に関して影響を示さなかった。

なお、中間検査動物では、対照群雌 1 例が計画屠殺前に死亡した。また最終計画屠殺動物における死亡数及び死亡率は以下のとおりであった。

表 1-1. 死亡数 (主群)

性	雄				雌			
動物数	50				50			
用量 (ppm)	0	30	1250	2500	0	30	1250	2500
1-749 日	3(2)	11(2)	3(4)	4(5)	15	19(2)	17(2)	17(3)

( ) 血液サンプル採取により死亡した動物数

表 1-2. 死亡率 (主群)

用量 (ppm)		0	30	1250	2500
死亡率 (%)	雄	6	22	6	8
	雌	30	38	34	34

血液サンプル採取により死亡した動物数を除く

### 3) 体重(図 1-1, 1-2)

投与開始前から試験 13 週まで週 1 回の間隔で、試験 15 週から試験終了時まで 2 週間に 1 回の間隔で生存動物の体重を測定した。

更に、臓器重量の対体重比を算出するため、剖検直前にも体重を測定した。

これらのデータから、雌全投与群及び 1250ppm 以下の雄群における体重は、対照群と同等であった。2500ppm 雄群において、検体投与に関連した低体重（最大 9%）が認められ、約 31 週時から統計学的に有意となった。雌の平均体重（全用量群）において散発的な統計学的有意差がみられたが、これは対照群の平均体重よりも高い値を示したり、あるいは試験開始時に軽度な低体重が認められたためであり（1250 及び 2500ppm）、検体投与に関連したものとは考えなかった。

図 1-1 体 重(主群 雄)

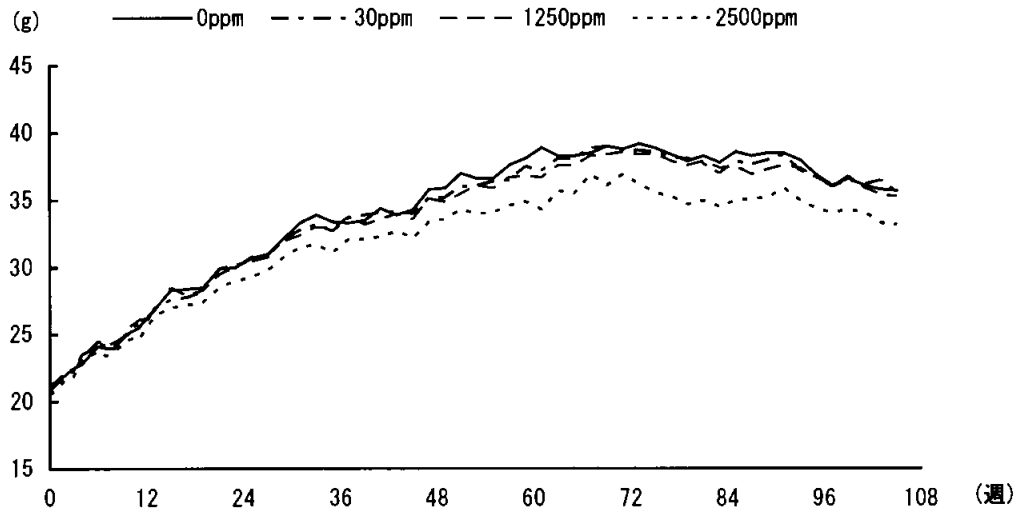
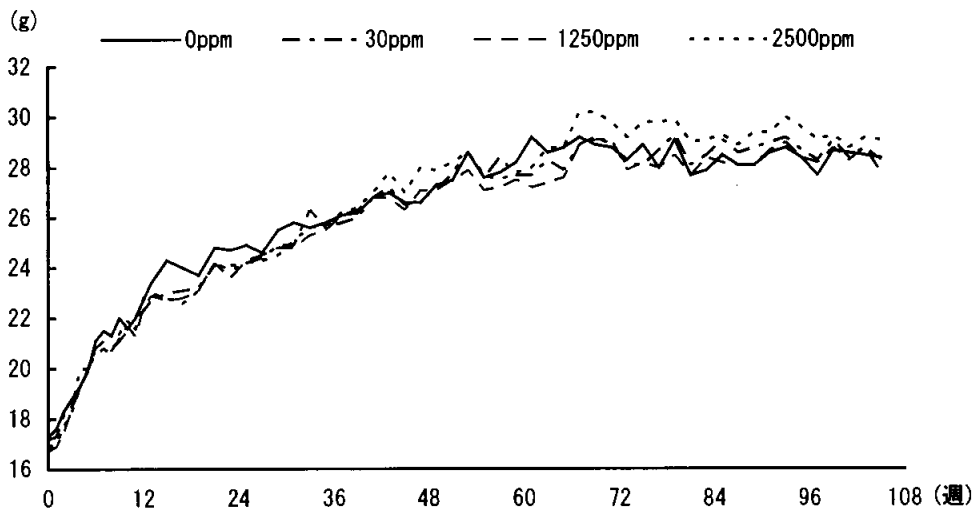


図 1-2 体 重(主群 雌)



4) 摂餌量及び検体摂取量 (表 2)

摂餌量を各群 20 匹について個体毎に 13 週まで週 1 回の間隔で、試験 17 週から試験終了時まで 4 週間に 1 回の間隔で測定し、これを基に検体摂取量を算出した。

これらの結果から、摂餌量の平均値は、1250ppm 以下の雄群及び雌全用量群において対照群と同等であった。2500ppm 雄群において、動物当たりの摂餌量に 10% の増加が認められた。体重当たりの摂餌量は 21% 増加し、食餌効率の低下が示唆された。

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。

検体摂取量は 2500ppm までの用量においてほぼ設定の用量段階と相関した。  
以下に検体摂取量 (mg/kg/日) を示す。

表 2. 検体摂取量 (mg/kg/日)

投与量 (ppm)		30	1250	2500
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	5.7	234	546
	雌	10.9	475	872

5) 血液学的検査 (表 3)

最終屠殺用動物の全動物及び各群番号の若い順に選抜した 20 匹について、それぞれ、白血球及び白血球分画を 53 週、79 週、104/106 週に測定した。

血液サンプルには、非絶食、エーテル麻酔下の動物の眼窩静脈叢から朝採取した末梢血を用いた。

全ての検査週で、1250 及び 2500ppm 雄群における白血球数は、軽微だが統計学的に有意に増加した。30ppm 雄群 (104/106 週) において、平均白血球数は有意な低値を示したが、これは主に対照群の値が高かったためであり、毒性学的意義を欠いていると考えられた。雌における白血球数は、1250ppm (53 週) 及び 2500ppm (53 及び 79 週) で有意に増加した。試験終了時において統計学的有意差が認められず、また用量との関連性もなかったことから、これらの雌における白血球数の軽微な差を、生物学的に意義のある変化とは考えなかった。

白血球百分率において、平均単球数において有意差が見られたが (雌 79 週: 低下, 雄 104/106 週: 増加)、用量相関性がなかったため、この変化を毒性学的に意義のある変化とは考えなかった。その他の項目においても対照群との顕著な差は認められなかった。

表 3 血液学的検査 (有意差の認められた項目)

投与量 (ppm)	30	1250	2500	30	1250	2500	30	1250	2500
検査時期	53 週			79 週			104/106 週		
雄									
白血球		↑ 132	↑ 164		↑ 146	↑ 137	↓ 77	↑ 112	↑ 138
白血球分画									
単球							↑ 267	↑ 317	↑ 150
リンパ球							↓ 91		
雌									
白血球		↑ 128	↑ 122					↑ 138	
白血球分画									
単球				↓ 17	↓ 33	↓ 17			

↑ ↓ : p<0.05, ↑ ↓ : p<0.01 (ANOVA+Dunnett 検定)、表中の数値は、対照群に対する変動率 (%)

## 6) 剖検

途中死亡及び切迫屠殺動物、中間計画屠殺動物(1年)及び主群の全動物を剖検した。

### 6-1) 途中死亡及び切迫屠殺動物

途中死亡及び切迫屠殺動物において、雌雄共に検体投与に関連した肉眼所見は認められなかった。

### 6-2) 衛星群 (1年)

中間計画屠殺動物において、雌雄共に検体投与に関連した肉眼所見は認められなかった。

### 6-3) 主群

卵巣の結節性病変の発生頻度が0、30、1250及び2500ppm群において、それぞれ1、4、4及び6と増加した。これらは主に検体投与とは関連のない農場で化膿性炎症を呈していた[8]病理組織学的検査の項参照]。

## 7) 臓器重量 (表4)

衛星群及び主群の脳、肝臓、脾臓、心臓、腎臓(両側)、副腎(両側)、卵巣(両側)及び精巣(両側)の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

脳、心臓、脾臓、腎臓、精巣及び卵巣の臓器重量は、対照群と比較して差がなかった。衛星群では、2500ppm雌群における副腎重量が、実重量及び対体重比共に有意に増加したが、主群では対照群と差がなかった。肝臓重量では、衛星群の2500ppm雌雄に、実重量、対体重比共に有意な増加が認められた。主群では1250ppm雌雄で、対体重比に有意な増加がみられ、2500ppm群では雄で対体重比に、雌で実重量、対体重比共に有意な増加が見られ、病理組織学的検査の結果も考え合わせ、検体による肝臓への影響が示唆された。

表4 臓器重量 (有意差の認められた項目)

性別		雄				雌			
検査時期		1年*	107週		1年*	107週			
投与量		2500	30	1250	2500	2500	30	1250	2500
体重					↓92				↑103
脳	実重量							↓97	
	対体重比				↑109				↓93
副腎	実重量					↑180			
	対体重比					↑170			
肝	実重量	↑125				↑133			↑129
	対体重比	↑132		↑108	↑117	↑132		↑109	↑123
腎	実重量	↓89							
	対体重比								
精巣	実重量					/	/	/	/
	対体重比				↑107	/	/	/	/

↑ ↓ : p<0.05, ↑ ↓ : p<0.01 (ANOVA+Dunnett 検定), 表中の数値は対照群に対する変動率(%), \*;動物数-10例

8) 病理組織学的検査 (表5~15)

1年後の中間屠殺動物、途中死亡及び切迫屠殺動物について以下の臓器、組織について病理組織学的検査を実施した。

肝臓、甲状腺、副腎、下垂体、腎臓、精巣、精巣上体、卵巣、卵管、子宮、膈、胆のう、前立腺、精嚢、上皮小体、気管、食道及び肉眼所見を有する全ての臓器

2年後の最終屠殺動物については、以上の臓器に加え、以下の臓器、組織について病理組織学的検査を実施した。

大動脈、骨[大腿骨、胸骨]、骨髓[大腿骨、胸骨]、脳、盲腸、結腸、十二指腸、外涙腺、眼、ハーダー氏腺、心臓、回腸、空腸、肺、リンパ節[顎下、腸間膜]、乳腺部分、膀胱、直腸、坐骨神経、骨格筋、皮膚、脊髄[頸部、胸部、腰部]、脾臓、胃、舌下腺、顎下腺、胸腺、舌、膀胱

8-1) 衛星群の非腫瘍性病変 (表5, 10)

2500ppm 群雄において、軽度から中等度の小葉中心性肝細胞肥大がみられた。また、肝細胞の脂肪沈着の発生頻度及び程度が増加した。

2500ppm 雄群の10例中8例において、腎臓の性特異的な尿細管空胞が軽度から重度に減少した。主群では、対照群と比較して組織学的な差は認められず、また同様な所見は、14週間の亜急性経口毒性試験(資料 No. 原体-10)において、1250ppm 群以上のマウスにも認められていることから、本所見は、非生理的なス



トレスに対する非特異的反応と考えられた。

2500ppm 雌群の全例において、副腎の X 帯が残存しており、X 帯空胞化域の拡張が認められた。対照群では、2 例に空胞化域の拡張が残り、他はこの X 帯空胞化域の拡張がほとんど完全に消失し、扁平化あるいは単層の細胞として髄質を取り囲んでいた。

表 5 中間計画屠殺動物の主要な非腫瘍性病変

	雄		雌	
	0ppm	2500ppm	0ppm	2500ppm
臓器・所見／検査例数	10	10	10	10
肝臓				
肝細胞肥大	0	10	0	0
空胞化	1	9	0	0
脂肪化	5	10	3	3
腎臓				
性特異的な尿細管空胞減少	0	8	0	0
副腎				
X 帯空胞化域の拡張	0	0	2	10

0=所見なし

#### 8-2) 主群の非腫瘍性病変 (表 6, 10)

多くの非腫瘍性病変が組織学的検査で認められた。その大部分はマウスの加齢性変化で、変性性、炎症性及び増殖性変化であった。

副腎、肝臓、顎下及び腸間膜リンパ節及び卵巣で以下のような検体投与による所見が認められた。

副腎では、皮質 X 帯の限局性ないしび慢性空胞化域の拡張の頻度が 1250ppm 以上の雌群で有意に増加した。X 帯は正常では一時的に存在し、本系統マウスの同年齢の動物では完全に消えてしまうことが知られている。すなわち雄マウスでは、性成熟に達すると急速に消失し、雌では、X 帯は 6 から 8 ヶ月齢までゆるやかに退縮するかあるいは最初の妊娠で急速に消失する。この空胞化域が 2 年間試験の最後まで存続したことは X 帯の退縮遅延のためと考えられる。本変化は、おそらくステロイドホルモン合成増加を誘導する肝機能の変化に基づく影響と考えられた。なお、対照群で認められた X 帯空胞化域拡張の高い発生頻度は群間差を明確にするために評価をグレード分けし、背景病変と考えられるような退縮した像であるグレード 1 も評価にいたためである。その他の変化には検体投与の影響は認められなかった。

肝臓では肝細胞肥大(1250 及び 2500ppm 雌雄群)、脂肪化(1250ppm 雄群、2500ppm

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。

雌雄群)、変性(細胞質の均一な好酸性変化、あるいはすり硝子状変化、2500ppm 雄群)及び壊死(2500ppm 雌雄群)などが主として小葉中心性に認められた。これらは、14 週間の亜急性経口毒性試験(資料 No. 原体-10)でみられたように、長期間にわたる肝薬物代謝酵素の誘導の結果であると考えられた。

卵巣において、剖検時の肉眼的検査で 15 例に認められた結節の組織学的検査では、9 例は投与とは無関係の化膿性炎症を呈する膿瘍で、6 例は増殖性変化(2 例は悪性リンパ腫及び 4 例は黄体腫)と診断された。また、黄体化細胞の増加が対照群に比較し 1250ppm 群以上で認められた。この変化は大型、好酸性の黄体化細胞の集簇が卵巣の間質及び周囲脂肪組織にみられるものであった。

他の臓器あるいは組織においても、種々の非腫瘍性病変が診断されたが、投与群におけるこれらの病変の頻度及び程度は対照群と有意に異なっていないか、あるいは頻度の差が偶発的に見られるにすぎなかった。

表 6 主群の主な非腫瘍性病変

性	雄				雌			
	0	30	1250	2500	0	30	1250	2500
用量(ppm)								
臓器/所見								
肝臓	検査例数:							
肝細胞肥大	50	50	50	50	49	48	50	50
脂肪化	§ 0	0	46++	49++	#0	0	2	3
変性(細胞質の均一な好酸性変化、あるいはすり硝子状変化)	§ 3	4	15++	21++	#2	3	3	7
壊死	§ 1	0	5	16++	0	0	0	0
副腎	検査例数:							
X 帯空胞化域の拡張	§ 5	3	6	31++	#15	17	17	25+
卵巣	検査例数:							
好酸性の黄体化細胞の発生頻度増加	49	50	50	50	49	48	50	50
	0	0	0	0	§ 33	36	48++	50++
	-	-	-	-	47	48	49	47
	-	-	-	-	§ 3	0	5	8

0=所見なし

傾向検定[Armitage 法]: #: p<0.05, §: p<0.01, 群間比較(Fisher 検定):+: p<0.05, ++: p<0.01

### 8-3) 衛生群の腫瘍性病変(表 11)

腫瘍性病変として、ハーダー氏腺で腺腫、皮膚で肉腫(鑑別診断せず)が対照群の雌各 1 例に認められた。これらの所見は、以前に実施した試験の同週齢マウスでよくみられるものであった。従って、本所見は自然発生のものと考えられた。

### 8-4) 主群の腫瘍性病変(表 7~9, 11)

2 年間投与動物において認められた全ての腫瘍を、発生頻度、組織型、良悪性及び部位について表 7、8 及び 11 に記載する。

これらの表から、1250 及び 2500ppm 群の雌において、卵巣の黄体腫の発生頻度が増加した (0-1-5-6)。30ppm 群でも、1 例(良性)に認められたが、その発生頻度は、背景データ範囲内\*(雌 50 例中、悪性黄体腫 1 例及び良性黄体腫 2 例 / 1988-1990, 試験番号: T2030315)にあった。これは、検体投与に起因したホルモンの不均衡に伴う影響と考えられた。

(※: 申請者註 1986~1996 年における 25 試験での総発生頻度は 良性黄体腫 6 例及び悪性黄体腫 1 例)

その他全ての腫瘍性病変において、総担腫瘍動物数及び投与期間中に死亡あるいは切迫屠殺した担腫瘍動物数並びに計画屠殺担腫瘍動物数についても用量関連性がなかった。さらに、試験期間中に死亡あるいは切迫屠殺した動物における良性及び悪性腫瘍の発生頻度は、2 年間試験後に屠殺した動物と同様に差がなかった。

表 9 に担腫瘍動物の発生時期を示したが、この表からもわかるように投与に関連した変化は認められなかった。

表 7 腫瘍数

性	雄				雌			
	0	30	1250	2500	0	30	1250	2500
用量 (ppm)	0	30	1250	2500	0	30	1250	2500
動物数	50	50	50	50	50	50	50	50
良性	20	18	16	14	22	17	26	22
悪性	10	21	13	8	34	26	23	31
合計	30	39	29	22	56	43	49	53

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 担腫瘍動物数(良性/悪性)

性	雄				雌			
用量(ppm)	0	30	1250	2500	0	30	1250	2500
動物数	50	50	50	50	50	50	50	50
途中死亡動物								
検査例数	5	13	7	9	14	19	19	20
担腫瘍動物数	3	10	3	3	13	14	13	14
良性腫瘍のみを有する動物数	1	1	2	0	1	3	1	2
悪性腫瘍のみを有する動物数	1	7	1	3	9	7	9	9
良・悪性腫瘍を有する動物数	1	2	0	0	3	4	3	3
主群								
検査例数	45	37	43	41	35	29	31	30
担腫瘍動物数	20	15	21	14	23	15	21	22
良性腫瘍のみを有する動物数	12	6	10	9	7	6	11	8
悪性腫瘍のみを有する動物数	4	6	8	2	9	7	5	10
良・悪性腫瘍を有する動物数	4	3	3	3	7	2	5	4
合計担腫瘍動物数	23	25	24	17	36	29	34	36

表 9 担腫瘍動物の発生時期

性	雄				雌			
用量(ppm)	0	30	1250	2500	0	30	1250	2500
日数/動物数	50	50	50	50	50	50	50	50
0 - 90	0	0	0	0	0	0	0	0
91 - 180	0	0	0	0	0	0	0	0
181 - 270	0	0	0	0	0	0	0	0
271 - 360	0	0	0	0	0	0	1	0
361 - 450	0	1	1	0	0	1	0	2
451 - 540	0	0	0	1	0	0	3	0
541 - 630	0	1	1	0	2	5	5	3
631 - 720	1	4	1	2	5	3	2	5
721 - 749	22	19	21	14	29	20	23	26
0 - 749	23	25	24	17	36	29	34	36

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。

以上の結果から、本剤のマウスに対する 24 カ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、2500ppm 群では体重増加の抑制、摂餌量および白血球数の増加(雄)、肝臓重量の増加(雌雄)、副腎重量の増加(雌)、小葉中心性肝細胞肥大(雌雄)、脂肪化(雌雄)、肝細胞壊死(雌雄)と肝細胞の変性<sup>注)</sup>(雄)の増加、副腎皮質の X 帯空胞化域拡張の出現頻度増加(雌)、卵巣の好酸性黄体化細胞数及び黄体腫の増加(雌)が認められた。1250ppm 群では白血球数の増加(雄)、肝臓重量の増加(雌雄)、小葉中心性肝細胞肥大(雌雄)、脂肪化(雄)、肝細胞の変性<sup>注)</sup>(雄)の増加、副腎皮質の X 帯空胞化域拡張の出現頻度増加(雌)、卵巣の好酸性黄体化細胞数及び黄体腫の増加(雌)が認められた。

したがって、本試験条件下における無毒性量(NOEL)は、30ppm(雄：5.7mg/kg/日、雌：10.9mg/kg/日)であると判断した。なお、本試験においてみられた腫瘍は、いずれも高用量投与による肝薬物代謝酵素の誘導に起因した病変であることが示唆された。

注)：[申請者追記] 細胞質の均一な好酸性変化、あるいはすり硝子状変化

表 10-1 主要な非腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄				雌				
	投与群 (ppm)	0	30	1250	2500	0	30	1250	2500	
	所見\検査動物数									
1年	肝臓	10	-	-	10	10*	-	-	10	
	肝細胞肥大	0	-	-	10	0	-	-	0	
	空胞化	1	-	-	9	0	-	-	0	
	脂肪化	5	-	-	10	3*	-	-	3	
	壊死	0	-	-	0	0	-	-	1	
	腎臓	10	-	-	10	10	-	-	10	
	性特異的な空胞化の減少	0	-	-	8	0	-	-	0	
	単核細胞浸潤	8	-	-	8	8*	-	-	9	
	副腎	10	-	-	10	10	-	-	10	
	X帯空胞化域の拡張	0	-	-	0	2	-	-	10	
	X帯の残存	0	-	-	0	6*	-	-	6	
	甲状腺	10	-	-	10	10	-	-	10	
	コロイド空胞	0	-	-	2	1	-	-	1	
	のう胞性ろ胞	0	-	-	1	3	-	-	2	
	精巣	10	-	-	10	/	/	/	/	
	精細管萎縮	6	-	-	4	/	/	/	/	
	子宮	/	/	/	/	10	-	-	10	
	腺房過形成/のう胞化	/	/	/	/	10*	-	-	10	
死亡・ 切迫 屠殺	<b>主群</b>									
	脳	5	13	7	9	14	19	19	20	
	大脳の鈣質沈着	5	7	4	6	9	11	8	14	
	単核細胞浸潤	1	0	0	0	2	0	0	1	
	脊髄	5	13	7	9	14	19	19	20	
	軸索変性	4	7	1	3	8	11	10	15	
	単核細胞浸潤	0	0	0	0	1	4	0	0	
	坐骨神経	5	13	7	9	14	19	19	19	
	ミエリン変性	3	9	2	3	12	8	11	14	
	気管	5	13	7	9	14	19	19	20	
	単核細胞浸潤	3	2	2	1	2	1	1	1	
	肺	5	13	7	9	14	19	19	20	
	うっ血	2	3	5	5	4	7	8	8	
	単核細胞浸潤	1	1	1	0	0	2	1	0	
	胃	5	13	7	9	14	19	19	20	
	腺拡張	0	8	3	2	7	11	7	11	
	単核細胞浸潤	3	9	5	7	8	14	8	9	
	のう胞	0	1	0	0	3	1	0	1	
盲腸	5	13	7	9	14	19	19	19		
リンパ様過形成	0	1	0	1	2	3	0	0		

\*:途中死亡動物1匹を含む。

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 10-2 主要な非腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	30	1250	2500	0	30	1250	2500
	所見\検査動物数								
死 亡 ・ 切 迫 屠 殺	肝臓	5	13	7	9	14	19	19	20
	肝細胞肥大	0	0	4	8	0	0	1	1
	空胞化	0	0	0	0	0	2	0	1
	脂肪化	0	0	2	4	2	3	2	2
	壊死	0	2	0	4	4	5	3	7
	膵臓	5	12	7	9	14	19	19	20
	単核細胞浸潤	0	5	1	0	10	6	7	10
	腎臓	5	13	7	9	14	19	19	20
	単核細胞浸潤	4	13	5	7	12	15	17	15
	尿細管空胞化	5	13	7	9	0	0	0	0
	好塩基性尿細管 のう胞	4	5	5	3	0	2	1	3
	のう胞	0	2	1	1	0	0	0	0
	卵巣	/	/	/	/	13	19	18	17
	のう胞	/	/	/	/	9	12	7	6
	好酸性黄体化細胞の増加	/	/	/	/	1	0	0	1
	子宮	/	/	/	/	14	19	19	20
	のう胞性過形成	/	/	/	/	13	18	16	18
	間質過形成	/	/	/	/	1	0	0	0
	下垂体	5	13	7	9	13	18	14	17
	過形成	0	0	0	0	2	0	2	0
	副腎	5	13	7	9	14	19	19	20
	X 帯空胞化域の拡張	0	0	0	0	9	16	17	20
	X 帯の萎縮	0	0	0	0	14	19	14	17
	脾臓	5	13	7	9	14	19	19	20
	リンパ様過形成	2	4	2	2	2	2	4	1
	胸腺	4	12	7	9	11	15	15	15
	萎縮	1	3	1	1	3	3	3	1
	腸間膜リンパ節	5	12	6	9	14	15	15	19
	空胞化	2	4	5	4	2	3	7	8
	顎下リンパ節	5	13	6	9	13	18	18	17
空胞化	1	5	5	7	2	5	7	5	
ハーダー氏腺	5	13	7	9	14	19	19	20	
単核細胞浸潤	4	6	3	3	11	13	13	13	
乳腺	5	13	7	9	12	17	13	16	
腺房過形成	0	0	0	0	0	0	0	2	

表 10-3 主要な非腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	30	1250	2500	0	30	1250	2500
	所見\検査動物数								
最 終 屠 殺	脳	45	37	43	41	35	29	31	30
	大脳の鉍質沈着	38	27	34	33	28	16	24	23
	単核細胞浸潤	0	2	2	1	4	5	2	1
	脊髄	45	37	42	41	34	29	31	29
	軸索変性	35	32	38	36	25	23	24	24
	単核細胞浸潤	4	2	2	1	7	5	7	4
	坐骨神経	44	37	43	39	35	29	31	29
	ミエリン変性	39	34	40	38	35	29	31	29
	気管	45	37	43	41	35	29	31	30
	単核細胞浸潤	17	18	25	20	3	4	4	8
	肺	45	37	43	41	35	29	31	30
	うっ血	3	0	0	0	1	1	1	1
	単核細胞浸潤	3	5	8	6	8	11	7	6
	胃	45	37	43	41	35	29	31	30
	腺拡張	30	29	25	23	23	19	21	16
	単核細胞浸潤	40	33	40	35	32	28	30	25
	のう胞	8	6	12	4	7	3	5	3
	盲腸	45	37	43	41	35	29	31	30
	リンパ様過形成	6	5	1	6	1	2	2	1
	肝臓	45	37	43	41	35	29	31	30
	肝細胞肥大	0	0	42	41	0	0	1	2
	空胞化	1	0	1	0	2	0	2	2
	変性 <sup>注)</sup>	1	0	5	16	0	0	0	0
	脂肪化	3	4	13	17	0	0	1	5
	壊死	5	1	6	27	11	12	14	18
	脾臓	45	37	43	41	35	29	31	30
	単核細胞浸潤	29	22	26	24	27	21	28	25
腎臓	45	37	43	41	35	29	31	30	
単核細胞浸潤	45	37	43	41	32	29	29	29	
尿細管空胞化	45	37	43	41	0	0	0	0	
好塩基性尿細管 のう胞	44	36	42	40	12	8	15	10	
のう胞	18	14	18	10	0	1	0	0	
精巣	45	37	43	41	-	-	-	-	
精細管萎縮	0	1	1	3	-	-	-	-	
卵巢	/	/	/	/	34	29	31	30	
のう胞	/	/	/	/	23	14	13	17	
好酸性黄体化細胞の増加	/	/	/	/	2	0	5	7	
子宮	/	/	/	/	35	29	31	30	
のう胞性過形成	/	/	/	/	35	29	30	28	
間質過形成	/	/	/	/	1	0	1	0	

注) : [申請者追記] 細胞質の均一な好酸性変化、あるいはすり硝子状変化



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 10-4 主要な非腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	30	1250	2500	0	30	1250	2500
	所見\検査動物数								
最 終 屠 殺	下垂体	45	37	43	40	35	29	31	30
	過形成	2	2	0	0	7	8	8	3
	副腎	44	37	43	41	35	29	31	30
	X 帯空胞化域の拡張	0	0	0	0	24	20	31	30
	X 帯の萎縮	0	0	0	0	34	29	30	29
	脾臓	45	37	43	41	35	29	31	30
	リンパ様過形成	29	21	23	21	18	22	21	15
	胸腺	39	33	35	40	35	27	29	29
	萎縮	0	0	0	3	0	1	1	3
	腸間膜リンパ節	45	37	43	41	35	29	31	29
	空胞化	29	29	42	39	16	14	27	27
	顎下リンパ節	38	37	43	37	35	27	31	28
	空胞化	27	31	40	28	17	15	20	26
	ハーダー氏腺	45	37	43	41	35	29	31	30
	単核細胞浸潤	33	30	37	32	29	21	23	25
	乳腺	45	37	43	41	35	29	31	29
腺房過形成	0	0	0	0	0	0	3	0	
全 動 物	脳	50	50	50	50	49	48	50	50
	大脳の鉍質沈着	43	34	38	39	37	27	32	37
	単核細胞浸潤	1	2	2	1	6	5	2	2
	脊髄	50	50	49	50	48	48	50	49
	軸索変性	39	39	39	39	33	34	34	39
	単核細胞浸潤	4	2	2	1	8	9	7	4
	坐骨神経	49	50	50	48	49	48	50	48
	ミエリン変性	42	43	42	41	47	37	42	43
	気管	50	50	50	50	49	48	50	50
	単核細胞浸潤	20	20	27	21	5	5	5	9
	肺	50	50	50	50	49	48	50	50
	うっ血	5	3	5	5	5	8	9	9
	単核細胞浸潤	4	6	9	6	8	13	8	6
	胃	50	50	50	50	49	48	50	50
	腺拡張	30	37	28	25	30	30	28	27
	単核細胞浸潤	43	42	45	42	40	42	38	34
	のう胞	8	7	12	4	10	4	5	4
	盲腸	50	50	50	50	49	48	50	49
	リンパ様過形成	6	6	1	7	3	5	2	1

傾向検定[Armitage 法] : #; p<0.05, §; p<0.01, 群間比較(Fisher 検定) : +; p<0.05, ++; p<0.01

表 10-5 主要な非腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	30	1250	2500	0	30	1250	2500
	所見\検査動物数								
全 動 物	肝臓	50	50	50	50	49	48	50	50
	肝細胞肥大	§ 0	0	46++	49++	#0	0	2	3
	空胞化	1	0	1	0	2	2	2	3
	変性 <sup>注)</sup>	§ 1	0	5	16++	0	0	0	0
	脂肪化	§ 3	4	15++	21++	#2	3	3	7
	壊死	§ 5	3	6	31++	#15	17	17	25+
	膵臓	50	49	50	50	49	48	50	50
	単核細胞浸潤	29	27	27	24	37	27	35	35
	腎臓	50	50	50	50	49	48	50	50
	単核細胞浸潤	49	50	48	48	44	44	46	44
	尿細管空胞化	50	50	50	50	0	0	0	0
	好塩基性尿細管 のう胞	48	41	47	43	12	10	16	13
	のう胞	18	16	19	11	0	1	0	0
	精巣	50	50	50	50	/	/	/	/
	精細管萎縮	0	1	1	3	/	/	/	/
	卵巣	/	/	/	/	47	48	49	47
	のう胞	/	/	/	/	32	26	20	23
	好酸性黄体化細胞の増加	/	/	/	/	§ 3	0	5	8
	子宮	/	/	/	/	49	48	50	50
	のう胞性過形成	/	/	/	/	48	47	46	46
	間質過形成	/	/	/	/	2	0	1	0
	下垂体	50	50	50	49	48	47	45	47
	過形成	2	2	0	0	9	8	10	3
	副腎	49	50	50	50	49	48	50	50
	X 帯空胞化域の拡張	0	0	0	0	§ 33	36	48++	50++
	X 帯の萎縮	0	0	0	0	48	48	44	46
	脾臓	50	50	50	50	49	48	50	50
	リンパ様過形成	31	25	25	23	20	24	25	16
	胸腺	43	45	42	49	46	42	44	44
	萎縮	1	3	1	4	3	4	4	4
腸間膜リンパ節	50	49	49	50	49	44	46	48	
空胞化	§ 31	33	47++	43++	§ 18	17	34++	35++	
顎下リンパ節	43	50	49	46	48	45	49	45	
空胞化	#28	36	45++	35	§ 19	20	27	31++	
ハーダー氏腺	50	50	50	50	49	48	50	50	
単核細胞浸潤	37	36	40	35	40	34	36	38	
乳腺	50	50	50	50	47	46	44	45	
腺房過形成	0	0	0	0	#0	0	3	2	

傾向検定 [Armitage 法] : #; p<0.05, §; p<0.01, 群間比較 (Fisher 検定) : +; p<0.05, ++; p<0.01

注) : [申請者追記] 細胞質の均一な好酸性変化、あるいはすり硝子状変化

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 11-1 腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	30	1250	2500	0	30	1250	2500
	所見\検査動物数								
1年	ハーダー氏腺	0	-	-	0	1	-	-	0
	腺癌 (m)	0	-	-	0	1	-	-	0
	皮膚	0	-	-	1	1*	-	-	2
	肉腫 (b)/鑑別診断せず	0	-	-	0	1*	-	-	0
死 亡 ・ 切 迫 屠 殺	主群								
	脳	5	13	7	9	14	19	19	20
	神経膠星状細胞腫 (b)	0	0	0	0	0	1	0	0
	肺	5	13	7	9	14	19	19	20
	肺腺腫 (b)	0	2	0	0	0	0	0	0
	肺癌 (m)	0	0	0	1	0	0	0	0
	肝臓	5	13	7	9	14	19	19	20
	肝細胞腺腫 (b)	0	0	1	0	1	0	0	1
	肝細胞癌 (m)	0	1	0	0	0	0	0	0
	血管肉腫 (m)	0	1	0	0	0	0	0	0
	膵臓	5	12	7	9	14	19	19	20
	島細胞腺腫 (b)	0	0	0	0	0	0	0	1
	卵巣	/	/	/	/	13	19	18	17
	黄体腫 (b)	/	/	/	/	0	0	0	1
	黄体腫 (m)	/	/	/	/	0	0	0	1
	のう胞腺腫 (b)	/	/	/	/	0	0	0	1
	子宮	/	/	/	/	14	19	19	20
	間質ポリープ (b)	/	/	/	/	2	0	0	0
	扁平上皮癌 (m)	/	/	/	/	0	0	1	0
	間質細胞肉腫 (m)	/	/	/	/	0	0	1	2
	血管腫 (b)	/	/	/	/	0	1	0	0
	血管肉腫 (m)	/	/	/	/	0	1	0	1
	下垂体	5	13	7	9	13	18	14	17
	腺腫 (b)	0	1	1	0	0	3	2	1
	癌 (m)	0	1	0	0	0	0	0	0
	甲状腺	5	13	7	9	14	19	19	20
	ろ胞腺腫 (b)	0	0	0	0	0	0	1	0
	C-細胞腺腫 (b)	0	0	0	0	0	0	0	1
	副腎	5	13	7	9	14	19	19	20
	被膜下腺腫 (b)	0	1	0	0	0	0	0	0
血液リンパ網内系	2	4	0	2	10	10	8	10	
悪性リンパ腫 (m)	2	2	0	2	5	6	4	6	
組織球肉腫 (m)	0	1	0	0	5	4	4	3	
悪性線維性組織球腫 (m)	0	1	0	0	0	0	0	1	

\*:途中死亡動物, (b)=良性 (m)=悪性 0=所見なし

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。

表 11-2 腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	30	1250	2500	0	30	1250	2500
	所見\検査動物数								
死亡 ・ 切迫 屠殺	脾臓	5	13	7	9	14	19	19	20
	血管肉腫 (m)	0	2	0	0	2	1	0	0
	骨髓	5	13	7	9	14	19	19	20
	血管肉腫 (m)	0	0	0	0	0	1	0	0
	腸間膜リンパ節	5	12	6	9	14	15	15	19
	血管腫 (b)	0	0	0	0	0	0	0	1
	血管肉腫 (m)	0	0	0	0	1	0	0	0
	ハーダー氏腺	5	13	7	9	14	19	19	20
	腺腫 (b)	2	0	0	0	0	1	1	0
	腺癌 (m)	0	0	0	0	0	1	0	0
	乳腺	5	13	7	9	12	17	13	16
	腺腫 (b)	0	0	0	0	0	1	0	0
	腺癌 (m)	0	0	1	0	1	1	0	0
	皮膚/皮下組織	5	13	7	9	14	19	19	20
	線維肉腫 (m)	0	0	0	0	0	0	1	0
	血管腫 (b)	0	0	0	0	1	0	0	0
	骨格筋	5	13	7	9	14	19	19	20
	黄紋筋肉腫 (m)	0	1	0	0	0	0	0	0
	骨 不特定	0	1	0	0	1	0	1	0
	骨肉腫 (m)	0	0	0	0	0	0	1	0
血管腫 (b)	0	0	0	0	1	0	0	0	
骨 (大腿骨)	5	13	7	9	14	19	19	20	
血管肉腫 (m)	0	1	0	0	1	0	0	0	
最終 屠殺	肺	45	37	43	41	35	29	31	30
	肺腺腫 (b)	5	2	5	5	2	1	1	1
	肺癌 (m)	0	1	0	1	0	0	0	0
	十二指腸	45	37	43	41	35	29	31	30
	腺腫 (b)	0	0	0	1	0	0	0	0
	肝臓	45	37	43	41	35	29	31	30
	肝細胞腺腫 (b)	6	5	5	3	1	0	3	0
	肝細胞癌 (m)	2	1	5	1	0	1	0	0
	血管腫 (b)	0	1	0	1	0	0	0	0
	血管肉腫 (m)	0	0	2	0	0	0	0	0
	精巣	45	37	43	41	/	/	/	/
	間質細胞腫 (b)	0	0	0	1	/	/	/	/
	卵巣	/	/	/	/	34	29	31	30
黄体腫 (b)	/	/	/	/	0	1	5	4	
のう胞腺腫 (b)	/	/	/	/	4	1	1	3	

(b)=良性 (m)=悪性 0=所見なし

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。

表 11-3 腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	30	1250	2500	0	30	1250	2500
	所見\検査動物数								
最 終 屠 殺	子宮	/	/	/	/	35	29	31	30
	間質ポリープ(b)	/	/	/	/	4	1	1	2
	腺ポリープ(b)	/	/	/	/	0	1	1	0
	腺癌(m)	/	/	/	/	0	1	1	1
	平滑筋腫(b)	/	/	/	/	0	1	1	0
	間質細胞肉腫(m)	/	/	/	/	1	0	0	0
	血管腫(b)	/	/	/	/	0	0	1	0
	血管肉腫(m)	/	/	/	/	0	0	0	1
	下垂体	45	37	43	40	35	29	31	30
	腺腫(b)	1	0	0	0	3	3	5	2
	甲状腺	45	37	43	41	35	29	31	30
	ろ胞腺腫(b)	0	0	0	0	0	1	0	0
	副腎	44	37	43	41	35	29	31	30
	被膜下腺腫(b)	1	2	0	0	0	0	0	0
	皮質腺腫(b)	2	1	0	1	0	0	0	0
	褐色細胞腫(b)	0	0	1	0	1	0	0	0
	血液リンパ網内系	5	2	2	2	14	8	8	11
	悪性リンパ腫(m)	5	2	2	2	13	7	7	8
	組織球肉腫(m)	0	0	0	0	2	1	1	4
	脾臓	45	37	43	41	35	29	31	30
	血管腫(b)	0	0	0	0	1	0	0	0
	血管肉腫(m)	1	5	3	1	0	0	0	2
	骨髄	45	37	43	41	35	29	31	30
	血管腫(b)	1	0	0	0	0	0	0	0
	血管肉腫(m)	0	1	0	0	0	0	0	0
	胸腺	39	33	35	40	35	27	29	29
	腺腫(b)	0	0	0	0	1	0	0	0
リンパ節	0	1	0	0	5	7	3	3	
血管腫(b)	0	0	0	0	0	0	0	1	
腸間膜リンパ節	45	37	43	41	35	29	31	29	
血管腫(b)	0	0	0	0	1	0	1	1	
顎下腺	45	37	43	41	35	29	31	30	
肉腫(m), 鑑別診断せず	0	0	0	0	1	0	0	0	
ハーダー氏腺	45	37	43	41	35	29	31	30	
腺腫(b)	2	2	3	2	0	0	2	1	
乳腺	45	37	43	41	35	29	31	29	
腺癌(m)	0	0	0	0	0	1	1	0	
皮膚/皮下組織	45	37	43	41	35	29	31	30	
線維肉腫(m)	0	0	0	0	0	0	1	0	
血管腫(b)	0	1	0	0	0	0	0	0	

(b)=良性 (m)=悪性 0=所見なし

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。

表 11-4 腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	30	1250	2500	0	30	1250	2500
	所見\検査動物数								
最 終 屠 殺	骨格筋	45	37	43	41	35	29	31	30
	肉腫(m), 鑑別診断せず	0	0	0	0	0	0	0	1
	骨 不特定	0	0	0	0	1	0	0	1
全 動 物	骨肉腫(m)	0	0	0	0	1	0	0	0
	脳	50	50	50	50	49	48	50	50
	神経膠星状細胞腫(b)	0	0	0	0	0	1	0	0
	肺	50	50	50	50	49	48	50	50
	肺腺腫(b)	5	4	5	5	2	1	1	1
	肺癌(m)	0	1	0	2	0	0	0	0
	十二指腸	50	49	49	50	49	46	45	47
	腺腫(b)	0	0	0	1	0	0	0	0
	肝臓	50	50	50	50	49	48	50	50
	肝細胞腺腫(b)	6	5	6	3	2	0	3	1
	肝細胞癌(m)	2	2	5	1	0	1	0	0
	血管腫(b)	0	1	0	1	0	0	0	0
	血管肉腫(m)	0	1	2	0	0	0	0	0
	膵臓	50	49	50	50	49	48	50	50
	島細胞腺腫(b)	0	0	0	0	0	0	0	1
	精巣	50	50	50	50	/	/	/	/
	間質細胞腫(b)	0	0	0	1	/	/	/	/
	卵巢	/	/	/	/	47	48	49	47
	黄体腫(b)	/	/	/	/	§0	1	5+	5+
	黄体腫(m)	/	/	/	/	0	0	0	1
	のう胞腺腫(b)	/	/	/	/	4	1	1	4
	子宮	/	/	/	/	49	48	50	50
	間質ポリープ(b)	/	/	/	/	6	1	1	2
	腺ポリープ(b)	/	/	/	/	0	1	1	0
	腺癌(m)	/	/	/	/	0	1	1	1
	扁平上皮癌(m)	/	/	/	/	0	0	1	0
	平滑筋腫(b)	/	/	/	/	0	1	1	0
	間質細胞肉腫(m)	/	/	/	/	1	0	1	2
	血管腫(b)	/	/	/	/	0	1	1	0
	血管肉腫(m)	/	/	/	/	0	1	0	2
下垂体	50	50	50	49	48	47	45	47	
腺腫(b)	1	1	1	0	3	6	7	3	
癌(b)	0	1	0	0	0	0	0	0	
甲状腺	50	50	50	50	49	48	50	50	
ろ胞腺腫(b)	0	0	0	0	0	1	1	0	
C-細胞腺腫(b)	0	0	0	0	0	0	0	1	

(b)=良性 (m)=悪性 0=所見なし

傾向検定[Peto法]; #: p<0.05, §: p<0.01, 群間比較(Fisher検定): +: p<0.05, ++: p<0.01

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 11-5 腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	30	1250	2500	0	30	1250	2500
	所見\検査動物数								
全 動 物	副腎-	49	50	50	50	49	48	50	50
	被膜下腺腫 (b)	1	3	0	0	0	0	0	0
	皮質腺腫 (b)	2	1	0	1	0	0	0	0
	褐色細胞腫 (b)	0	0	1	0	1	0	0	0
	血液リンパ網内系	7	6	2	4	24	18	16	21
	悪性リンパ腫 (m)	7	4	2	4	18	13	11	14
	組織球肉腫 (m)	0	1	0	0	7	5	5	7
	悪性線維性組織球腫 (m)	0	1	0	0	0	0	0	1
	脾臓	50	50	50	50	49	48	50	50
	血管腫 (b)	0	0	0	0	1	0	0	0
	血管肉腫 (m)	1	7	3	1	2	1	0	2
	骨髓	50	50	50	50	49	48	50	50
	血管腫 (b)	1	0	0	0	0	0	0	0
	血管肉腫 (m)	0	1	0	0	0	1	0	0
	胸腺	43	45	42	49	46	42	44	44
	腺腫 (b)	0	0	0	0	1	0	0	0
	リンパ節	2	1	0	2	9	12	6	8
	血管腫 (b)	0	0	0	0	0	0	0	1
	腸間膜リンパ節	50	49	49	50	49	44	46	48
	血管腫 (b)	0	0	0	0	1	0	1	2
	血管肉腫 (m)	0	0	0	0	1	0	0	0
	顎下腺	50	50	50	50	49	47	50	50
	肉腫 (m), 鑑別診断せず	0	0	0	0	1	0	0	0
	ハーダー氏腺	50	50	50	50	49	48	50	50
	腺腫 (b)	4	2	3	2	0	1	3	1
	腺癌 (m)	0	0	0	0	0	1	0	0
	乳腺	50	50	50	50	47	46	44	45
	腺腫 (b)	0	0	0	0	0	1	0	0
	腺癌 (m)	0	0	1	0	1	2	1	0
	皮膚/皮下組織	50	50	50	50	49	48	50	50
	線維肉腫 (m)	0	0	0	0	0	0	2	0
	血管腫 (b)	0	1	0	0	0	0	0	0
線維肉腫 (m)	0	0	0	0	1	0	0	0	
骨格筋	50	50	50	50	49	48	50	50	
黄紋筋肉腫 (m)	0	1	0	0	0	0	0	0	
肉腫 (m), 鑑別診断せず	0	0	0	0	0	0	0	1	
骨 不特定	0	1	0	0	2	0	1	1	
骨肉腫 (m)	0	0	0	0	1	0	1	0	
血管腫 (b)	0	0	0	0	1	0	0	0	
骨 (大腿骨)	50	49	49	50	48	48	50	49	
血管肉腫 (m)	0	1	0	0	1	0	0	0	

(b)=良性 (m)=悪性 0=所見なし 傾向検定[Peto法]; #: p<0.05, §: p<0.01 群間比較(Fisher検定):+, p<0.05, ++, p<0.01