

マウスを用いた発がん性試験

(毒性資料No.原体-18)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2012年

検体の純度：

試験動物：C57BL/6J系マウス

1群雌雄各60匹(中間屠殺群；1群雌雄各10匹，最終屠殺群；1群雌雄各50匹)，試験開始時6週齢，平均体重 雄20.42～20.51g，雌16.27～16.55g)

投与期間：中間屠殺群 52週(2010年6月10日～2011年6月16日)

最終屠殺群 18ヶ月(2010年6月10日～2011年12月22日)

試験方法：検体を0(対照群)、50、500および5000ppmの用量で飼料に混合し、18ヶ月間投与した。

用量設定の根拠；

上記投与用量の設定は、検体を0(対照群)、300、1500および6000ppmの濃度でマウスに混餌投与した用量設定試験(90日間反復経口投与)と肝臓に対する影響をみるために検体を0(対照群)、500、2000および7000ppmの濃度でマウスに混餌投与した28日間の反復経口投与毒性試験(毒性資料No.原体-29)の結果に基づいて設定した。用量設定試験では、6000ppmにおいて雌で病理組織学的変化を伴わない肝臓重量のわずかな増加が認められ、また雄の腎臓において、尿細管の変性病変を伴わない皮質上皮の空胞化の頻度の低下が認められた。これらの所見は有害作用とは考えられなかったことから、6000ppmが無毒性量と判断された。一方28日間の試験では、7000ppmで投与第1週目に体重増加抑制が認められた。また総チトクロムP-450および肝酵素活性(PROD, BROD)の増加が認められた。しかし雌雄共に肝臓に病理組織学的変化を伴わなかった。以上の結果から本試験では最高用量を5000ppm、最低用量を50ppmとし、その中間用量として500ppmを設定した。

観察・検査項目および結果：

一般症状および死亡率；生死を1日2回(週末と休日は1回)、一般状態は少なくとも1日1回観察した(ケージサイド)。触診を含む詳細な身体検査は毎週1回実施し、腫瘤の発生時期、位置および大きさを記録した。

ケージサイドの観察により少なくとも1日1回記録された症状においては、対照群に比べ、5000ppmでは雄のみに、鎮静、衰弱、運動量の低下および円背を示す動物の増加がみられた。

その頻度を表1に示す。

表 1. 一般症状

| 性別 | 雄 | | | | 雌 | | | |
|-------------|----|----|-----|------|----|----|-----|------|
| | 0 | 50 | 500 | 5000 | 0 | 50 | 500 | 5000 |
| 所見/用量 (ppm) | 0 | 50 | 500 | 5000 | 0 | 50 | 500 | 5000 |
| 動物数 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |
| 鎮静 | 3 | 1 | 4 | 12** | 1 | 0 | 0 | 3 |
| 衰弱 | 0 | 1 | 4 | 10** | 1 | 4 | 2 | 2 |
| 運動量の低下 | 3 | 3 | 2 | 8 | 2 | 0 | 1 | 2 |
| 円背 | 4 | 1 | 3 | 8 | 0 | 3 | 1 | 3 |

** : $p \leq 0.01$ (Fisher 検定 ; 申請者により実施)

詳細な身体検査の発生頻度を表 2 に示した。

詳細な身体検査では、着色尿[#]が 5000ppm 群の雌雄で試験期間を通じて対照群に比べ高い発生率で観察された。また投与後半の 6 ヶ月間、5000 および 500ppm の雄でのみ、衰弱の発生率が幾分上昇したが、統計学的な有意差は認められなかった。なお、500ppm での衰弱の発生率の上昇は極くわずかなものであり、他の一般状態の変化ないしは死亡を伴ってはいなかったため、偶発的なものと考えられた。

[#]申請者注;暗色化を呈していた。しかし尿検査において、血液や結晶性物質の等が認められていないことから、毒性学的な意味合いは低いものとする。

表 2. 詳細な身体検査所見

| 性別 | 雄 | | | | 雌 | | | |
|------------------|----|----|-----|-------|----|----|-----|-------|
| | 0 | 50 | 500 | 5000 | 0 | 50 | 500 | 5000 |
| 所見/用量 (ppm) | 0 | 50 | 500 | 5000 | 0 | 50 | 500 | 5000 |
| 1 週目~53 週目/動物数 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |
| 着色尿 [#] | 0 | 0 | 0 | 40*** | 0 | 0 | 0 | 26*** |
| 後半の 6 ヶ月間/動物数 | 46 | 44 | 49 | 45 | 46 | 44 | 47 | 47 |
| 着色尿 [#] | 0 | 0 | 0 | 32*** | 0 | 0 | 0 | 37*** |
| 衰弱 | 0 | 0 | 4 | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 |

*** : $p \leq 0.001$ (Fisher 検定), [#];暗色化

死亡 ;

5000ppm 群の雄で、死亡率の増加がみられた。これは一般状態の変化 (運動量の低下、衰弱、円背、鎮静) および/または体重低下のため、早期に屠殺したことによるものであった。雄の 500ppm 以下および雌の全投与群においては対照群との間に大差は認められなかった。

表 3 に死亡数を示す。

表 3. 死亡数 (最終屠殺群 雌雄各 50 例)

| 性 | 投与量 (ppm) | 0 | 50 | 500 | 5000 |
|---|--------------|----|----|-----|------|
| 雄 | 死亡例 | 6 | 4 | 11 | 8 |
| | 瀕死状態により切迫屠殺例 | 10 | 10 | 10 | 19 |
| | 合計 | 16 | 14 | 21 | 27 |
| 雌 | 死亡例 | 3 | 1 | 1 | 0 |
| | 瀕死状態により切迫屠殺例 | 3 | 7 | 7 | 7 |
| | 合計 | 6 | 8 | 8 | 7 |

体重；

各動物の体重は、馴化期間中は少なくとも週に1回、投与期間中の最初の13週間は毎週1回測定し、その後は約4週毎に1回、そして剖検前に測定した。

図1、図2、表4および表5に体重変化を示した。

図1 体重（雄）

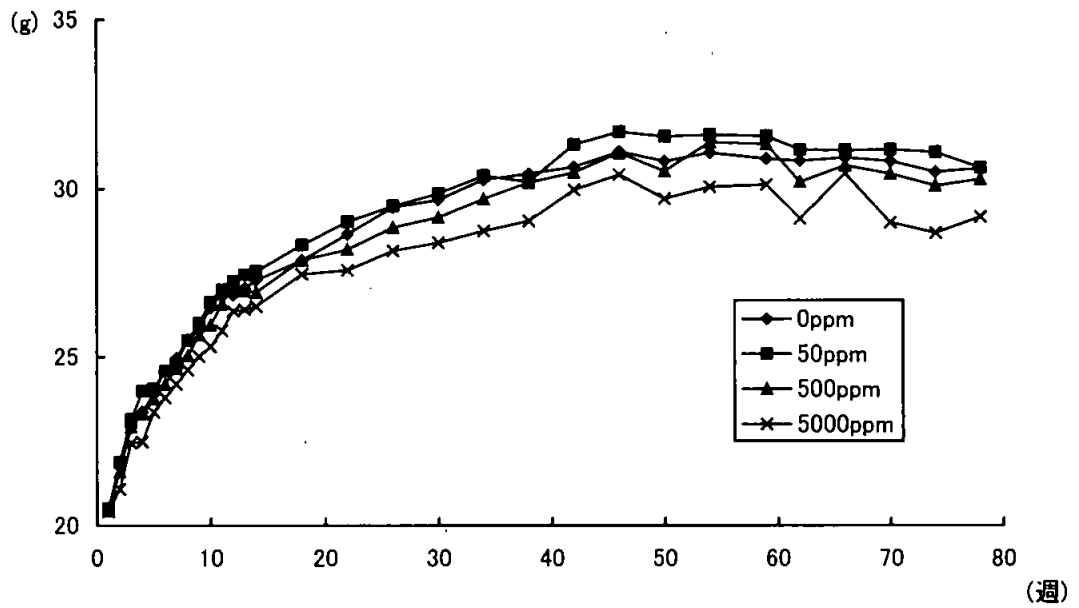


図2 体重（雌）

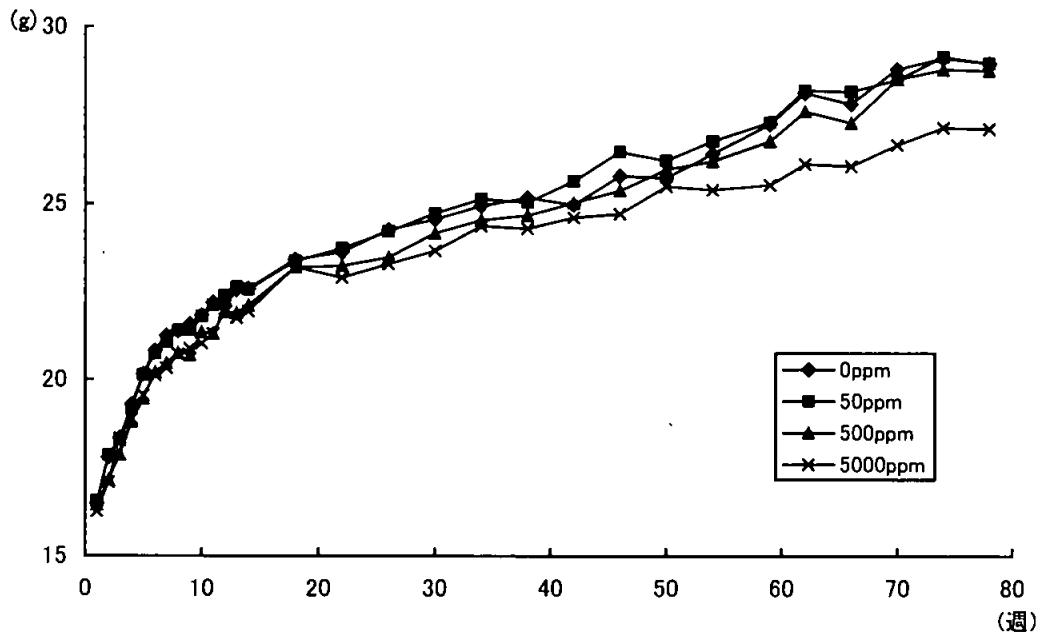


表 4. 平均体重 -雄- (有意差の認められた主な測定時期)

| 投与用量 (ppm) | 0 | | | 50 | | 500 | | 5000 | |
|------------------------|-------|---------|-----|---------|-----|---------|-----|------|---|
| 平均体重 (g) | 平均 | 平均 | % | 平均 | % | 平均 | % | 平均 | % |
| 1 日目 | 20.46 | 20.51 | 100 | 20.44 | 100 | 20.42 | 100 | | |
| 第 2 週 (8 日目) | 21.76 | 21.87 | 101 | 21.60 | 99 | 21.09** | 97 | | |
| 第 8 週 (50 日目) | 25.52 | 25.49 | 100 | 25.04* | 98 | 24.61** | 96 | | |
| 第 10 週 (64 日目) | 26.46 | 26.63 | 101 | 25.94* | 98 | 25.30** | 96 | | |
| 第 14 週 (92 日目) | 27.28 | 27.54 | 101 | 26.92 | 99 | 26.50** | 97 | | |
| 第 26 週 (176 日目) | 29.44 | 29.48 | 100 | 28.85 | 98 | 28.15** | 96 | | |
| 第 54 週 (372 日目) | 31.04 | 31.57 | 102 | 31.35 | 101 | 30.03* | 97 | | |
| 第 62 週 (428 日目) | 30.80 | 31.13 | 101 | 30.18 | 98 | 29.09** | 94 | | |
| 第 70 週 (484 日目) | 30.79 | 31.13 | 101 | 30.42 | 99 | 28.97** | 94 | | |
| 第 74 週 (512 日目) | 30.47 | 31.05 | 102 | 30.06 | 99 | 28.66** | 94 | | |
| 最終第 78 週 (540 日目) | 30.57 | 30.59 | 100 | 30.25 | 99 | 29.14 | 95 | | |
| 増加重量 (g) | 平均 | 平均 | % | 平均 | % | 平均 | % | | |
| 第 1-2 週 (1-8 日目) | 1.30 | 1.36 | 105 | 1.16 | 89 | 0.67*** | 52 | | |
| 第 1-14 週 (1-92 日目) | 6.82 | 7.05 | 103 | 6.48 | 95 | 6.07** | 89 | | |
| 第 14-26 週 (92-176 日目) | 2.08 | 1.92 | 92 | 1.98 | 95 | 1.62** | 78 | | |
| 第 26-54 週 (176-372 日目) | 1.54 | 2.18*** | 142 | 2.43*** | 158 | 1.54 | 100 | | |
| 第 54-78 週 (372-540 日目) | -0.53 | -0.82 | Nc | -1.54* | nc | -1.51* | nc | | |
| 第 1-78 週 (1-540 日目) | 10.19 | 10.19 | 100 | 9.69 | 95 | 8.53** | 84 | | |

平均体重 (g), % ; 変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

*: p ≤ 0.05; **: p ≤ 0.01; ***: p ≤ 0.001 (Dunnnett 検定), *R: p ≤ 0.05; **R: p ≤ 0.01 (Dunn Rank Sum 検定)

表 5. 平均体重 -雌- (有意差の認められた主な測定時期)

| 投与用量 (ppm) | 0 | | | 50 | | 500 | | 5000 | |
|------------------------|-------|-------|-----|---------|-----|---------|-----|------|---|
| 平均体重 (g) | 平均 | 平均 | % | 平均 | % | 平均 | % | 平均 | % |
| 1 日目 | 16.49 | 16.55 | 100 | 16.44 | 100 | 16.27 | 99 | | |
| 第 2 週 (8 日目) | 17.79 | 17.84 | 100 | 17.15** | 96 | 17.09** | 96 | | |
| 第 8 週 (50 日目) | 21.38 | 21.39 | 100 | 20.75** | 97 | 20.71** | 97 | | |
| 第 10 週 (64 日目) | 21.83 | 21.79 | 100 | 21.34* | 98 | 21.03** | 96 | | |
| 第 14 週 (92 日目) | 22.58 | 22.56 | 100 | 22.10* | 98 | 21.94** | 97 | | |
| 第 26 週 (176 日目) | 24.25 | 24.20 | 100 | 23.47** | 97 | 23.28** | 96 | | |
| 第 54 週 (372 日目) | 26.39 | 26.75 | 101 | 26.18 | 99 | 25.38* | 96 | | |
| 第 62 週 (428 日目) | 28.10 | 28.17 | 100 | 27.58 | 98 | 26.10** | 93 | | |
| 第 70 週 (484 日目) | 28.77 | 28.47 | 99 | 28.49 | 99 | 26.64** | 93 | | |
| 第 74 週 (512 日目) | 29.08 | 29.12 | 100 | 28.76 | 99 | 27.12** | 93 | | |
| 最終第 78 週 (540 日目) | 28.93 | 28.93 | 100 | 28.7 | 99 | 27.09** | 94 | | |
| 増加重量 (g) | 平均 | 平均 | % | 平均 | % | 平均 | % | | |
| 第 1-2 週 (1-8 日目) | 1.30 | 1.29 | 99 | 0.71** | 55 | 0.82** | 63 | | |
| 第 1-14 週 (1-92 日目) | 6.06 | 6.01 | 99 | 5.66* | 93 | 5.63** | 93 | | |
| 第 14-26 週 (92-176 日目) | 1.67 | 1.60 | 96 | 1.32 | 79 | 1.34** | 80 | | |
| 第 26-54 週 (176-372 日目) | 2.07 | 2.52 | 122 | 2.77*** | 134 | 2.14 | 103 | | |
| 第 54-78 週 (372-540 日目) | 2.51 | 2.08 | 83 | 2.40 | 96 | 1.64 | 65 | | |
| 第 1-78 週 (1-540 日目) | 12.33 | 12.26 | 99 | 12.32 | 100 | 10.82** | 88 | | |

平均体重 (g), % ; 変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

*: p ≤ 0.05; **: p ≤ 0.01; (Dunnnett 検定), *R: p ≤ 0.05; **R: p ≤ 0.01 (Dunn Rank Sum 検定)

図 1、2 および表 4、5 に示したように、対照群の平均体重を比べると、5000ppm の平均体重は雌雄ともに試験期間を通じて、雄で最高 6% (Dunnett 検定; $p < 0.01$ 、62、70 および 74 週目)、雌で最高 7% ($p < 0.01$ 、58~78 週目) 対照を下回った。平均累積体重増加量も殆どの区間で雌雄ともに対照を有意に下回ったが、26~54 週目には、雄の平均累積体重増加量は対照と大差なかった。結果として、1~540 日目 (1~78 週目) の総平均累積体重増加量は雄で対照を 16% 下回り (Dunnett 検定; $p < 0.01$)、雌では 12% 対照を下回った (Dunnett 検定; $p < 0.01$)。

500ppm では雌雄ともに平均体重は試験期間中を通して対照群と同様であった。ただし、数時点で、雄では最高 2%、雌では 4%と、対照群に比べて軽度の低下が観察された (Dunnett 検定; $p < 0.01$ または $p < 0.05$)。平均累積体重増加量も、雌雄とも試験期間中いくつかの時点で対照を下回った。しかし、1~540 日目 (1~78 週目) の総平均累積体重増加量は、雌では対照と同程度であり、雄で 5%とわずかに対照を下回ったのみで統計学的な有意差は認められなかった。従って、これら平均体重および平均累積体重増加量の変化は、その程度が低かったことおよび散発的に認められたことから、雌雄いずれにおいても有害影響ではないものと考えられた。

50ppm では雌雄共に対照との差は認められなかった。

摂餌量および検体摂取量 ;

最初の 13 週までは毎週 1 回、その後はほぼ 4 週に 1 回摂餌量を測定した。

これを基に検体摂取量を算定した。表 6 に検体摂取量 (mg/kg/日) を示す。

最高用量の 5000ppm まで、雌雄とも平均摂餌量に投与の影響はなかった。

表 6. 検体摂取量 (mg/kg/日)

| 投与量 (ppm) | 50 | 500 | 5000 |
|-----------|-----|-----|------|
| 雄 | 6.9 | 70 | 710 |
| 雌 | 8.6 | 89 | 871 |

血液学的検査 ;

53、54 または 55 週目 (12 ヶ月)、に、中間屠殺群の全生存動物および最終屠殺群の生存動物のうち動物番号の若い 10 匹について、血液学的検査を実施した。また、79 または 80 週目 (18 ヶ月)、剖検前に最終屠殺群の生存動物のうち動物番号の若い 20 匹について、血液学的検査を実施した。

更に、最終屠殺時、血液学的検査用サンプルを採取しない全動物について、血液塗抹標本を作製した。可能であれば、瀕死状態の動物についても屠殺直前に血液塗抹標本を作製した。

採血は一晚絶食させた動物の後眼窩静脈叢への穿刺により行った。採血の際はインフルランで動物を麻酔した。

検査項目は以下のとおりであった。

赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値 (HCT)、白血球数、血小板数 (PLT)、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 (MCHC)、平均赤血球容積 (MCV)、白血球分画

対照群と比較して統計学的に有意差が認められた項目を表7に示す。

表7. 血液学的検査 (統計学的に有意差の認められた項目)

| 性別 | 雄 | | | | | | 雌 | | | | | |
|------|-------|------|--------|------|---------|-------------------|-------|-------------------|--------|------|---------|------|
| | 50ppm | | 500ppm | | 5000ppm | | 50ppm | | 500ppm | | 5000ppm | |
| 検査週 | 12ヶ月 | 18ヶ月 | 12ヶ月 | 18ヶ月 | 12ヶ月 | 18ヶ月 | 12ヶ月 | 18ヶ月 | 12ヶ月 | 18ヶ月 | 12ヶ月 | 18ヶ月 |
| 赤血球 | | | | | ↓97 | | | | | | | |
| HCT | | | | | | | | | | | ↓97 | |
| MCV | | | | | | ^R ↑105 | | | | | | |
| MCHC | | | | | ↓99 | | | ^R ↑102 | | | | |
| PLT | | | | | ↑112 | | | | | | | |

↑ ↓ : p ≤ 0.05 (Dunnett 検定), ^R↑ : p ≤ 0.05 (Dunn Rank Sum 検定)
 表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの

表7に示す様に、いくつかの項目で対照群に比べ統計学的に有意な差が認められたが、対照群との差はわずかであり、偶発的なものと考えられた。

薬物動態学的検査；

試験 52 および 78 週目に検体投与群では雌雄各 5 匹、対照群では雄 2 匹を選び、インフルラン麻酔を施した後に後眼窩洞静脈叢から採血 (約 500 μL) した。採血前の一晩絶食は行わなかった。採血は午前 8 時頃に実施した (暗期終了時)。この血液サンプルの血漿を用いて、高速液体クロマトグラフィー/質量分析により親化合物および下記の主要代謝物*の濃度を測定した。

*ジヒドロ体 [M1], N-脱メチル体 [M5], ジヒドロ-N-脱メチル体 [M6]

表8. 血漿中における親化合物および主要代謝物の濃度 (mg/L)

| 用量 (ppm) | 雄 | | | 雌 | | |
|----------|------|---------------------|-------|---------------------|-------|---------------------|
| | 50 | 500 | 5000 | 50 | 500 | 5000 |
| | 52 週 | | | | | |
| 親化合物 | <VL | | | <VL | | |
| [M1] | <VL | | | <VL | | <0.533 [#] |
| [M5] | <VL | <1.202 [#] | 12.07 | <0.570 [#] | 2.634 | 20.57 |
| [M6] | <VL | 1.071 | 4.098 | <0.506 [#] | 2.324 | 8.078 |
| | 78 週 | | | | | |
| 親化合物 | <VL | | | <VL | | |
| [M1] | <VL | | | <VL | | |
| [M5] | <VL | <0.676 [#] | 9.680 | <0.517 [#] | 2.230 | 8.716 |
| [M6] | <VL | <0.701 [#] | 3.024 | 0.589 | 2.572 | 6.790 |

VL: 定量限界 (有効とされた分析法による) - 親化合物: 0.1mg/L, 上記 3 代謝物: 0.5mg/L
 #: 群内で定量限界以下の個体があったため、定量限界以下についてはそれぞれの定量限界をあてはめて平均値を算出した。

いずれの投与群でも、親化合物および代謝物の M1 の濃度はいずれも定量限界未満であった。一方、M5 体および M6 の濃度は用量に関連した上昇がみられた。5000ppm

における濃度から、これらの代謝物の血中濃度は雄よりも雌の方が幾分高いことを示していた。

剖検；

中間屠殺群は試験 370、371 または 372 日目に、最終屠殺群については試験 548～561 日目に全生存動物を深麻酔（イソフルラン）下での放血により屠殺した。なお、各屠殺日に、全群からほぼ同数ずつ無作為に動物を抜き出した。屠殺前は一晩、飼料を与えなかった。

剖検では全主要臓器、組織および体腔を検査した。

中間屠殺群

雄の対照群および最高用量群各 1 例がそれぞれ 139 日目および 240 日目に動物福祉の観点から切迫屠殺された。対照群 1 例は、右眼混濁、腹部に多数の外傷、肝臓の白色斑および脾臓腫大がみられた。5000ppm 群の 1 例は外観は痩せていたが、何ら異常な剖検所見はみられなかった。その他中間屠殺時まで生存した動物では雌雄共に対照群と投与群の間に差は認められなかった。

最終屠殺群

試験終了前に合計 107 匹の動物が切迫屠殺あるいは死亡した。これらの動物でみられた剖検所見に投与群と対照群との間に頻度の差は認められず、いずれも偶発的な所見と考えられた。一方、表 9 に示すように、最終屠殺時まで生存していた動物のうち 5000ppm 群の雄において、肝臓の暗色化の頻度の増加が認められた。しかしながら、関連する病理組織学的所見が認められなかったことから、この変化は投与とは無関係なものと考えられた。

表 9. 剖検所見 肝臓暗色化-最終屠殺群（雌雄各群 50 匹）

| 性別 | 雄 | | | | 雌 | | | |
|------------|----|----|-----|------|----|----|-----|------|
| | 0 | 50 | 500 | 5000 | 0 | 50 | 500 | 5000 |
| 投与量 (ppm) | 0 | 50 | 500 | 5000 | 0 | 50 | 500 | 5000 |
| 検査動物数 (総数) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| 死亡・切迫殺動物数 | 16 | 14 | 21 | 27 | 6 | 8 | 8 | 7 |
| 最終屠殺動物 | 34 | 36 | 29 | 23 | 44 | 42 | 42 | 43 |
| 肝臓暗色化 (合計) | 6 | 10 | 11 | 21** | 0 | 0 | 2 | 2 |
| 死亡・切迫殺動物数 | 0 | 0 | 3 | 7* | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 最終屠殺動物 | 6 | 10 | 8 | 14** | 0 | 0 | 1 | 1 |

*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$ (Fisher 検定)

臓器重量；

全生存動物を対象として以下の臓器重量を測定し、対体重比および対脳重量比も算出した。

肝臓、心臓、脾臓、精巣上体、腎臓、卵巣、精巣、子宮、副腎、脳。

なお、剖検前に測定した体重を臓器重量対体重比の算出に使用した。

表 10 に中間屠殺群 (12 ヶ月)、表 11 に最終屠殺群 (18 ヶ月) について統計学的に有意差の認められた臓器について示した。

表 10. 臓器重量 (有意差の認められた項目) (中間屠殺群)

| 性別 | | 雄 | | | 雌 | | |
|-----------|------|----|-----|------|----|-----|------|
| 投与量 (ppm) | | 50 | 500 | 5000 | 50 | 500 | 5000 |
| 体重 | | | | (95) | | | |
| 肝臓 | 対体重比 | | | ↑109 | | | |

↑: $p \leq 0.01$ (Dunnett 検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

() 内の数値は有意差は認められなかったが参考として記載した。

表 11. 臓器重量 (有意差の認められた項目) (最終屠殺群)

| 性別 | | 雄 | | | 雌 | | |
|-----------|-------|----|-----|------|-------------------|-------------------|--------------------|
| 投与量 (ppm) | | 50 | 500 | 5000 | 50 | 500 | 5000 |
| 体重 | | | | ↓94 | | | ↓93 |
| 腎臓 | 実重量 | | | ↓85 | | ↓ _R 93 | ↓ _R 88 |
| | 対体重比 | | | ↓89 | ↓ _R 92 | ↓ _R 93 | |
| | 対脳重量比 | | | ↓84 | ↓ _R 93 | ↓ _R 93 | ↓ _R 89 |
| 子宮 | 実重量 | | | | | | ↑ _R 128 |
| | 対体重比 | | | | | | ↑ _R 137 |
| | 対脳重量比 | | | | | | ↑ _R 130 |
| 脳 | 対体重比 | | | | | | ↑106 |
| 心臓 | 対体重比 | | | | | | ↑ _R 109 |
| 肝臓 | 対体重比 | | | | | | ↑ _R 108 |

↑: $p \leq 0.05$, ↓: $p \leq 0.01$ (Dunnett 検定),

↑_R ↓_R: $p \leq 0.05$, ↑_R↓_R: $p \leq 0.01$ ↑_R↓_R: $p \leq 0.001$ (Dunn Rank Sum 検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

表 10 に示されているように、中間屠殺群では 5000ppm の雄において、肝臓の対体重比が統計学的に有意に対照を上回った。しかし、この変化は最終体重が幾分低い場合に限られていたので、毒性学的に意味のあるものではないと考えられた。

18 ヶ月の最終屠殺時においては、表 11 に示されているように、5000ppm 群の雄で、腎臓の実重量、対体重比および対脳重量比が対照値をそれぞれ統計学的に有意に下回った。この用量では病理組織学的所見も観察されたことから、これら変化は投与に関連するものと考えられた。一方、雌においては全用量において、腎臓の実重量および/または対体重比および対脳重量比が対照値を統計学的に有意に下回った。しかし、関連する病理組織学的所見がなかったことから、これらの変化は投与とは無関係と考えられた。また、5000ppm において、子宮の平均実重量、対体重比および対脳重量比が対照値を統計学的に有意に上回った。これも病理組織学的変化を伴っていないことから、検体投与とは無関係と考えられた。なお、肝臓対体重比、心臓対体重比、脳対体重比に統計学的にも有意な増加がみられたが、これは体重が低値にあることによる二次的な影響と考えられた。

病理組織学的検査;

肉眼的病理検査を実施した動物を対象として以下の臓器を採取した。検査はまず、試験に関係する病理学者が検鏡した後、代表スライドについて別の病理学者によるピア

レビューを行った。本報告書に記載されている診断は全て両病理学者により同意された。なお、中間屠殺群については病理組織学的検査を実施せず、最終屠殺群についてのみ病理組織学的検査を行った。

消化器系 食道, 胃, 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸, 肝臓, 胆嚢, 膵臓, 唾液腺, 舌

呼吸器系 鼻腔, 喉頭, 咽頭, 気管, 肺

心臓血管/血液系 心臓, 胸部大動脈, 脾臓, 骨髄, 下顎リンパ節, 腸管膜リンパ節, 胸腺

泌尿生殖器系 腎臓, 膀胱, 子宮(子宮頸部含む), 卵巣, 乳腺, 精巣上体, 前立腺, 精囊, 精巣, 陰

腺組織 下垂体, 副腎, 甲状腺, 上皮小体, ハーダー腺, 涙腺(眼窩外)

神経系 脳, 眼, 視神経, 坐骨神経, 脊髄(頸部、胸部および腰部)

その他 胸骨, 骨格筋, 肉眼的病変部および腫瘤, 関節面(大腿脛骨関節), 皮膚

非腫瘍性病変

本試験でみられた主な非腫瘍性病変については、後頁(毒-95~96頁)に記載した。5000ppmの雌では肝臓において、主に門脈周囲の肝細胞大空胞化の頻度および程度の低下が認められた。一方、5000ppmの雄では腎臓において、皮質上皮空胞化の発生率の低下がみられ、膀胱において尿路上皮の軽微から軽度な空胞化の発生率が上昇した。これらの腎臓及び膀胱で認められた所見は検体の影響を否定することはできないが、毒性影響とは考えられなかった*。

その他の病理組織学的変化はすべて、統計学的に有意なものであっても、発生率が低いあるいは当試験所背景データの範囲内であったことから、投与との関連性はないものと考えられた。これらのうち統計学的に有意差の認められた所見と背景データを表13に示す。

*申請者注)

表 12. 主な非腫瘍病変 (検体の影響)

| 性別 | 雄 | | | | 雌 | | | |
|--------------|----|----|-----|------|----|----|-----|-----|
| 用量(ppm) | 0 | 50 | 500 | 5000 | 0 | 50 | 200 | 400 |
| 所見/検査数 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| 肝臓 | 50 | 50 | 49 | 50 | 50 | 49 | 49 | 50 |
| 肝細胞大空胞化/門脈周囲 | 0 | 0 | 0 | 0 | 29 | 21 | 23 | 3 |
| 程度 軽微 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 8 | 2 |
| 程度 軽度 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 | 6 | 12 | 0 |
| 程度 中等度 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 10 | 3 | 1 |
| 程度 重度 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 3 | 0 | 0 |
| 腎臓 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| 皮質上皮空胞化+ | 42 | 42 | 45 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 程度 軽微 | 5 | 3 | 9 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 程度 軽度 | 11 | 12 | 12 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 程度 中等度 | 19 | 17 | 14 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 程度 重度 | 7 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 膀胱 | 49 | 50 | 48 | 48 | 50 | 46 | 47 | 48 |
| 尿路上皮の空胞化+ | 0 | 0 | 0 | 7** | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 程度 軽微 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 程度 軽度 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |

** ; p<0.01 (Poly-K 検定(片側)) +有害作用とはみなさなかつた。

表 13. 有意差の認められたその他の非腫瘍病変(検体の影響とは考えなかつた所見)

| 性別 | 雄 | | | | 雌 | | | |
|------------------|----|----|-----|------|----|-----|-----|-----|
| 用量(ppm) | 0 | 50 | 500 | 5000 | 0 | 50 | 200 | 400 |
| 所見/検査数 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| 盲腸 | 49 | 50 | 47 | 47 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| マクロファージ内色素沈着(褐色) | 0 | 0 | 0 | 3* | 0 | 0 | 0 | 3* |
| 結腸 | 49 | 50 | 47 | 47 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| アミロイド沈着 | 16 | 12 | 11 | 25** | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 胆のう | 49 | 48 | 48 | 48 | 50 | 48 | 50 | 50 |
| 細胞質好酸性変化 | 20 | 18 | 14 | 28* | 5 | 2 | 4 | 4 |
| 上皮小体 | 37 | 42 | 42 | 40 | 42 | 39 | 37 | 44 |
| アミロイド沈着 | 23 | 18 | 23 | 31* | 0 | 1 | 3 | 3 |
| 直腸 | 49 | 49 | 45 | 49 | 50 | 50 | 50 | 48 |
| アミロイド沈着 | 11 | 7 | 12 | 19* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 胸腺 | 45 | 44 | 42 | 41 | 46 | 49 | 49 | 47 |
| アミロイド沈着 | 1 | 2 | 5 | 6* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 腎臓 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| 上皮単核細胞浸潤 | 21 | 13 | 12 | 14 | 17 | 25* | 23 | 25* |

* ; p<0.05, ** ; p<0.01 (Poly-K 検定(片側))

当該施設背景データ(2000年12月~2009年4月)

結腸(雄 536 例中) アミロイド沈着 発生率 0~66.8% 平均 33.4%

胆のう(雄 515 例中) 細胞質好酸性変化 発生率 26.0~51.0% 平均 40.6%

腎臓(雌 550 例中) 尿路上皮下単核細胞浸潤発生率 26.0~94.0% 平均 63.3%

直腸(雄 534 例中) アミロイド沈着 発生率 0~52.1% 平均 10.9%

上皮小体(雄 455 例中) アミロイド沈着 発生率 0~54.5% 平均 26.2%

腫瘍性病変

本試験でみられた主な腫瘍性病変については、後頁(毒-97～98頁)に記載した。

腫瘍の種類、発現率、良悪、部位について分類した。全ての腫瘍性病変の腫瘍の種類、発現率、臓器分布に投与群と対照群の間で差は認められなかった。また用量群別および雌雄別における良性および悪性腫瘍を担う動物数についても、投与群と対照群との間に差は認められなかった。

以上のことから、5000ppm群ではケージサイドの観察において、対照群に比べ、雄のみに鎮静、衰弱、運動量の低下および円背を示す動物の増加がみられた。また一般状態の重篤な変化および／または体重低下のため早期に屠殺したことにより、雄で死亡数の増加がみられた。体重では雌雄共に、増体重抑制がみられた。臓器重量では雄で腎臓の実重量、対体重比、対脳重量比の減少がみられた。病理組織学的検査では、雌において主に門脈周囲の肝細胞大空胞化の頻度および程度の低下が認められた。

500ppm以下では雌雄共に検体投与によると考えられる所見は認められなかった。

従って、無毒性量は雌雄共に500ppm(雄で70mg/kg/日、雌で89mg/kg/日に相当)であると判断される。

また、催腫瘍性はないものと判断される。

表 14-1. 主な非腫瘍性病変

| | 性別 | 雄 | | | | 雌 | | | |
|---------|----------------|----|----|-----|------|----|----|-----|------|
| | 用量 (ppm) | 0 | 50 | 500 | 5000 | 0 | 50 | 500 | 5000 |
| 途中死亡動物 | 所見/検査数 | 16 | 14 | 21 | 27 | 6 | 8 | 8 | 7 |
| | 腎臓 | 16 | 14 | 21 | 27 | 6 | 8 | 8 | 7 |
| | 尿路上皮下单核細胞浸潤 | 5 | 2 | 2 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 |
| | 皮質上皮空胞化 | 10 | 10 | 16 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 好塩基性尿細管 | 8 | 2 | 6 | 9 | 0 | 0 | 4 | 2 |
| | アミロイド沈着 | 12 | 7 | 18 | 22 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | 膀胱 | 15 | 14 | 19 | 26 | 6 | 8 | 6 | 7 |
| | 尿路上皮の表層内空胞化 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 肝臓 | 16 | 14 | 20 | 27 | 6 | 7 | 7 | 7 |
| | 肝細胞肥大(小葉中心性) | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 胆のう | 15 | 12 | 20 | 25 | 6 | 7 | 8 | 7 |
| | 細胞質好酸性変化 | 5 | 2 | 6 | 13 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| | 結腸 | 15 | 14 | 18 | 24 | 6 | 8 | 7 | 7 |
| | アミロイド沈着 | 1 | 1 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 上皮小体 | 10 | 10 | 17 | 22 | 5 | 5 | 8 | 7 |
| | アミロイド沈着 | 4 | 1 | 7 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 直腸 | 15 | 14 | 19 | 26 | 6 | 8 | 8 | 6 |
| | アミロイド沈着 | 2 | 2 | 4 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 胸腺 | 13 | 11 | 14 | 21 | 5 | 8 | 7 | 5 |
| | アミロイド沈着 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 最終屠殺動物 | 所見/検査数 | 34 | 36 | 29 | 23 | 44 | 42 | 42 | 43 |
| | 腎臓 | 34 | 36 | 29 | 23 | 44 | 42 | 42 | 43 |
| | 尿路上皮下单核細胞浸潤 | 16 | 11 | 10 | 9 | 13 | 22 | 21 | 24* |
| | 皮質上皮空胞化 | 32 | 32 | 29 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 好塩基性尿細管 | 18 | 26 | 23 | 15 | 10 | 8 | 4 | 6 |
| | アミロイド沈着 | 33 | 33 | 26 | 21 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| | 膀胱 | 34 | 36 | 29 | 22 | 44 | 38 | 41 | 41 |
| | 尿路上皮の表層内空胞化 | 0 | 0 | 0 | 3* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 肝臓 | 34 | 36 | 29 | 23 | 44 | 42 | 42 | 43 |
| | 肝細胞大空胞化(門脈周囲) | 0 | 0 | 0 | 0 | 29 | 21 | 23 | 3 |
| | 肝細胞肥大(小葉中心性) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | 胆のう | 34 | 36 | 28 | 23 | 44 | 41 | 42 | 43 |
| | 細胞質好酸性変化 | 15 | 16 | 8 | 15 | 3 | 0 | 2 | 3 |
| | 盲腸 | 34 | 36 | 29 | 23 | 44 | 42 | 42 | 43 |
| | マクロファージ内褐色色素沈着 | 0 | 0 | 0 | 3* | 0 | 0 | 0 | 3* |
| | 結腸 | 34 | 36 | 29 | 23 | 44 | 42 | 42 | 43 |
| | アミロイド沈着 | 15 | 11 | 11 | 19** | 0 | 1 | 1 | 0 |
| | 上皮小体 | 27 | 32 | 25 | 18 | 37 | 34 | 29 | 37 |
| | アミロイド沈着 | 19 | 17 | 16 | 17 | 0 | 1 | 3 | 3 |
| | 直腸 | 34 | 35 | 26 | 23 | 44 | 42 | 42 | 42 |
| アミロイド沈着 | 9 | 5 | 8 | 13* | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 胸腺 | 32 | 33 | 28 | 20 | 41 | 41 | 42 | 42 | |
| アミロイド沈着 | 1 | 2 | 3 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

*; $p \leq 0.05$, **; $p \leq 0.01$ (Poly-K 検定(片側))

表 14-2. 主な非腫瘍性病変 (続き)

| 性別 | 雄 | | | | 雌 | | | |
|----------------|----|----|-----|------|----|----|-----|------|
| | 0 | 50 | 500 | 5000 | 0 | 50 | 500 | 5000 |
| 用量 (ppm) | 0 | 50 | 500 | 5000 | 0 | 50 | 500 | 5000 |
| 所見/検査数 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| 腎臓 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| 尿路上皮下単核細胞浸潤 | 21 | 13 | 12 | 14 | 17 | 25 | 23 | 25* |
| 皮質上皮空胞化 | 42 | 42 | 45 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 好塩基性尿細管 | 26 | 28 | 29 | 24 | 10 | 8 | 8 | 8 |
| アミロイド沈着 | 45 | 40 | 44 | 43 | 2 | 3 | 5 | 6 |
| 膀胱 | 49 | 50 | 48 | 48 | 50 | 46 | 47 | 48 |
| 尿路上皮の表層内空胞化 | 0 | 0 | 0 | 7** | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 肝臓 | 50 | 50 | 49 | 50 | 50 | 49 | 49 | 50 |
| 肝細胞大空胞化(門脈周囲) | 0 | 0 | 0 | 0 | 29 | 21 | 23 | 3 |
| 肝細胞肥大(小葉中心性) | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 胆のう | 49 | 48 | 48 | 48 | 50 | 48 | 50 | 50 |
| 細胞質好酸性変化 | 20 | 18 | 14 | 28* | 5 | 2 | 4 | 4 |
| 盲腸 | 49 | 50 | 47 | 47 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| マクロファージ内褐色色素沈着 | 0 | 0 | 0 | 3* | 0 | 0 | 0 | 3* |
| 結腸 | 49 | 50 | 47 | 47 | 50 | 50 | 49 | 50 |
| アミロイド沈着 | 16 | 12 | 11 | 25** | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 上皮小体 | 37 | 42 | 42 | 40 | 42 | 39 | 37 | 44 |
| アミロイド沈着 | 23 | 18 | 23 | 31* | 0 | 1 | 3 | 3 |
| 直腸 | 49 | 49 | 45 | 49 | 50 | 50 | 50 | 48 |
| アミロイド沈着 | 11 | 7 | 12 | 19* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 胸腺 | 45 | 44 | 42 | 41 | 46 | 49 | 49 | 47 |
| アミロイド沈着 | 1 | 2 | 5 | 6* | 0 | 0 | 0 | 0 |

*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$ (Poly-K 検定(片側))

表 15-1. 腫瘍性病変

| | 性別 | 雄 | | | | 雌 | | | |
|----------------|---------------|----|----|-----|------|----|----|-----|------|
| | 用量 (ppm) | 0 | 50 | 500 | 5000 | 0 | 50 | 500 | 5000 |
| 途中死亡動物 | 所見/検査数 | 16 | 14 | 21 | 27 | 6 | 8 | 8 | 7 |
| | ハーダー氏腺 | 16 | 14 | 21 | 27 | 6 | 8 | 7 | 7 |
| | 腺腫 (B) | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | 肝臓 | 16 | 14 | 20 | 27 | 6 | 7 | 7 | 7 |
| | 肝細胞腺腫 (B) | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 下垂体 | 15 | 14 | 19 | 25 | 6 | 8 | 8 | 6 |
| | 前葉腺腫 (B) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | 造血組織 | 16 | 14 | 21 | 27 | 6 | 8 | 8 | 7 |
| | 組織球肉腫 (M) | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| リンパ腫 (M) | 0 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | |
| 最終屠殺動物 | 所見/検査数 | 34 | 36 | 29 | 23 | 44 | 42 | 42 | 43 |
| | 十二指腸 | 34 | 36 | 29 | 23 | 44 | 42 | 42 | 43 |
| | 腺腫 (B) | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | ハーダー氏腺 | 34 | 36 | 29 | 23 | 44 | 42 | 42 | 42 |
| | 腺腫 (B) | 3 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 2 |
| | 肝臓 | 34 | 36 | 29 | 23 | 44 | 42 | 42 | 43 |
| | 肝細胞腺腫 (B) | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | 肺 | 34 | 36 | 29 | 23 | 44 | 42 | 42 | 43 |
| | 細気管支・肺胞腺腫 (B) | 2 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | 卵巣 | / | / | / | / | 44 | 41 | 42 | 43 |
| | 良性顆粒膜細胞腫 (B) | / | / | / | / | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | 良性黄体腫 (B) | / | / | / | / | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | 下垂体 | 33 | 35 | 29 | 23 | 43 | 41 | 41 | 43 |
| | 前葉腺腫 (B) | 0 | 0 | 0 | 0 | 23 | 13 | 18 | 16 |
| | 中間葉腺腫 (B) | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 1 |
| | 皮膚 | 32 | 35 | 29 | 22 | 43 | 42 | 41 | 43 |
| | 乳頭腫 (B) | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 甲状腺 | 34 | 36 | 29 | 23 | 44 | 40 | 42 | 43 |
| | ろ胞細胞腺腫 (B) | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| | ろ胞細胞癌 (M) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | 子宮 | / | / | / | / | 44 | 42 | 41 | 43 |
| 子宮内膜間質ポリープ (B) | / | / | / | / | 0 | 0 | 1 | 0 | |
| 造血組織 | 34 | 36 | 29 | 23 | 44 | 42 | 42 | 43 | |
| 組織球肉腫 (M) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | |
| リンパ腫 (M) | 3 | 6 | 4 | 2 | 7 | 2 | 2 | 3 | |

B=良性, M=悪性

*; p≤0.05, **; p≤0.01 (Poly-K 検定 (片側))

表 15-2. 腫瘍性病変(続き)

| | 性別 | 雄 | | | | 雌 | | | |
|-----|---------------|----------|----|----|-----|------|----|----|-----|
| | | 用量 (ppm) | 0 | 50 | 500 | 5000 | 0 | 50 | 500 |
| 全動物 | 所見/検査数 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| | 十二指腸 | 47 | 49 | 47 | 47 | 50 | 50 | 49 | 50 |
| | 腺腫(B) | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | ハーダー氏腺 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 49 | 49 |
| | 腺腫(B) | 4 | 2 | 0 | 1 | 3 | 0 | 1 | 2 |
| | 肝臓 | 50 | 50 | 49 | 50 | 50 | 49 | 49 | 50 |
| | 肝細胞腺腫(B) | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | 肺 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| | 細気管支・肺胞腺腫(B) | 2 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | 卵巣 | / | / | / | / | 50 | 49 | 49 | 50 |
| | 良性顆粒膜細胞腫(B) | / | / | / | / | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | 良性黄体腫(B) | / | / | / | / | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | 下垂体 | 48 | 49 | 48 | 48 | 49 | 49 | 49 | 49 |
| | 前葉腺腫(B) | 0 | 0 | 0 | 0 | 23 | 13 | 18 | 18 |
| | 中間葉腺腫(B) | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 1 |
| | 皮膚 | 48 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 50 |
| | 乳頭腫(B) | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 甲状腺 | 49 | 50 | 50 | 50 | 49 | 47 | 50 | 50 |
| | ろ胞細胞腺腫(B) | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| | ろ胞細胞癌(M) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | 子宮 | / | / | / | / | 49 | 50 | 49 | 50 |
| | 子宮内膜間質ポリープ(B) | / | / | / | / | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | 造血組織 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| | 組織球肉腫(M) | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| | リンパ腫(M) | 3 | 7 | 6 | 3 | 8 | 3 | 3 | 3 |

B=良性, M=悪性

*; p<0.05, **; p<0.01 (Poly-K 検定(片側))

表 16. 腫瘍数および担腫瘍動物数

| | 性別 | 雄 | | | | 雌 | | | | |
|----|---------------|----------|----|----|-----|------|----|----|-----|------|
| | | 用量 (ppm) | 0 | 50 | 500 | 5000 | 0 | 50 | 500 | 5000 |
| 合計 | 検査動物数 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | |
| | 腫瘍数 | 良性 | 6 | 7 | 2 | 3 | 32 | 16 | 23 | 23 |
| | | 悪性 | 3 | 7 | 8 | 3 | 8 | 3 | 5 | 5 |
| | 腫瘍総数 | 9 | 14 | 10 | 6 | 40 | 19 | 28 | 28 | |
| | 担腫瘍動物数 | 良性 | 6 | 7 | 2 | 3 | 27 | 16 | 22 | 21 |
| | | 悪性 | 3 | 7 | 8 | 3 | 8 | 3 | 5 | 5 |
| | 担腫瘍動物数(良性+悪性) | 8 | 13 | 10 | 5 | 31 | 17 | 23 | 25 | |

(12) 繁殖毒性および催奇形成
ラットを用いた 2 世代繁殖毒性試験

(毒性資料 No. 原体-19)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2012 年

検体純度：

供試動物：Wistar Han CRL: WI(HAN)系ラット，1 群雌雄各 30 匹，投与開始時 9 週齢

投与期間：P 世代；投与開始から F1 児離乳時までの約 18 週間

F1 世代；離乳時から F2 児離乳時までの約 24 週間

(2011 年 1 月 4 日投与開始～2011 年 10 月 16 日生存段階終了)

投与方法：検体を 0(対照群)、100、500 および 2500ppm の濃度で飼料に混入し、試験での全生存段階を通して投与した。試験期間を通して検体摂取量を一定に維持するため、雌については哺育期間中、検体濃度を半量とした。

用量設定根拠；

交配・調整・選抜および観察・検査項目：概要を表 1 にまとめた。

[親動物]

一般状態および死亡率：毎日 2 回（休祭日は 1 回）、動物の死亡および一般状態を観察した。

また、ケージ越しおよびケージから取り出しての詳細な観察を週 1 回実施した。

交配および妊娠の確認：10 週間の交配前期間投与終了後、雌 1 匹と雄 1 匹を最高 14 日間連続して同居させることにより、交配を行った。交配期間中は、膣スメアを毎朝採取し、精子および/または膣栓の有無を検査した。受精が判明した雌は、當巢ケージに移した。膣スメアで受精が観察された日をその雌の妊娠 0 日目とした。

体重および摂餌量：体重を交配前期間（10 週）は、雌雄の動物について、週 1 回測定した。

交配期間中から屠殺までの間は雄および未交尾の雌の体重を週 1 回測定した。妊娠期間中の母動物の体重は、0、6、13 および 20 日目に測定し、哺育期間中の母動物の体重は、0、4、7、14 および 21 日目に測定した。

摂餌量は 10 週間の交配前期間中、雌雄の動物について、週 1 回測定した。交配期

間中は、雄および未交尾の雌に対し、週 1 回の頻度で新鮮な飼料を与えたが、摂餌量は測定しなかった。妊娠期間中は 0、6、13 および 20 日に摂餌量を測定した。

哺育期間中では 0、4、7、14 および 21 日目に摂餌量を測定した。

摂餌量、体重および飼料分析結果に基づき、交配前期間（雌雄ともに 10 週間）の平均検体摂取量（mg 検体/kg 体重/日）を求めた。

繁殖性に関する指標：交配および分娩、また同腹児に関する観察に基づき以下の指標を算出した。

繁殖指標；

$$\text{交尾率 (\%)} = \frac{\text{受精した雌の数}^a}{\text{同居させた雌の数}} \times 100$$

$$\text{受胎率 (\%)} = \frac{\text{妊娠した雌の数}^b}{\text{受精した雌の数}} \times 100$$

$$\text{出産率 (\%)} = \frac{\text{生存児を出産した雌の数}}{\text{妊娠した雌の数}} \times 100$$

^a 精子または膣栓が確認されなかった雌を含む。

^b 出産しなかったが着床痕が認められた雌を含む。

出生児の生存指標；哺育時の記録データから以下の出生率を算出した。

$$\text{出生率 (\%)} = \frac{\text{一腹あたりの総出産児数}}{\text{一腹あたりの総着床痕数}} \times 100$$

$$\text{生児出生率 (\%)} = \frac{\text{一腹あたりの生存児数}}{\text{一腹あたりの総出産児数}} \times 100$$

$$\text{生存率 (\%)} = \frac{\text{4 日目 (淘汰前) の一腹あたりの生存児数}}{\text{一腹あたりの生存児数}} \times 100$$

$$\text{哺育率 (\%)} = \frac{\text{21 日目の一腹あたりの生存児数}}{\text{4 日目 (淘汰後) の一腹あたりの生存児数}} \times 100$$

$$\text{妊娠期間} = \text{膣スメアで受精が確認された日 (妊娠 0 日とする) から哺育 0 日 (出産およびコンピューターシステムへの入力) までの日数}$$

発情周期：交配前 3 週間にわたり、P 世代および F1 世代のすべての雌について毎日膣スメア検査を行い、発情周期を調べた。さらに、屠殺直前にすべての雌について発情周期ステージを検査した。

精子検査：屠殺時に P 世代および F1 世代の全ての雄について、片側（左）の精巣および精巣上体から精子を採取し、精子細胞数および精巣上体尾部精子数を数えた。また、輸精管（尿道の近く）から採取した精子について、形態および運動性を評価した。なお、精子の運動性の評価は全群について行い、形態および精子数の評価は両世

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。

代の対照群と最高用量群について実施した。

剖 検：P および F1 世代の各母動物は F1 または F2 児離乳後に屠殺し剖検した。子宮を摘出し、着床痕を計数して記録した。雄は各児動物が生まれた後に屠殺、剖検した。

臓器重量：P および F1 世代の全親動物の以下の臓器重量を測定した。

脳，下垂体，精のう（凝固腺および精囊液を含む），肝臓，腎臓，脾臓，卵巣，前立腺，甲状腺，胸腺，副腎，子宮（卵管および頸部を含む），精巣（右），精巣上体（右），精巣上体尾部（精子検査に使用しなかった片側）

病理組織学的検査；P および F1 世代の対照群および最高投与群の全動物について、以下の臓器の病理組織学的検査を実施した。

下垂体，肝臓，腎臓，脾臓，副腎，肺，精巣上体，凝固腺，卵巣，卵管，前立腺，甲状腺，精のう，精巣，子宮，子宮頸部，膺および肉眼的病変部。

さらに F1 世代の対照群と高用量群の出産した母動物 10 匹について、卵胞および黄体数を顕微鏡的に検査した。

[児動物]

児動物の記録；出生時に、総出産児数、死産児数、生存児数、性および体重を測定した。また、F2 児では肛門生殖結節間距離を調べた。

出産生存児については、離乳時まで一般状態、生存数および死亡数を調べ、生後 4 日、7 日、14 日、21 日に体重を測定した。

性成熟の観察；継代用に選定した F1 動物について、離乳後、包皮分離および膺開口が達成されるまで観察し、その達成日を記録した。

剖 検；腹児数を調整するために選択された児動物は、出産 4 日後に屠殺した。また継代用に選定されなかった F1 児および全 F2 児は 21 日齢で屠殺し、剖検を行った。死亡児、死産児についても剖検した。

臓器重量；両世代各同腹児から雌雄各 1 匹について、脳、脾臓、胸腺および子宮の重量を測定した。

病理組織学的検査；各世代同腹児の雌雄各 1 匹について子宮、子宮頸部、卵巣、卵管、膺、精巣、精巣上体、前立腺、凝固腺、精囊および肉眼的病変部位について鏡検して病理学的に検査した。

表 1. 交配、調整、選抜および観察・検査項目の概要

| 世代 | 期間(週間) | 交配・調整・選抜 | 観察・検査項目 |
|----|-------------------|--|---|
| P | 生育・交配前 (10 週間) | | 一般状態の観察(毎日)、詳細な観察(毎週) 体重および摂餌量の測定(毎週) 発情周期の判定(交配前 3 週から毎日) 交配状況の観察 |
| | 交配 (最長 2 週間) | 雌雄 1 対 1 で交配。 膣栓又は膣塗抹による精子 の確認(妊娠 0 日) | |
| | 妊娠(21 日間) | | 一般状態の観察(毎日)、詳細な観察(毎週)、 体重および摂餌量測定(妊娠 0, 6, 13, 20 日) |
| | 出産…………… | …………… | 出産状況の観察 死産児数、生存児数、性比の算定、体重測定 と一般状態の観察 雄親動物の剖検、精子検査 |
| F1 | 哺育(3 週間) | 出産後 4 日目各同腹児数を 雄 4 匹、雌 4 匹に調整 | <u>親動物</u> 一般状態の観察(毎日)、詳細な観察(毎週)、 体重および摂餌量測定(出産 0, 4, 7, 14, 21 日)、 <u>児動物</u> 生存数および死亡数、一般状態の観察(毎日)、 体重測定(出産 0, 4, 7, 14, 21 日) 出産後 4 日目に淘汰された児動物の異常の観 察、剖検。 |
| | …………… 離乳…………… | …………… | 親動物および継代用以外の児動物の剖検。 <u>親動物</u> 病理組織学的検査および臓器重量測定 (脳*, 下垂体, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 甲状腺, 胸腺*, 副腎, 肺**, 精のう, 前立腺, 精巢上体, 凝固腺**, 精巢, 子宮, 卵巣, 卵管**, 膣**, 子宮頸部**, 肉 眼的病変部**) |
| | | 継代用の各群雌雄 30 匹ずつ 30 腹から無作為に選抜 | *: 臓器重量測定のみ, **: 病理組織学的検査のみ 卵胞および黄体の定量的評価(対照群および 最高用量群のみ, 各 10 匹)。 <u>離乳児</u> 性成熟の観察[包皮分離, 膣開口達成日まで観 察]。 継代用以外の児動物について剖検、臓器重量 測定(脳, 脾臓, 胸腺および子宮)、雌雄各 1 匹/ 腹について病理組織学的検査(子宮, 卵巣, 膣, 子宮頸部, 卵管, 精巢, 精巢上体, 前立腺, 凝固 腺, 精囊, 肉眼的病変部) |

(次頁に続く)

表 1 (続き)

| 世代 | 期間(週間) | 交配・調整・選抜 | 観察・検査項目 |
|-------|---------------|------------|--|
| F1 | 生育(16週間) | (P世代に準ずる) | (P世代に準ずる) |
| | 交配 (最長2週間) | | (P世代に準ずる) |
| | 妊娠(3週間) | (P世代に準ずる) | (P世代に準ずる) |
| | 出産..... | | 児動物 |
| F2 | 哺育(3週間) | (P世代に準ずる) | 肛門生殖結節間距離の測定 |
| | 離乳..... | (F1世代に準ずる) | |
| | | | (F1世代に準ずる) 親動物(F1)および児動物(F2)の剖検、 臓器重量測定、病理組織学的検査(P世代、 F1児動物に準ずる)、 |

結果：概要を表3に示した。

[親動物]

一般症状および死亡率；

死亡例は認められなかった。

雄においてはP世代およびF1世代のいずれにも投与に関連する一般状態の変化は観察されなかった。

雌においては2500ppm群のP世代ならびにF1世代で尿による被毛の汚れが認められ、特に妊娠期間中での頻度の増加(P世代；母動物25匹中12匹，F1世代は母動物28匹中7匹)は統計学的有意であった。しかし、他には関連する所見を認めず、検鏡所見も伴わない事から尿による被毛の汚れは有害影響でないと考えられた。100ppmおよび500ppmでは、検体に関連する一般状態変化は観察されなかった。

体重および摂餌量；

交配前の10週間、妊娠期間および哺育期間中、雌雄のP世代およびF1世代いずれの投与群にも平均体重、平均体重増加および平均摂餌量に有害影響は認めなかった。

発情周期日数および発情回数；

発情周期日数または発情回数について、両世代ともにいずれの投与群でも、検体に起因した影響は見られなかった。

精子測定；

両世代ともに、評価した精子パラメーターに検体投与に関連した影響は認められなかった。2500ppmのF1世代雄では、精子運動性および精巣中の精子数について対照群に比べ統計学的に有意な増加がみられた。しかし、この有意な増加は対照群の2例の測定値が明らかに低値を示したことによるもので、これらの統計学的に有意な増加は偶発的なものと考えられた。

繁殖成績；

P世代雌ではいずれの投与群でも、妊娠期間に影響はなかった。

F1世代の2500ppmの雌で、妊娠期間の中央値（対照群の22日に対し22.5日）に僅かなものの統計学的に有意な増加が見られた。これは、妊娠23日目以降に出産したF1世代の雌が多かった（2500ppm-妊娠23～24日；14匹，対照群-妊娠23日～26日；4匹）ことによるものと考えられた。

その他のパラメーター（交尾率、受胎率、または出産率、授精までの日数、着床数）に関して、P世代およびF1世代ともに対照群と全投与群の間に投与による変化は認められなかった。

臓器重量；

P世代では2500ppm群の雌雄で肝臓の対体重比が統計学的に有意に増加し、更に雌では実重量も有意に増加した。他の臓器（精巣，精巣上体）でも重量に統計学的に有意な差が認められたが、以下の一つあるいはいくつかの理由から検体による影響とは考えられなかった。1)病理組織学的所見を伴わない。2)精巣/精巣上体では精子数および運動性に関連する変化がない。3)統計学的に有意な差が、実重量と対体重比、両側性の臓器の両方、両世代共にみられない。4)用量に関連していない。

F1世代では2500ppm群の雌雄で肝臓の対体重比の増加がみられ、実重量に統計学的に有意な増加が認められていないが、本検体の標的臓器であり、P世代でも増加が認められていることから検体の影響と考えられた。また2500ppm群の雌において右側の腎臓の対体重比の増加が、そして500ppm群以上の雌で左側の甲状腺で対体重比の増加が統計学的有意差を伴ってみられたが、片側のみの変化であったこと、実重量に統計学的に有意な差が認められていないことから、腎臓、甲状腺での有意な差は検体の影響とは考えられなかった。

剖 検；

P世代およびF1世代いずれの投与群においても、投与に関連する変化は認められなかった。

病理組織学的検査；

病理組織学的検査ではP世代ならびにF1世代共に2500ppm群の雌での肝臓で軽微な小葉中心性ないしは中間帯の肝細胞肥大の頻度の増加が統計学的有意差を伴って観察された。

また、F1世代では甲状腺においてコロイド変化[#]の統計学的に有意な頻度の増加が、雌の500ppm以上の群で、そして濾胞細胞肥大が雌雄共に500ppm以上の群で対照群に比べ統計学的に有意な頻度の増加がみられた。表2にその頻度と程度を示す。

[#]：斑点状，顆粒状あるいは凝集したコロイドを示す。

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

表2 甲状腺で認められた病理組織学的所見の頻度および程度
[P世代]

| 性 | 雄 | | | | 雌 | | | |
|---------------------|----|-----|-----|------|----|-----|-----|------|
| | 0 | 100 | 500 | 2500 | 0 | 100 | 500 | 2500 |
| 投与用量 (ppm) | 0 | 100 | 500 | 2500 | 0 | 100 | 500 | 2500 |
| 供試動物数 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| コロイド変化 [#] | | | | | | | | |
| 軽微 | 2 | 5 | 6 | 4 | 2 | 0 | 2 | 3 |
| 軽度 | 8 | 2 | 5 | 6 | 4 | 8 | 5 | 4 |
| 中等度 | 5 | 7 | 3 | 9 | 1 | 7 | 4 | 1 |
| 合計 | 15 | 14 | 14 | 19 | 7 | 15* | 11 | 8 |
| 濾胞細胞肥大 | | | | | | | | |
| 軽微 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 3 | 2 |
| 軽度 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 3 |
| 合計 | 1 | 0 | 4 | 1 | 2 | 0 | 4 | 5 |

*; p<0.05, **; p<0.01 (Fisher 検定)

[F1世代]

| 性 | 雄 | | | | 雌 | | | |
|---------------------|----|-----|-----|------|----|-----|-----|------|
| | 0 | 100 | 500 | 2500 | 0 | 100 | 500 | 2500 |
| 投与用量 (ppm) | 0 | 100 | 500 | 2500 | 0 | 100 | 500 | 2500 |
| 供試動物数 | 30 | 30 | 30 | 30 | 29 | 30 | 30 | 30 |
| コロイド変化 [#] | | | | | | | | |
| 軽微 | 1 | 3 | 3 | 2 | 0 | 2 | 4 | 4 |
| 軽度 | 3 | 2 | 4 | 5 | 0 | 2 | 1 | 2 |
| 中等度 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 合計 | 4 | 6 | 7 | 9 | 0 | 4 | 5* | 6* |
| 濾胞細胞肥大 | | | | | | | | |
| 軽微 | 0 | 0 | 2 | 5 | 0 | 0 | 5 | 4 |
| 軽度 | 0 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 中等度 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 合計 | 0 | 0 | 5* | 8** | 0 | 0 | 6* | 6* |

*; p<0.05, **; p<0.01 (Fisher 検定, 申請者により実施)

[#]: 斑点状, 顆粒状あるいは凝集したコロイドを示す。

このほかには検体に起因すると考えられる所見は認められなかった。

卵胞数および黄体数;

前胞状卵胞、胞状卵胞および黄体数に投与による変化は認められなかった。

[児動物]

出生から離乳までのデータおよび一般状態；

F1 児動物では出生から離乳にかかわる項目について検体の影響はいずれの投与群においても認められなかった。

F2 児動物では 2500ppm において、生児出生率および 4 日目生存率に低下傾向がみられ、統計学的な有意差は伴わないわずかな低下であったが、当該試験施設の背景データ*の下限を下回っていた。このわずかな低下は 2500ppm 群 F2 児で死産児+行方不明/共食い+死亡児の合計数が対照群に比べわずかに増加したことによるものであった。これらの児の行方不明や死亡の発見はほぼ出生 1 日目までに発生し、哺育率には影響は認められなかった。500ppm 以下では何ら変化は認められなかった。

また、F1 および F2 児ともにいずれの投与群においても一般状態の変化は認められなかった。

*背景データ (2003~2009 年)；

生児出生率-96.7~100%, 生存率(4 日目)-95.4~99.7%

体 重；

F1 および F2 児ともに出生時における体重にいずれの検体投与群も対照群との間に差は認められなかった。また哺育期間中の体重、体重増加量についても同様に対照群と投与群の間に差は認められなかった。

性成熟に関する指標；

F1 児で検査した膣開口または包皮分離に達するまでの平均日数にはいずれの投与群でも対照群に比べ有意な影響は観察されなかった。

申請者注)雄では、累積達成動物数が生後 47 および 48 日目のみに対照群に比べ統計学的に有意に低下したが、一時的なものであり、偶発的なものと考えた。

肛門生殖結節間距離；

F2 児では雌雄ともにいずれの投与群においても影響は認められなかった。

臓器重量；

F1 および F2 児ともにいずれの投与群においても影響は認められなかった。

剖 検；

F1 および F2 児ともにいずれの投与群においても影響は認められなかった。

病理組織学的検査；

F1 および F2 児ともにいずれの投与群においても影響は認められなかった。

結果を下記に要約する。

親動物に対する毒性

P世代およびF1世代の雌雄ともに2500ppm群で肝臓重量の増加がみられ、更に雌では両世代共に、肝細胞肥大の発生率の増加が認められた。また、甲状腺のコロイド変化の頻度の増加がF1世代の雌の500ppm以上で、濾胞細胞の肥大の頻度の増加がF1世代の雌雄の500ppm以上で認められた。

以上のことから親動物に対する無毒性量(NOEL)は雌雄ともに100ppmと判断された。

繁殖性に対する毒性

雄では2500ppmまでいずれの世代においても影響はみられなかった。

2500ppm群ではF1世代の雌に、妊娠期間の中央値にわずかな増加がみられた。

以上のことから繁殖性に対する無毒性量(NOEL)は雄では2500ppm以上、雌では500ppmと判断された。

児動物に対する毒性

F2児動物では2500ppmにおいて生児出生率および4日目生存率にわずかな低下傾向がみられた。

以上のことから児動物に対する無毒性量(NOEL)は雌雄ともに500ppmと判断された。

以上の結果から、総合的な無毒性量(NOEL)は親動物に対する影響をもとに、雌雄ともに100ppm(P世代: 雄 6.8mg/kg/日, 雌 8.3mg/kg/日, F1世代: 6.3mg/kg/日, 雌 7.4mg/kg/日)を設定した。

表 3 : 結果の概要

[親動物]

| 世代 | | 親 : P | | | | 親 : F ₁ | | | | |
|---------------------------------------|---------------|---------|-------|-------|-------|--------------------|-------|-------|-------|-------|
| 用量 (ppm) | | 0 | 100 | 500 | 2500 | 0 | 100 | 500 | 2500 | |
| 動物数 | 雄/雌 | 30/30 | 30/30 | 30/30 | 30/30 | 30/30 | 30/30 | 30/30 | 30/30 | |
| 死亡数 | 雄/雌 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | |
| 一般状態 ⁿ⁾ (尿による被毛 の汚れ) | 雄 | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| | 雌 | 0 | 0 | 0 | ↑12 | 0 | 0 | 1 | ↑7 | |
| 平均検体摂取量 (交配前期間) (mg/kg/day) | 雄 | 0 | 6.8 | 35.0 | 171.8 | 0 | 6.3 | 32.4 | 158.9 | |
| | 雌 | 0 | 8.3 | 40.2 | 200.5 | 0 | 7.4 | 38.6 | 186.8 | |
| 平均体重 (g) | ♂ | 14 週目 | 441.9 | 444.8 | 450.9 | 435.4 | 445.2 | 438.3 | 451.2 | 434.1 |
| | ♀ | 10 週目 | 240.4 | 236.9 | 239.0 | 240.7 | 243.3 | 242.9 | 241.9 | 238.5 |
| | ♀ 妊娠 期間 | 0 日目 | 243.4 | 239.8 | 241.4 | 245.2 | 241.6 | 242.6 | 241.0 | 239.0 |
| | | 6 日目 | 260.6 | 253.7 | 259.9 | 263.1 | 249.8 | 254.6 | 256.5 | 252.9 |
| | | 13 日目 | 279.1 | 273.3 | 278.7 | 283.7 | 273.9 | 276.3 | 274.2 | 274.2 |
| | | 20 日目 | 339.4 | 326.8 | 346.1 | 343.3 | 331.8 | 335.8 | 338.7 | 330.3 |
| | ♀ 哺育 期間 | 0 日目 | 258.5 | 259.0 | 265.5 | 269.4 | 264.6 | 262.0 | 263.8 | 258.5 |
| | | 4 日目 | 269.4 | 271.4 | 276.4 | 279.9 | 271.0 | 275.8 | 275.3 | 264.5 |
| | | 7 日目 | 278.0 | 279.9 | 280.6 | 283.4 | 279.5 | 282.4 | 278.0 | 274.7 |
| | | 14 日目 | 297.6 | 297.2 | 297.7 | 302.0 | 302.6 | 307.3 | 309.8 | 299.8 |
| 21 日目 | | 291.0 | 293.7 | 289.6 | 294.4 | 283.7 | 287.3 | 283.9 | 281.1 | |
| 平均体重 増加量 (g) | ♂ | 1-14 週目 | 168.3 | 171.9 | 171.5 | 157.1 | 144.2 | 140.0 | 149.9 | 142.6 |
| | ♀ | 交配前 | 64.4 | 64.0 | 56.2 | 59.1 | 49.1 | 49.5 | 49.5 | 49.6 |
| 平均摂餌 量(g/動物 /日) | ♂ | 交配前 | 24.1 | 23.9 | 24.7 | 23.7 | 24.0 | 22.9 | 23.6 | 22.6 |
| | ♀ | 交配前 | 17.2 | 17.1 | 17.1 | 17.1 | 16.9 | 16.5 | 16.6 | 16.0 |
| | | 妊娠期間 | 19.1 | 18.6 | 19.2 | 19.7 | 17.9 | 18.2 | 18.8 | 18.5 |
| | | 哺育期間 | 45.4 | 46.5 | 45.8 | 46.1 | 43.1 | 45.4 | 46.1 | 45.3 |
| 平均摂餌 量(g/kg/ 日) | ♂ | 交配前 | 67.8 | 67.6 | 69.4 | 68.2 | 64.8 | 63.5 | 63.5 | 63.4 |
| | ♀ | 交配前 | 80.9 | 82.0 | 79.8 | 79.6 | 77.1 | 75.4 | 75.7 | 74.5 |
| | | 妊娠期間 | 73.1 | 72.8 | 73.8 | 75.0 | 70.2 | 70.6 | 73.2 | 72.4 |
| | | 哺育期間 | 162.9 | 167.5 | 162.7 | 162.1 | 152.4 | 159.7 | 162.2 | 163.2 |

↑ : p<.05 ◆p<.01 (一般状態 ; Fisher 検定, 体重・摂餌量 ; Dunnett 検定)

ⁿ⁾雌は妊娠期間中の所見数を示した。

— : 影響なし

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

[親動物] (続き)

| 世代 | | 親 : P | | | | 親 : F ₁ | | | | |
|----------|-----------------------|---------|-------|------|-------|--------------------|-------|-------|-------|-------|
| 用量 (ppm) | | 0 | 100 | 500 | 2500 | 0 | 100 | 500 | 2500 | |
| 雄 | 精子運動性 | 運動率 (%) | 89.5 | 93.8 | 93.8 | 90.2 | 87.8 | 93.6 | 92.5 | ↑94.7 |
| | | 前進率 (%) | 61.9 | 64.3 | 65.0 | 62.1 | 60.5 | 64.5 | 64.2 | ↑69.8 |
| | 精子数 (精子/g) | 精巢 | 34.4 | --- | --- | 32.8 | 41.5 | --- | --- | ↑48.8 |
| | | 精巢上体 | 130.9 | --- | --- | 117.8 | 158.8 | --- | --- | 171.6 |
| | 精子形態 (平均総数) | 正常 | 190.6 | --- | --- | 185.0 | 190.1 | --- | --- | 198.3 |
| | | 異常 | 2.5 | --- | --- | 1.6 | 3.0 | --- | --- | 1.5 |
| 頭部分離 | | 0.3 | --- | --- | 0.2 | 0.2 | --- | --- | 0.2 | |
| 雌 | 発情周期 | | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | 同居させた雌雄数 | | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| | 交尾動物数 | | 28 | 29 | 27 | 29 | 30 | 30 | 28 | 30 |
| | 出産した動物数 | | 26 | 28 | 27 | 28 | 30 | 30 | 27 | 28 |
| | 着床した動物数 | | 27 | 28 | 27 | 28 | 30 | 30 | 27 | 28 |
| | 交尾率 (%) | | 93.3 | 96.7 | 90.0 | 96.7 | 100.0 | 100.0 | 93.3 | 100.0 |
| | 受胎率 (%) ^{a)} | | 96.4 | 96.6 | 100.0 | 96.6 | 100.0 | 100.0 | 96.4 | 93.3 |
| | 出産率 (%) | | 96.3 | 96.4 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 96.4 |
| | 受精までの平均日数 | | 3.2 | 2.3 | 2.7 | 2.2 | 2.3 | 2.4 | 2.7 | 2.6 |
| | 妊娠期間(日)平均 | | 22.2 | 22.2 | 22.3 | 22.4 | 22.1 | 22.2 | 22.1 | 22.5 |
| | 妊娠期間(日)中央値 | | 22.0 | 22.0 | 22.0 | 22.0 | 22.0 | 22.0 | 22.0 | ↑22.5 |
| | 平均卵胞数 | 原始卵胞 | --- | --- | --- | --- | 7.36 | --- | --- | 6.69 |
| | および 黄体数 | 胞状卵胞 | --- | --- | --- | --- | 4.38 | --- | --- | 5.47 |
| 黄体 | | --- | --- | --- | --- | 3.77 | --- | --- | 3.5 | |

— : 影響なし, --- : 未実施

↑ : p<0.05

(精子パラメータ ; ANOVA 検定)

(繁殖成績 ; Fisher 検定あるいは Dunn 検定)

(卵胞数/黄体数 ; t-検定)

[親動物] (続き)

| 世代 | | 親 : P | | | | 親 : F ₁ | | | | | | |
|----------|-------------|---------------------------|--------|-------|--------|--------------------|---------|--------|-------|-------|---------|--------|
| 用量 (ppm) | | 0 | 100 | 500 | 2500 | 0 | 100 | 500 | 2500 | | | |
| a) | 最終体重 | ♂ | — | — | — | — | — | — | — | | | |
| | | ♀ | — | — | — | — | — | — | — | | | |
| | 肝臓(実重量) | ♀ | — | — | — | ↑112 | — | — | — | | | |
| | 肝臓(対体重比) | ♂ | — | — | — | ↑108 | — | — | — | ↑107 | | |
| | | ♀ | — | — | — | ↑110 | — | — | — | ↑107 | | |
| | 臓器重量 | 精巣上体尾部(実重量) | ♂ | — | ↓90 | — | ↓87 | — | — | — | | |
| | | | ♀ | — | ↓90 | ↓95 | ↓89 | — | — | — | | |
| | 臓器重量 | 精巣(実重量) /左 | ♂ | — | — | — | ↓90 | — | — | — | | |
| | | | ♀ | — | — | — | ↓88 | — | — | — | | |
| | 臓器重量 | 精巣上体(実重量) /左 | ♂ | — | — | — | ↓90 | — | — | — | | |
| | | | ♀ | — | — | — | ↓88 | — | — | — | | |
| | 臓器重量 | 精巣上体(対体重比) /左 | ♂ | — | — | — | ↓90 | — | — | — | | |
| ♀ | | | — | — | — | ↓90 | — | — | — | | | |
| 臓器重量 | 子宮(実重量) | ♂ | — | — | — | — | — | — | ↓79 | | | |
| | | ♀ | — | — | — | — | — | — | ↓79 | | | |
| 臓器重量 | 腎臓/右(対体重比) | ♂ | — | — | — | — | — | — | ↑105 | | | |
| | | ♀ | — | — | — | — | — | — | ↑105 | | | |
| 臓器重量 | 甲状腺/左(対体重比) | ♂ | — | — | — | — | — | ↑133 | ↑133 | | | |
| | | ♀ | — | — | — | — | — | ↑133 | ↑133 | | | |
| 肉眼的病理検査 | | ♂ | — | — | — | — | — | — | — | | | |
| | | ♀ | — | — | — | — | — | — | — | | | |
| b) | 病理検査 | 肝臓 : 肝細胞肥大 (小葉中心性/中間帯) | ♂ | 0(30) | --- | --- | 0(30) | 0(30) | --- | --- | 0(30) | |
| | | | ♀ | 0(30) | --- | 0(30) | ↑18(30) | 0(30) | --- | 0(30) | ↑15(30) | |
| | 病理検査 | 甲状腺 : | コロイド変化 | ♂ | 15(30) | 14(30) | 14(30) | 19(30) | 4(30) | 6(30) | 7(30) | 9(30) |
| | | | | ♀ | 7(30) | ↑15(30) | 11(30) | 8(30) | 0(30) | 4(30) | ↑5(30) | ↑6(30) |
| | 病理検査 | 甲状腺 : | 濾胞肥大 | ♂ | 1(30) | 0(30) | 4(30) | 1(30) | 0(30) | 0(30) | ↑5(30) | ↑8(30) |
| | | | | ♀ | 2(30) | 0(30) | 4(30) | 5(30) | 0(30) | 0(30) | ↑6(30) | ↑6(30) |

— : 有意差なし、または著変なし, --- : 未実施

a) : 数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表す。b) : 所見数(検査数)

↑ ↓ : p<0.05(体重・臓器重量 ; Dunnett 検定 Mann-Whitney U 検定)

(病理検査 ; Fisher 検定, 申請者により実施)

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。

[児動物]

| 世代 | | 親：P/児：F ₁ | | | | 親：F ₁ /児：F ₂ | | | |
|-------------------|--|----------------------|---------------|---------------|---------------|------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| 用量 (ppm) | | 0 | 100 | 500 | 2500 | 0 | 100 | 500 | 2500 |
| 腹数 | | 26 | 28 | 27 | 28 | 30 | 30 | 27 | 28 |
| 総着床痕数 (中央値) | | 302 (12.0) | 319 (12.0) | 322 (12.0) | 331 (13.0) | 332 (11.5) | 330 (12.0) | 318 (12.0) | 310 (11.0) |
| 総出産数 | | 295 | 286 | 313 | 317 | 318 | 314 | 302 | 288 |
| 総行方不明児数 (腹数) | | 2(2) | 3(3) | 1(1) | 0(0) | 3(3) | 0(0) | 2(2) | 12(4) |
| 総死亡児数 (腹数) | | 5(3) | 0(0) | 2(2) | 1(1) | 3(3) | 0(0) | 3(3) | 3(3) |
| 総共食い数 (腹数) | | 0(0) | 3(1) | 0(0) | 0(0) | 8(1) | 0(0) | 0(0) | 5(2) |
| 死産数 | | 8 | 3 | 0 | 2 | 4 | 1 | 1 | 10 |
| 性比 (雄の比率) | | 52.3 | 53.1 | 43.8 | 49.1 | 48.2 | 49.0 | 48.6 | 53.0 |
| 平均同腹児数 | | 11.3 | 10.2 | 11.6 | 11.3 | 10.6 | 10.5 | 11.2 | 10.3 |
| 出生率 | | 94.5 | 90.0 | 96.1 | 95.5 | 95.7 | 95.2 | 95.1 | 93.1 |
| 生児出生率 | | 97.3 | 95.6 | 100.0 | 99.5 | 96.5 | 99.7 | 99.6 | 92.3 |
| 4日生存率 | | 97.0 | 99.1 | 99.3 | 99.7 | 98.1 | 100.0 | 98.9 | 91.2 |
| 哺育率 | | 99.5 | 100.0 | 99.5 | 100.0 | 99.6 | 100.0 | 99.1 | 99.5 |
| 体重 ♂/♀ | | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- |
| 平均包皮分離日数 | | 43.7 | 44.3 | 44.3 | 45.9 | --- | --- | --- | --- |
| 包皮分離 検査数 | | 35 | 35 | 35 | 34 | --- | --- | --- | --- |
| 動物数 生後 47 日 (%) | | 32 (91.4) | 24 (68.6) | 29 (82.9) | ↓22 (64.7) | --- | --- | --- | --- |
| 48 日 (%) | | 33 (94.3) | 26 (74.3) | 32 (91.4) | ↓24 (70.6) | --- | --- | --- | --- |
| 55 日 (%) | | 35 (100.0) | 35 (100.0) | 35 (100.0) | 34 (100.0) | --- | --- | --- | --- |
| 平均膈開口日数 | | 35.9 | 35.8 | 35.6 | 37.1 | --- | --- | --- | --- |
| 肛門生殖結節間 距離 (mm) ♂ | | --- | --- | --- | --- | 2.0 | 2.0 | 2.1 | 2.0 |
| ♀ | | --- | --- | --- | --- | 4.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0 |
| 臓器重量 | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 肉眼的病理検査 | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 病理組織学的検査 | | - | - | - | - | - | - | - | - |

↓ : p<.05 (体重、臓器重量 ; Dunnett 検定)、(着床数、同腹児数等 ; Dunn 検定)

(包皮分離/膈開口達成動物数、病理検査 ; Fisher 検定)

(包皮分離/膈開口達成平均日 ; 雄:ANOVA 検定, 雌:Kruskal-Wallis 検定)

- : 所見なし --- : 未実施

ラットを用いた催奇形性試験

(毒性資料No.原体-20)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2012年

検体の純度：

試験動物：Cr1:CD(SD) Sprague-Dawley 妊娠雌ラット、1群当たり23匹
交配時の体重232.4~304.0g、12~16週齢

投与期間：妊娠6~20日

投与方法：

0.5%メチルセルロース400水溶液に検体を懸濁し、動物に10mL/kgの容量で0、20、100および600mg/kgの投与量を、妊娠6~20日までの15日間、毎日1回強制経口投与した。

なお、膣垢塗抹標本中に精子が認められるか、膣栓が認められた日を妊娠0日とした。

投与用量設定の根拠；

観察・検査項目：

[母動物]

一般症状および死亡率；

全ての動物について一般状態を毎日、生死を少なくとも1日2回（週末と休日は1回）観察した。

体重；

妊娠0、6、8、10、12、14、16、18および21日の体重を測定し、妊娠期間中における母動物の体重増加量から子宮重量を差し引いて、補正体重増加量を計算した。

摂餌量；

妊娠1~6、6~8、8~10、10~12、12~14、14~16、16~18および18~21日の摂餌量を測定した。

剖検、肝臓重量測定および肝臓組織学的検査；

妊娠 21 日に二酸化炭素吸入により全ての母動物を屠殺し剖検した。妊娠している雌について肝臓重量を測定した。また、全ての雌の肝臓について病理組織学的検査を行った。

子宮内発育検査；

子宮重量を測定し、以下の着床所見を記録した。

- ・ 黄体数
- ・ 着床痕数(着床痕が目視で確認出来ない子宮角は 10%硫化アンモニウム溶液に浸漬し、着床痕を可視化した。)
- ・ 早期吸収胚(残留胎児と胎盤物質の肉眼による識別が困難)および後期吸収胚(胎児と胎盤遺残を肉眼で明確に識別することが可能)数
- ・ 生存胎児および死亡胎児(前肢および後肢の指が明確な死亡受胎産物)数
- ・ 生存胎児の性別
- ・ 生存胎児の体重

[生存胎児]

全生存胎児について、ペントバルビタールナトリウムの皮下注射により屠殺後、外表検査を行った。各腹約半数の個体は Bouin 液に固定し内臓検査を行った。残りの半数は内臓を取り出し無水エタノールに固定した後、アリザリンレッド S およびアルシアンブルーで染色し、骨格検査に供した。

結果：概要を表 1 および表 2 に示す。

[母動物]

一般症状および死亡率；

20mg/kg/日群の 1 例が妊娠 12~16 日に 27g 体重が減少し健康状態が悪化したため、妊娠 17 日に屠殺したが、これは歯の異常により十分に摂餌ができなかったことによるものであり、投与の影響とは考えられなかった。その他に試験期間中、母動物の死亡は認められなかった。

600mg/kg/日群で 23 例中 2 例に肛門性器部の汚れが数日間にわたり観察され、投与の影響と考えられた。その他の群では一般状態の変化は認められなかった。

体 重；

600mg/kg/日群において、妊娠 6~8 日の体重増加量が対照群に対し 67%減少した(統計学的有意差なし)。その後は体重への影響は認められなかった。またその他の群では体重への影響は認められなかった。

摂餌量；

600mg/kg/日群では、妊娠 6～8 日の摂餌量が対照群に対し 9%減少し有意差を伴った。

同群のその後、並びにその他の群では摂餌量への影響は認められなかった。

肝臓重量測定、剖検および肝臓病理組織学的検査；

肝臓重量は 600mg/kg/日群で実重量、対体重比ともに有意に増加し、投与の影響と考えられた。100mg/kg/日群でも対体重比の有意な増加が見られたものの、実重量に有意差は認められなかったことから、毒性影響とは考えられなかった。20mg/kg/日群では肝臓重量への影響は認められなかった。

600mg/kg/日群では剖検で肝臓の腫大および小葉構造明瞭化が見られ、病理組織学的検査では小葉中心性肝細胞肥大が認められた。これらはいずれも投与による影響と考えられた。100mg/kg/日群でも剖検において肝臓の腫大および小葉構造明瞭化の発生頻度の増加傾向が見られ、病理組織学的検査では小葉中心性肝細胞肥大の発生頻度は有意に増加し、いずれも投与に起因したものと考えられた。

20mg/kg/日群では剖検および病理組織学的検査で異常は認められなかった。

子宮内発育(着床所見)；

いずれの投与群においても検体投与による着床所見への影響は認められなかった。

[胎児]

外表検査；

検体投与に起因すると考えられる外表異常は認められなかった。なお、600mg/kg/日群の 1 例で、内臓検査において無眼球症に相当する眼部隆起欠損(片側：奇形)が見られたが、この所見は 1 例のみの発生であり、背景データ*の範囲内(胎児単位 0.0～0.3%，担所見腹数/検査腹数：0.0%～4.5%)であったことから、自然発生性なものと考えられた。

*：同試験施設の 16 試験のデータ(2001～2009 年)、以下の項目でも同様

内臓検査；

600mg/kg/日群の 1 例に、奇形である無眼球症(外表検査で観察された片側の眼部隆起欠損に対応)がみられ、この動物は胸腺頸部遺残(変異)および蛇行性尿管(変異)を伴っていた。無眼球症は 1 例のみの発生であり、眼部隆起欠損に呼応している所見であることから、自然発生性なものと考えられた。その他に認められた奇形については用量との関連性もないことから、偶発的なものと考えられた。

また、600mg/kg/日群では胸腺頸部遺残(変異)の発生頻度が胎児数および腹数ともに有意に増加した。この所見は、胎児の軽度な発達遅延を示唆しており、投与に起因したものと考えられた。

その他に検体投与に起因すると考えられる内臓の異常は認められなかった。

骨格検査；

600mg/kg/日群において、頸部および胸部の複合奇形が1例に認められたが、この動物における各所見は背景データでも認められており、また1例のみの発生であったことから、偶発的なものと考えられた。また、頭頂間骨の分離、前頭骨の分離、第13肋骨の短小肋骨/肋軟骨欠損、上後頭骨の不完全化骨および第5および/又は第6胸骨分節の不完全化骨の発生頻度が胎児数および腹数ともに増加し、胎児数の頻度はいずれも背景データの範囲を超えたことから、投与の影響と考えられたがいずれも母毒性の認められる用量であった。

その他に検体投与に起因すると考えられる骨格の異常は認められなかった。

以上の結果から、600mg/kg/日群では母動物に対し肛門性器部の汚れ、体重の増加抑制、摂餌量の低下、肝臓の腫大および小葉構造明瞭化、肝臓重量増加および小葉中心性肝細胞肥大がみられた。

100mg/kg/日群では母動物において小葉中心性肝細胞肥大が認められた。

胎児に対する影響、子宮内発育/着床所見および奇形の発生頻度に投与の影響はいずれの群でも認められなかった。

従って、本試験における無毒性量は、母動物が20mg/kg/日、胎児動物が600mg/kg/日*と考えられた。また、最高投与量の600mg/kg/日でも催奇形性はないものと判断される。

*(申請者注)

表 1 母動物

| 用量 (mg/kg/日) | | 0 | 20 | 100 | 600 | |
|--------------------------|--------------------------|-------|----------------------|--------|--------------|------|
| 交尾動物数 | | 23 | 23 | 23 | 23 | |
| 妊娠動物数 | | 23 | 22 | 23 | 23 | |
| 妊娠率 (%) | | 100 | 96 | 100 | 100 | |
| 死亡動物数 | | 0 | 1(切迫屠殺) [#] | 0 | 0 | |
| 流産動物数 | | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 全吸収胚動物数 | | 0 | 0 | 1 | 0 | |
| 一般状態 | | 異常なし | 異常なし | 異常なし | 肛門性器部の汚れ(2例) | |
| 体重増加量 (g) ^a | 妊娠 6-8 日 | 4.3 | 4.5 | 5.6 | 1.4 | |
| | 妊娠 8-10 日 | 9.2 | 9.3 | 7.1 | 10.8 | |
| | 妊娠 10-14 日 | 19.7 | 18.8 | 19.5 | 19.0 | |
| | 妊娠 14-18 日 | 45.1 | 42.7 | 40.6 | 43.3 | |
| | 妊娠 18-21 日 | 53.1 | 54.5 | 53.8 | 52.3 | |
| | 妊娠 6-21 日 | 131.5 | 131.0 | 126.5 | 126.8 | |
| 補正体重増加量 (g) ^a | | 56.4 | 52.5 | 54.9 | 49.9 | |
| 摂餌量 (g/日) ^a | 妊娠 6-8 日 | 24.8 | 24.4 | 24.9 | ↓22.5 | |
| | 妊娠 8-10 日 | 24.5 | 23.6 | 24.3 | 23.7 | |
| 最終体重(妊娠 21 日) (g) | | 427.2 | 425.2 | 423.5 | 424.6 | |
| 肝臓重量 ^{a,b} | 実重量 | 100 | 98 | 108 | ↑117 | |
| | 対体重比 ^c | 100 | 98 | ↑109 | ↑117 | |
| 剖検 ^d | 肝臓腫大 | 0/23 | 0/23 | 4/23 | 7**/23 | |
| | 肝小葉明瞭化 | 0/23 | 0/23 | 1/23 | 7**/23 | |
| 病理組織学的検査 ^d | 小葉中心性肝細胞肥大 | 0/23 | 0/22 | 9**/23 | 22**/23 | |
| 着床所見 | 検査母動物数 | | 23 | 21 | 23 | 23 |
| | 黄体数 ^a | | 16.5 | 17.2 | 15.6 | 16.3 |
| | 着床痕数 ^a | | 14.5 | 15.1 | 14.3 | 14.9 |
| | 生存胎児数 | | 13.5 | 14.3 | 13.4 | 14.3 |
| | 死亡胎児数 | | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 早期吸収胚数 ^a | | 1.0 | 0.8 | 0.8 | 0.5 |
| | 後期吸収胚数 ^a | | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 |
| | 着床前胚損失率 (%) ^a | | 11.9 | 10.0 | 10.6 | 8.2 |
| | 着床後胚損失率 (%) ^a | | 6.0 | 5.3 | 9.7 | 4.1 |
| | 胎児性比(雄%) ^e | | 52.7 | 49.1 | 48.8 | 47.8 |
| | 胎児体重 (g) ^a | 雄 | 5.67 | 5.60 | 5.69 | 5.59 |
| | | 雌 | 5.40 | 5.37 | 5.38 | 5.29 |
| | | 雌雄合計 | 5.55 | 5.49 | 5.53 | 5.42 |

a : Dunnett 検定又はDunn 検定 ↑ ↓ : p<0.05、▲ : p<0.01

b : 対照群を 100 とした場合の値を示す

c : 申請者の計算による

d : Fisher 検定 * : p<0.05、** : p<0.01(申請者の計算による)

e : χ^2 検定

着床所見 : 腹単位

: 歯の異常により十分に摂餌ができず、一般状態が悪化したため切迫屠殺した。

表 2 胎児動物

| 用量 (mg/kg/日) | | 0 | 20 | 100 | 600 |
|--------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| 外表 検査 | 検査胎児(腹)数 | 311 (23) | 300 (21) | 309 (22) | 328 (23) |
| | 眼部隆起欠損(片側性) | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 1 (1) {0.3} [0.3] |
| | 奇形 | | | | |
| 内臓 検査 | 検査胎児(腹)数 | 150 (23) | 144 (21) | 149 (22) | 159 (23) |
| | 無眼球症(片側性) | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 1 (1) {0.6} [0.5] |
| | 奇形 | | | | |
| | 腎盂拡張(片側性) | 0 (0) {0.0} [0.0] | 1 (1) {0.7} [0.6] | 1 (1) {0.7} [0.8] | 0 (0) {0.0} [0.0] |
| | 奇形 | | | | |
| 網膜皺壁(片側性/両側性) | 1 (1) {0.7} [1.1] | 2 (1) {1.4} [1.6] | 2 (2) {1.3} [1.4] | 1 (1) {0.6} [0.5] | |
| 奇形 | | | | | |
| 胸腺頸部遺残 | 11 (6) {7.3} [6.9] | 6 (3) {4.2} [3.9] | 10 (9) {6.7} [6.8] | 23* (13*) {14.5} [14.8] | |
| 骨格 検査 | 検査胎児(腹)数 | 161 (23) | 156 (21) | 160 (22) | 169 (23) |
| | 複合奇形 ^a | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 1 (1) {0.6} [0.6] |
| | 奇形 | | | | |
| | 頭頂間骨：分離 | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 2 (2) {1.2} [1.2] |
| | 変異 | | | | |
| | 前頭骨：分離 | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 2 (2) {1.2} [1.3] |
| | 変異 | | | | |
| | 第13肋骨短小肋骨/肋軟骨欠損 (片側性/両側性) | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 1 (1) {0.6} [0.6] | 10** (3) {5.9} [5.9] |
| | 変異 | | | | |
| 第7肋軟骨の胸骨未連結 (片側性/両側性) | 9 (4) {5.6} [5.2] | 7 (4) {4.5} [4.9] | 7 (7) {4.4} [4.4] | 17 (6) {10.1} [9.4] | |
| 変異 | | | | | |
| 第5および/又は第6胸骨分節： 不完全化骨 | 19 (9) {11.8} [13.1] | 18 (10) {11.5} [12.1] | 23 (12) {14.4} [13.8] | 37* (15) {21.9} [22.5] | |
| 化骨 遅延 | | | | | |
| 第5および/又は第6胸骨分節： 未化骨 | 1 (1) {0.6} [0.5] | 2 (1) {1.3} [1.4] | 3 (2) {1.9} [2.4] | 3 (3) {1.8} [1.6] | |
| 化骨 遅延 | | | | | |
| 上後頭骨：不完全化骨 | 2 (2) {1.2} [1.1] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 3 (3) {1.8} [1.8] | |
| 化骨 遅延 | | | | | |

() : 担所見腹数

{ } : 異常胎児発現率 (%、異常胎児発現数/検査胎児数)

[] : 腹毎の異常胎児発現率の平均 (%、申請者の計算による)

a : 第6頸椎体軟骨の分離、第3および第4頸椎体軟骨の癒合(片側性)、第5から第7頸椎体軟骨および第1胸椎体軟骨の癒合(片側性)、第4および第5頸椎弓軟骨の癒合(片側性)、第5胸椎体の分離/軟骨分離、第5および第6半椎体の癒合(片側性)

* : p<0.05、** : p<0.01

異常胎児発現数および影響を受けた腹数は Fisher 検定

腹毎の異常胎児発現率の平均は Steel 検定 (申請者の計算による)

ウサギを用いた催奇形性試験

(毒性資料No.原体-21)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2012年

検体の純度：

試験動物： Cr1:KBL (NZW) New Zealand White 妊娠雌ウサギ、1群当たり 23 匹
妊娠 3 日 (試験施設で最初に体重測定を行った日) の体重 2.96~3.89kg
18±1 週齢

投与期間： 妊娠 6~28 日

投与方法：

0.5%メチルセルロース 400 水溶液に検体を懸濁し、動物に 4mL/kg の容量で 0、15、30 および 75mg/kg の投与量を、妊娠 6~28 日までの 23 日間、毎日 1 回強制経口投与した。

交配日を妊娠 0 日とした。

投与用量設定の根拠；

観察・検査項目：

[母動物]

一般症状および死亡率；

全ての動物について一般状態を毎日、生死を少なくとも1日2回（週末と休日は1回）観察した。

体重；

妊娠3、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26および29日の体重を測定し、妊娠6～29日における母動物の体重増加量から子宮重量を差し引いて、補正体重増加量を計算した。

摂餌量；

妊娠3～4、4～5、5～6、6～8、8～10、10～12、12～14、14～16、16～18、18～20、20～22、22～24、24～26、26～28および28～29日の摂餌量を測定した。

剖検、肝重量測定および肝組織学的検査；

妊娠29日にペントバルビタールの静脈内注射により全ての母動物を屠殺・剖検し、妊娠している雌について肝臓重量を測定した。また、対照群および75mg/kg/日群の雌の肝臓について病理組織学的検査を行った。

子宮内発育検査；

子宮重量を測定し、以下の着床所見を記録した。

- ・ 黄体数
- ・ 着床痕数（着床痕が目視で確認出来ない子宮角は20%硫化アンモニウム溶液に浸漬し、着床痕を可視化した。）
- ・ 早期吸収胚（残留胎児と胎盤物質の肉眼による識別が困難）および後期吸収胚（胎児と胎盤遺残を肉眼で明確に識別することが可能）数
- ・ 生存胎児および死亡胎児（前肢および後肢の指が明確な死亡受胎産物）数
- ・ 生存胎児の性別
- ・ 生存胎児の体重

[生存胎児]

全生存胎児について、ペントバルビタールナトリウムの皮下注射により屠殺後、外表検査を行った。各腹の約半数の胎児については頭部を Bouin 液に浸漬、固定後内部を検査した。全ての個体について内臓を検査し、性別を確認した後、無水エタノールで固定後 Staples and Schnell の変法を用いて染色して骨格検査を行った。

結果：概要を表 1 および表 2 に示す。

[母動物]

一般症状および死亡率；

対照群の 1 例が妊娠 7 日に死亡した。この動物の肉眼的検査で、肺の左葉が虚脱していたことから、投与ミスによる死亡と考えられ、検体による死亡とはみなさなかった。また、75mg/kg/日群の 1 例が妊娠 20～26 日に 250g、妊娠 26～28 日に 330g 体重が減少した後、妊娠 28 日に流産したため、屠殺した。この動物の肉眼的検査では異常は認められなかった。流産はこの 1 例のみであること、また同群で顕著な母動物毒性は認められなかったことから、この流産が投与に関連したものとは考えられなかった。

これらのことから、検体投与に関連した死亡は認められなかった。

75mg/kg/日群で、糞便の減少を示す動物数が対照群に比し増加*(21 例中 12 例, 対照群;23 例中 6 例)し、投与の影響が考えられたが、随伴する所見が認められなかったことから毒性作用とは考えられなかった。

その他の群では一般状態の変化は認められなかった。

*申請者注)統計学的な有意差は認められなかった(申請者により Fisher 検定を実施)。

体重；

体重、体重増加量および補正体重増加量に投与の影響はいずれの投与群においても認められなかった。

摂餌量；

摂餌量は、75mg/kg/日群で妊娠 6～8 日に対照群に比し 13%減少した(統計学的に有意($p < 0.05$))。しかし今回認められた摂餌量への影響は一時的なものであり、体重に影響を及ぼすほどの減少ではなかったことから、毒性影響ではないものと判断した。

その他の群では、投与による摂餌量への影響は認められなかった。

剖検、肝重量および肝病理組織学的検査；

剖検において何ら異常はいずれの群においても認められなかった。

肝重量はいずれの群でも統計学的に有意な差は認められなかったが、75mg/kg/日群で対照群に比し実重量が 8%、対体重比が 10%増加したが、最高用量群における肝の病理組織学的検査では、何ら異常所見は認められなかったことから、75mg/kg/日群でみられた肝重量の増加は毒性作用とは考えられなかった。30mg/kg/日群以下で認められた肝重量の増加は極めて軽度であり、用量に関連した増加が認められていないことから検体の影響とは考えられなかった。

子宮内発育(着床所見)；

いずれの投与群においても検体投与による着床所見への影響は認められなかった。

[胎児]

外表検査；

検体投与に起因すると考えられる外表異常は認められなかった。

なお、75mg/kg/日群の1例に、臍帯ヘルニアが見られたが、この所見は1例のみの発生であり、過去にも認められていることから(1腹/22腹, 1胎児/213胎児)、自然発生性なものと考えられた。その他に認められた奇形についても、用量との関連がなく1例のみの発生であったことから、投与に関連したものとは考えられなかった。

内臓検査；

検体投与に起因すると考えられる内臓異常は認められなかった。

なお、心血管系の奇形が対照群も含めた各群に認められたが、用量との関連はなく、投与に関連したものとは考えられなかった。その他に認められた奇形についても、各群1例以下の発生であり、背景データでも認められていることから、偶発的なものと考えられた。

骨格検査；

検体投与に起因すると考えられる骨格異常は認められなかった。

なお、75mg/kg/日群で腰部の半椎が2例に認められ、その発現率(1.1%)は背景データの範囲を超えたものの、その他に投与に関連した軸骨格の異常が認められていないことから、この所見の発生は偶発的なものと考えられた。その他に認められた骨格奇形はいずれも各群1例の発生であり、偶発的なものと考えられた。また、第13胸肋骨および第2仙椎部下肢帯付着を示す胎児数が75mg/kg/日群で有意に増加したが、それぞれの発現率は53.9%および48.3%でいずれも背景データの範囲内であったこと、そして母動物単位で有意差がなかったことから、これらの変異の有意な増加は投与の影響とは考えられなかった。

以上の結果から、75mg/kg/日群では母動物、子宮内発育/着床所見および胎児に対して毒性所見は認められなかった。

従って、本試験における無毒性量は、母動物および胎児ともに75mg/kg/日*であった。また、最高投与量の75mg/kg/日でも胎児に対して催奇形性作用はないものと判断される。

*申請者注)

表 1 母動物

| 用量 (mg/kg/日) | | 0 | 15 | 30 | 75 | |
|---------------------------|--------------------------|--------|-------------------|-------------------|-----------------------|-------|
| 交尾動物数 | | 23 | 23 | 23 | 23 | |
| 妊娠動物数 | | 23 | 22 | 21 | 21 | |
| 妊娠率 (%) | | 100 | 96 | 91 | 91 | |
| 死亡動物数 | | 1(誤投与) | 0 | 0 | 1 ^a (切迫屠殺) | |
| 流産動物数 | | 0 | 0 | 0 | 1 ^a (切迫屠殺) | |
| 全吸収胚動物数 | | 0 | 1 | 0 | 0 | |
| 一般状態 ^b | 糞便の減少 | 6 | 9 | 6 | 12 | |
| 体重増加量 (kg) ^c | 妊娠 6-8 日 | 0.03 | 0.03 | 0.01 | 0.02 | |
| | 妊娠 6-29 日 | 0.37 | 0.36 | 0.43 | 0.36 | |
| 補正体重増加量 (kg) ^c | | -0.17 | -0.16 | -0.11 | -0.15 | |
| 摂餌量 (g/日) ^c | 妊娠 6-8 日 | 174.4 | 171.0 | 155.5 | ↓152.5 | |
| | 妊娠 8-10 日 | 177.5 | 172.2 | 167.8 | 158.7 | |
| | 妊娠 10-14 日 | 157.3 | 156.6 | 154.5 | 141.8 | |
| | 妊娠 14-18 日 | 152.1 | 138.4 | 141.9 | 135.3 | |
| | 妊娠 18-22 日 | 156.8 | 154.7 | 162.3 | 149.7 | |
| | 妊娠 22-26 日 | 108.9 | 109.7 | 129.7 | 122.1 | |
| | 妊娠 26-29 日 | 108.2 | 110.3 | 126.7 | 109.6 | |
| 最終体重(妊娠 29 日) (kg) | | 3.86 | 3.80 | 3.86 | 3.80 | |
| 肝臓重量 ^{c,d} | 実重量 | 100 | 103 | 104 | 108 | |
| | 対体重比 ^e | 100 | 105 | 104 | 110 | |
| 剖検 ^b | 肝臓腫大 | 0 | 1 | 1 | 2 | |
| 病理組織学的検査 | | — | 検査せず ^a | 検査せず ^a | 対照群と同等 | |
| 着床所見 | 検査母動物数 | | 22 | 22 | 21 | 20 |
| | 黄体数 ^c | | 11.64 | 11.50 | 11.52 | 11.30 |
| | 着床痕数 ^c | | 10.41 | 9.86 | 9.67 | 9.70 |
| | 生存胎児数 | | 9.4 | 8.9 | 9.0 | 8.9 |
| | 死亡胎児数 (%) | | 3.0 | 3.8 | 1.9 | 4.8 |
| | 早期吸収胚数 ^c | | 0.59 | 0.55 | 0.38 | 0.30 |
| | 後期吸収胚数 ^c | | 0.14 | 0.00 | 0.05 | 0.10 |
| | 着床前胚損失率 (%) ^c | | 10.55 | 13.46 | 15.65 | 14.16 |
| | 着床後胚損失率 (%) ^c | | 9.2 | 10.8 | 5.9 | 9.1 |
| | 胎児性比(雄%) ^f | | 44.0 | 47.2 | 49.4 | 54.0 |
| | 胎児体重 (g) ^c | 雄 | 39.36 | 38.87 | 41.37 | 37.84 |
| | | 雌 | 38.74 | 38.96 | 41.44 | 38.87 |
| | | 雌雄合計 | 40.28 | 38.85 | 41.39 | 37.34 |

a: 同一動物

b: Fisher 検定 * : p<0.05 (申請者の計算による)

c: Dunnett 検定又は Dunn 検定 ↓ : p<0.05

d: 対照群を 100 とした場合の値を示す

e: 申請者の計算による

f: χ^2 検定

着床所見: 腹単位

表 2 胎児動物

| 用量 (mg/kg/日) | | 0 | 15 | 30 | 75 |
|--------------|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| 検査胎児(腹)数 | | 207 (22) | 196 (21) | 190 (21) | 178 (20) |
| 外表 検査 | 無尾 | 奇形 1 (1) {0.5} [0.5] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] |
| | 前肢第一指：有茎性 (片側性) | 奇形 1 (1) {0.5} [0.5] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] |
| | 腹部膨満、体幹短縮 | 奇形 0 (0) {0.0} [0.0] | 1 (1) {0.5} [0.4] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] |
| | 短尾、曲尾 | 奇形 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 1 (1) {0.5} [0.7] | 0 (0) {0.0} [0.0] |
| | 臍帯ヘルニア | 奇形 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 1 (1) {0.6} [0.6] |
| 検査胎児(腹)数 | | 207 (22) | 196 (21) | 190 (21) | 178 (20) |
| 内臓 検査 | 頭部検査胎児(腹)数 | 97 (22) | 92 (21) | 90 (21) | 85 (20) |
| | 心血管系の奇形 ^a | 奇形 1 (1) {0.5} [0.5] | 2 (2) {1.0} [1.0] | 3 (3) {1.6} [1.9] | 1 (1) {0.6} [0.6] |
| | 腎臓欠損、尿管欠損(片側性) | 奇形 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 1 (1) {0.5} [0.5] | 0 (0) {0.0} [0.0] |
| | 網膜皺壁(片側性) | 奇形 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 1 (1) {1.1} [1.0] | 1 (1) {1.2} [1.0] |
| | 胸腺頸部遺残 | 変異 25 (11) {12.1} [11.2] | 11 (8) {5.6} [5.4] | 9 (6) {4.7} [5.7] | 25 (12) {14.0} [14.0] |
| 大静脈後尿管(片側性) | 変異 3 (2) {1.4} [1.3] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 1 (1) {0.5} [0.5] | 6 (2) {3.4} [3.8] | |

a: 心室中隔欠損、心室拡大/縮小、心房拡大/縮小、大動脈騎乗、上行大動脈・下行大動脈・大動脈弓の拡張、肺幹閉鎖、肺動脈弁欠損、動脈起始異常(右心室)等

(): 影響を受けた腹数

{ }: 異常胎児発現率 (%、異常胎児発現数/検査胎児数)

[]: 腹毎の異常胎児発現率の平均 (%、申請者の計算による)

異常胎児発現数および影響を受けた腹数は Fisher test

腹毎の異常胎児発現率の平均は Steel 検定 (申請者の計算による)

表 2 胎児動物(続き)

| 用量 (mg/kg/日) | | 0 | 15 | 30 | 75 |
|--------------|---|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 検査胎児(腹)数 | | 207 (22) | 196 (21) | 190 (21) | 178 (20) |
| 頭部検査胎児(腹)数 | | 110 (22) | 104 (21) | 100 (21) | 93 (20) |
| 骨格 検査 | 尾椎および全仙椎：癒合 尾椎：欠損 | 奇形 1 (1) {0.5} [0.5] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] |
| | 第 1 中指骨および第 1 基節骨 (片側性)：欠損 | 奇形 1 (1) {0.5} [0.5] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] |
| | 1 つの胸椎：半椎 1 つの肋骨(片側性)：欠損 | 奇形 0 (0) {0.0} [0.0] | 1 (1) {0.5} [0.5] | 1 (1) {0.5} [0.7] | 0 (0) {0.0} [0.0] |
| | 全尾椎(第 1 を除く)：癒合 | 奇形 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 1 (1) {0.5} [0.7] | 0 (0) {0.0} [0.0] |
| | 1 つの腰椎：半椎 1 つの腰椎体(半椎体)および 1 つの 腰椎体：癒合 | 奇形 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 2 (2) {1.1} [1.1] |
| | 2 つの肋骨(片側性)：癒合 2 つの胸椎体(半椎体)：癒合 | 奇形 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 0 (0) {0.0} [0.0] | 1 (1) {0.6} [0.5] |
| | 第 7 頸椎に過剰骨化部位 (両側性/片側性) | 変異 2 (2) {1.0} [0.9] | 2 (2) {1.0} [1.2] | 2 (2) {1.1} [1.0] | 3 (2) {1.7} [1.9] |
| | 第 13 胸肋骨(両側性) | 変異 81 (18) {39.1} [40.2] | 67 (16) {34.2} [32.1] | 77 (20) {40.5} [43.3] | 96** (20) {53.9} [56.2] |
| | 第 2 仙椎部下肢帯付着 (片側性/両側性) | 変異 78 (19) {37.7} [39.3] | 73 (17) {37.2} [35.3] | 85 (19) {44.7} [46.2] | 87* (19) {48.3} [48.9] |

() : 影響を受けた腹数

{ } : 異常胎児発現率 (%、異常胎児発現数/検査胎児数)

[] : 腹毎の異常胎児発現率の平均 (%、申請者の計算による)

* : p<0.05 ** : p<0.01

異常胎児発現数および影響を受けた腹数は Fisher 検定

腹毎の異常胎児発現率の平均は Steel 検定 (申請者の計算による)

(13) 変異原性

細菌を用いた復帰変異原性試験

(毒性資料No. 原体-22)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：2010年

検体純度： %

試験系：細菌（ネズミチフス菌〈TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102〉）

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) の上記5菌株を用い、ラットの肝臓から調製した代謝活性化系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Amesらの方法で変異原性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。試験は独立した2試験で行い、最初にプレートインコーポレーション法で試験を実施し、5000 μ g/プレートを最高用量とし、1581、500、158、50および16 μ g/プレートまでの6濃度を設定した。この結果、最高濃度の5000 μ g/プレートまで細胞毒性や増殖阻害はみられず、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰コロニー数の増加を認めなかった。このため、2回目の試験(プレインキュベーション法)も同じ濃度で実施した。

陽性対照物質にはアジ化ナトリウム (NaN₃)、ニトロフラントイン (NF)、4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン (4-NPDA)、マイトマイシンC (MMC)、クメンヒドロペルオキシド (Cumene)、2-アミノアントラセン (2-AA) を用いた。

MMCは脱イオン水に溶解し、その他の陽性対照物質はDMSOに溶解した。

それぞれの試験は各濃度ともに3反復で実施した。

用量設定の根拠：本試験の用量設定のための予備試験は行わなかった。

試験結果：結果を表1および表2に示した。

いずれの試験においても、代謝活性化系の有無にかかわらず、復帰コロニー数の増加は認めなかった。

一方、陽性対照物質に対しては各菌株ともに顕著にコロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、本検体は代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異誘発性を有さないものと判断される。

表1 復帰変異試験成績 (1回目試験: プレートインコーポレーション法)

(3反復の平均値)

| 薬 剤 | 濃 度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$) | S9 mix の有無 | 復帰変異コロニー数/プレート | | | | | |
|----------------|--------------------------------------|---------------|----------------|--------|-------|----------|--------|-----|
| | | | 塩基対置換型 | | | フレームシフト型 | | |
| | | | TA100 | TA1535 | TA102 | TA98 | TA1537 | |
| 溶媒対照 (DMSO) | 0 | - | 124 | 8 | 257 | 14 | 5 | |
| 検体 | 16 | | 135 | 7 | 274 | 13 | 5 | |
| | 50 | | 138 | 8 | 278 | 15 | 5 | |
| | 158 | | 123 | 8 | 292 | 13 | 5 | |
| | 500 | | 143 | 8 | 268 | 12 | 6 | |
| | 1581 | | 134 | 8 | 236 | 13 | 6 | |
| | 5000 | | 141 | 8 | 240 | 16 | 5 | |
| 溶媒対照 (DMSO) | 0 | + | 177 | 14 | 357 | 29 | 7 | |
| 検体 | 16 | | 196 | 11 | 372 | 29 | 7 | |
| | 50 | | 197 | 11 | 356 | 28 | 9 | |
| | 158 | | 177 | 12 | 350 | 26 | 6 | |
| | 500 | | 173 | 12 | 320 | 24 | 9 | |
| | 1581 | | 177 | 10 | 313 | 29 | 9 | |
| | 5000 | | 186 | 13 | 291 | 23 | 9 | |
| 陽性対照 | NaN ₃ | 10 | | 1207 | | | | |
| | | 20 | | 1470 | | | | |
| | NF | 0.2 | 350 | | | | | |
| | | 0.4 | 576 | | | | | |
| | 4-NPDA | 10 | | | | | 32 | |
| | | 20 | | | | | 37 | |
| | | 0.5 | | | | 54 | | |
| | | 1 | | | | 83 | | |
| | MMC | 0.2 | | | 943 | | | |
| | | 0.4 | | | 1467 | | | |
| | 2-AA | 3 | + | 3260 | 91 | 819 | 2087 | 213 |
| | | 6 | | 1891 | 84 | 1363 | 1847 | 72 |

NaN₃ : アジ化ナトリウム
 NF : ニトロフタントイン
 4-NPDA : 4-ニトロ-1, 2-フェニレンジアミン
 MMC : マイトマイシンC

2-AA : 2-アミノアントラセン

空欄は該当なし

表2 復帰変異試験成績 (2回目試験: プレインキュベーション法)

(3反復の平均値)

| 薬 剤 | 濃 度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$) | S9 mix の有無 | 復帰変異コロニー数/プレート | | | | |
|----------------|--------------------------------------|---------------|----------------|--------|-------|----------|--------|
| | | | 塩基対置換型 | | | フレームシフト型 | |
| | | | TA100 | TA1535 | TA102 | TA98 | TA1537 |
| 溶媒対照 (DMSO) | 0 | - | 153 | 9 | 197 | 19 | 6 |
| 検体 | 16 | | 134 | 8 | 198 | 23 | 5 |
| | 50 | | 143 | 9 | 204 | 19 | 6 |
| | 158 | | 165 | 9 | 189 | 20 | 6 |
| | 500 | | 147 | 8 | 184 | 20 | 6 |
| | 1581 | | 156 | 8 | 180 | 18 | 6 |
| | 5000 | | 156 | 8 | 155 | 21 | 5 |
| 溶媒対照 (DMSO) | 0 | + | 175 | 10 | 299 | 25 | 8 |
| 検体 | 16 | | 185 | 11 | 332 | 22 | 7 |
| | 50 | | 180 | 10 | 332 | 26 | 8 |
| | 158 | | 201 | 10 | 300 | 26 | 9 |
| | 500 | | 160 | 10 | 291 | 26 | 10 |
| | 1581 | | 187 | 13 | 301 | 24 | 9 |
| | 5000 | | 190 | 8 | 300 | 18 | 7 |
| 陽性対照 | NaN ₃ | 10 | | 1067 | | | |
| | | 20 | | 1376 | | | |
| | NF | 0.2 | 541 | | | | |
| | | 0.4 | 923 | | | | |
| | 4-NPDA | 10 | | | | | 33 |
| | | 20 | | | | | 53 |
| | | 0.5 | | | | 65 | |
| | Cumene | 1 | | | | 126 | |
| | | 50 | | | 457 | | |
| | 2-AA | 75 | | | 517 | | |
| | | 3 | + | 3296 | 115 | 672 | 1567 |
| 6 | 3529 | 56 | | 1407 | 2507 | 98 | |

NaN₃ : アジ化ナトリウム

NF : ニトロファンチン

4-NPDA : 4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン

Cumene : クメンヒドロペルオキシド

2-AA : 2-アミノアントラセン

空欄は該当なし

チャイニーズハムスターV79細胞を用いたHPRT 前進突然変異試験

(毒性資料 No. 原体-23)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2010年

検体純度：

試験方法： 4×10^6 個の V79 細胞を培養液中に接種して 16~24 時間培養した。細胞接着後、DMSO に溶解した検体を 25、50、100、200、400、600 および 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の最終濃度で添加した培養液に移し、代謝非活性化(-S9)および代謝活性化(+S9)条件でそれぞれ 5 時間暴露した。暴露終了後、単層の細胞を PBS で洗浄し、トリプシン処理した。トリプシン処理した細胞を、培地 5mL を入れたシャーレ 3 枚に各 200 個を接種し、6 日間培養後コロニー数を計数して、暴露直後の細胞毒性を判定した(処理後の細胞生存率)。また、培地 20mL を入れたフラスコにトリプシン処理した細胞 1.5×10^6 個を接種し、細胞増殖と誘発変異株の発現のために 6 日間培養した(3 日間培養後に別のフラスコに再接種して継代した)。その後、フラスコで培養した細胞を変異株選抜のため、6-チオグアニン(6-TG)を 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有し、ヒポキサンチン無含有の培地 20mL を入れた 8 つのシャーレに各 3×10^5 個接種し、6~8 日間培養してコロニーを固定・ギムザ染色して、コロニー数を計数した(6-TG 耐性コロニー数)。また、3 つのシャーレ(培地 5mL)にフラスコで培養した細胞 200 個をそれぞれ接種し、6~8 日間培養後コロニー数を計数した(コロニー形成率測定用)。同様の条件で無処理対照および溶媒対照を設けた。培養は 2 連とし、試験を 2 回実施した。なお、陽性対照物質は非代謝活性化条件ではメタンスルホン酸エチル(EMS)を、代謝活性化条件ではジメチルベンズアントラセン(DMBA)を用いた。

用量設定根拠；

結果：各時点の細胞数やコロニー数から以下のパラメータを求めた。

$$\cdot \text{暴露直後の細胞生存率} = \frac{\text{平均コロニー数 (処理培養)} \times 100}{\text{平均コロニー数 (陰性対照培養)}}$$

$$\cdot \text{細胞増殖率} = \frac{\text{処理培養の絶対増殖} \times 100}{\text{陰性対照の絶対増殖}}$$

$$\cdot \text{コロニー形成率} = \frac{\text{シャーレ1個あたりの平均コロニー数} \times 100}{200}$$

$$\cdot \text{変異体の出現頻度 (細胞 } 10^6 \text{ 個当り)} \\ = \frac{\text{変異コロニーの総数} \times 100}{\text{評価したシャーレの数} \times 3 \times 10^5 \times \text{コロニー形成率}}$$

代謝活性化、非代謝活性化条件にかかわらず、80～90%の細胞毒性は誘発されず、検体は生物学的に意味のある変異体出現頻度の上昇を誘発しなかった。また、総合的な統計解析 (Dunnett 検定) においても統計学的に有意な増加は認められなかった

陽性対照の EMS および DMBA は、対応する陰性対照と比較して変異体出現頻度が生物学的に意味のある上昇を示したことから明らかなように、顕著な変異原性を示した。このように陽性対照がこの試験系に適した感受性を有し、使用した S9 mix の活性が適切であったことが実証された。

以上の結果より、本試験条件下において検体は代謝活性化の有無にかかわらず変異原性を示さなかった。

表 試験結果 (1回目)

| 薬剤 | 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | S9 mix | 暴露直後の 細胞生存率 ^a | 細胞増殖率 ^a | コロニー 形成率 (%) | 変異 コロニー数 | 変異体の 出現頻度 ($\times 10^{-6}$) |
|----------------|-----------------------------------|-----------|-----------------------------|--------------------|-----------------|-------------|--------------------------------------|
| 無処理 | 0 | - | 103.2 | 118.2 | 71.7 | 2 | 1.2 |
| | | | 155.1 | 151.3 | 60.0 | 3 | 2.1 |
| 溶媒対照 (DMSO) | 0 | | 100.0 | 100.0 | 60.7 | 3 | 2.1 |
| | | | 100.0 | 100.0 | 52.0 | 1 | 0.8 |
| 陽性対照 (EMS) | 900 | | 16.4 | 19.3 | 46.3 | 694 | *624.1 |
| | | | 15.0 | 30.3 | 38.7 | 533 | *574.4 |
| 検体 | 25 | | 96.5 | 97.0 | 51.5 | 4 | 3.2 |
| | | | 121.5 | 146.8 | 62.5 | 0 | 0.0 |
| | 50 | | 122.7 | 75.3 | 69.7 | 8 | 4.8 |
| | | | 106.9 | 137.9 | 60.2 | 6 | 4.2 |
| | 100 | | 84.3 | 87.8 | 59.8 | 1 | 0.7 |
| | | | 129.9 | 147.4 | 60.0 | 2 | 1.4 |
| | 200 | | 96.8 | 110.5 | 57.2 | 3 | 2.2 |
| | | | 123.7 | 130.4 | 58.0 | 1 | 0.7 |
| 400 | 113.0 | 84.9 | 58.3 | 2 | 1.4 | | |
| | 132.1 | 129.2 | 64.2 | 1 | 0.6 | | |
| 600 P | 97.2 | 122.3 | 52.8 | 3 | 2.4 | | |
| | 127.7 | 125.0 | 68.0 | 1 | 0.6 | | |
| 800 P | 86.1 | 107.2 | 55.3 | 2 | 1.5 | | |
| | 145.6 | 158.7 | 61.5 | 0 | 0.0 | | |
| 無処理 | 0 | + | 84.6 | 128.9 | 91.2 | 7 | 3.2 |
| | | | 98.1 | 75.1 | 84.8 | 10 | 4.9 |
| 溶媒対照 (DMSO) | 0 | | 100.0 | 100.0 | 96.3 | 16 | 6.9 |
| | | | 100.0 | 100.0 | 90.0 | 6 | 2.8 |
| 陽性対照 (DMBA) | 20 | | 65.5 | 61.7 | 83.5 | 284 | *141.7 |
| | | | 57.8 | 25.1 | 83.7 | 304 | *151.4 |
| 検体 | 25 | | 108.6 | 120.6 | 77.3 | 14 | 7.5 |
| | | | 103.7 | 82.1 | 88.2 | 10 | 4.7 |
| | 50 | | 98.2 | 129.3 | 81.2 | 26 | 13.3 |
| | | | 97.3 | 92.5 | 88.0 | 18 | 8.5 |
| | 100 | | 99.1 | 117.0 | 81.8 | 15 | 7.6 |
| | | | 96.8 | 81.7 | 91.3 | 16 | 7.3 |
| | 200 | | 100.9 | 94.5 | 87.5 | 10 | 4.8 |
| | | | 92.3 | 108.5 | 76.3 | 5 | 2.7 |
| 400 | 108.8 | 115.9 | 93.7 | 13 | 5.8 | | |
| | 99.0 | 63.8 | 93.3 | 26 | 11.6 | | |
| 600 P | 95.5 | 106.5 | 86.2 | 18 | 8.7 | | |
| | 91.8 | 85.6 | 85.0 | 10 | 4.9 | | |
| 800 P | 101.6 | 80.0 | 90.3 | 23 | 10.6 | | |
| | 92.3 | 77.1 | 96.7 | 9 | 3.9 | | |

a : 対照群に対する割合(%) P : 沈殿 *: P<0.05 (Dunnett 検定)
 EMS: メタンスルホン酸エチル, DMBA: ジメチルベンズアントラセン
 各群上段; 培養1, 下段; 培養2

表 試験結果 (2回目)

| 薬剤 | 濃度 (µg/mL) | S9 mix | 処理後の細胞生存率 ^a | 発現期間中の細胞増殖率 ^a | コロニー形成率 (%) | 変異コロニー数 | 変異体の出現頻度 (×10 ⁻⁶) |
|-------------|------------|--------|------------------------|--------------------------|-------------|---------|-------------------------------|
| 無処理 | 0 | - | 107.7 | 64.1 | 66.8 | 7 | 4.4 |
| | | | 90.7 | 107.2 | 75.5 | 7 | 3.9 |
| 溶媒対照 (DMSO) | 0 | | 100.0 | 100.0 | 92.7 | 1 | 0.4 |
| | | | 100.0 | 100.0 | 94.0 | 14 | 6.2 |
| 陽性対照 (EMS) | 900 | | 27.3 | 51.6 | 56.7 | 1649 | *1212.5 |
| | | | 20.2 | 27.5 | 68.0 | 1453 | *890.3 |
| 検体 | 25 | | 119.4 | 151.4 | 89.5 | 7 | 3.3 |
| | | | 78.1 | 102.6 | 93.0 | 4 | 1.8 |
| | 50 | | 96.2 | 130.7 | 90.2 | 4 | 1.8 |
| | | | 78.5 | 108.3 | 82.7 | 7 | 3.5 |
| | 100 | | 95.7 | 155.7 | 96.7 | 5 | 2.2 |
| | | | 81.4 | 123.0 | 88.8 | 4 | 1.9 |
| | 200 | | 100.7 | 37.8 | 65.2 | 6 | 3.8 |
| | | | 87.6 | 83.7 | 93.7 | 7 | 3.1 |
| 400 | 106.5 | 86.5 | 88.7 | 1 | 0.5 | | |
| | 66.0 | 108.9 | 92.5 | 1 | 0.5 | | |
| 600 P | 86.0 | 100.6 | 101.7 | 6 | 2.5 | | |
| | 87.8 | 117.1 | 97.5 | 3 | 1.3 | | |
| 800 P | 89.0 | 97.7 | 95.5 | 8 | 3.5 | | |
| | 81.4 | 114.9 | 85.2 | 10 | 4.9 | | |
| 無処理 | 0 | + | 110.3 | 108.9 | 87.8 | 7 | 3.3 |
| | | | 77.2 | 97.9 | 90.0 | 3 | 1.4 |
| 溶媒対照 (DMSO) | 0 | | 100.0 | 100.0 | 88.5 | 13 | 6.1 |
| | | | 100.0 | 100.0 | 92.8 | 7 | 3.1 |
| 陽性対照 (DMBA) | 20 | | 40.6 | 16.5 | 89.0 | 271 | *126.9 |
| | | | 36.7 | 14.6 | 83.3 | 201 | *100.5 |
| 検体 | 25 | | 84.4 | 83.8 | 87.0 | 12 | 5.7 |
| | | | 85.6 | 100.4 | 79.2 | 10 | 5.3 |
| | 50 | | 97.9 | 118.9 | 85.2 | 7 | 3.4 |
| | | | 81.2 | 106.0 | 81.0 | 4 | 2.1 |
| | 100 | | 102.5 | 166.1 | 78.2 | 12 | 6.4 |
| | | | 88.8 | 79.3 | 94.0 | 26 | 11.5 |
| | 200 | | 98.1 | 111.7 | 83.2 | 20 | 10.0 |
| | | | 82.6 | 92.7 | 84.7 | 11 | 5.4 |
| 400 | 80.8 | 116.5 | 84.7 | 9 | 4.4 | | |
| | 79.7 | 87.0 | 77.8 | 9 | 4.8 | | |
| 600 P | 103.1 | 123.2 | 81.7 | 20 | 10.2 | | |
| | 86.9 | 100.8 | 76.7 | 16 | 8.7 | | |
| 800 P | 100.0 | 106.5 | 86.5 | 9 | 4.3 | | |
| | 88.4 | 89.2 | 78.2 | 25 | 13.3 | | |

a : 対照群に対する割合(%) P : 沈殿 *: P<0.05 (Dunnett 検定)
 EMS : メタンサルホン酸エチル, DMBA : ジメチルベンズアントラセン
 各群上段; 培養1, 下段; 培養2

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。

チャイニーズハムスターV79細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(毒性資料 No. 原体-24)

試験機関：Bayer Schering Pharma AG (ドイツ)

[GLP 対応]

報告書作成年：2010年

検体純度：

投与方法：継代培養したチャイニーズハムスターV79細胞を用い、代謝活性化の存在下 (+S9 mix) および非存在下 (-S9mix) で染色体異常誘発性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して用いた。

1濃度あたり100個の分裂中期像について観察し、試験は2回行った。

用量設定根拠：

実施濃度

| 試験群 | S9 mix | 培地中の濃度 ($\mu\text{g/mL}$) | 処理時間 (時間) | 回収時間 (時間) |
|-------------|--------|--------------------------------|--------------|--------------|
| 溶媒対照 (DMSO) | -/+ | 0 | 4 | 18 |
| 検体 | -/+ | 125 | 4 | 18* |
| 検体 | -/+ | 250 | 4 | 18* |
| 検体 | -/+ | 500 | 4 | 18 |
| 検体 | -/+ | 600 | 4 | 18*(-S9mix) |
| 検体 | -/+ | 700 | 4 | 18*(+S9mix) |
| 陽性対照 | | | | |
| マイトマイシンC | - | 0.1 | 4 | 18 |
| シクロホスファミド | + | 2.0 | 4 | 18 |
| 溶媒対照 (DMSO) | -/+ | 0 | 4 | 30 |
| 検体 | -/+ | 500 | 4 | 30 |
| 検体 | -/+ | 600 | 4 | 30*(-S9mix) |
| 検体 | -/+ | 700 | 4 | 30*(+S9mix) |
| 溶媒対照 (DMSO) | - | 0 | 18 | 18 |
| 検体 | - | 50 | 18 | 18* |
| 検体 | - | 100 | 18 | 18* |
| 検体 | - | 200 | 18 | 18 |
| 検体 | - | 300 | 18 | 18* |
| 検体 | - | 400 | 18 | 18 |
| 陽性対照 | | | | |
| マイトマイシンC | - | 0.03 | 18 | 18 |

*: 染色体異常を評価した。

加えて、細胞生存率、有糸分裂指数を調べるのみの目的で、以下の濃度においても実施した。

| 試験群 | S9 mix | 培地中の濃度 ($\mu\text{g/mL}$) | 処理時間 (時間) | 回収時間 (時間) |
|-------------|--------|--------------------------------|--------------|--------------|
| 溶媒対照 (DMSO) | -/+ | 0 | 4 | ~8 |
| 検体 | -/+ | 500 | 4 | 8 |
| 検体 | -/+ | 600 | 4 | 8 |
| 検体 | -/+ | 700 | 4 | 8 |
| 溶媒対照 (DMSO) | - | 0 | 18 | 8 |
| 検体 | - | 200 | 18 | 8 |
| 検体 | - | 300 | 18 | 8 |
| 検体 | - | 400 | 18 | 8 |

試験結果：

1) 細胞生存率

S9-Mix 非存在下

溶媒対照と比較したとき、500 μ g/mL 以上（4 時間処理）および 400 μ g/mL（18 時間処理）において、処理培養の生存指数に明らかな低下が認められた。マイトマイシン C で処理した培養は、4 時間処理後にのみ生存率の低下を示した。

S9-Mix 存在下

溶媒対照と比較したとき、600 μ g/mL 以上において、処理培養の細胞生存率に明らかな低下が認められた。陽性対照のシクロホスファミドも生存率を低下させた。

2) 有糸分裂指数

S9-Mix 非存在下

溶媒対照と比較したとき、500 μ g/mL 以上（4 時間処理）および 200 μ g/mL 以上（18 時間処理）において、処理培養の有糸分裂指数が明らかな低下を示した。マイトマイシン C で処理した培養は、有糸分裂指数の低下を示さなかった。

S9-Mix 存在下

溶媒対照と比較したとき、500 μ g/mL 以上の濃度において、処理培養の有糸分裂指数が明らかな低下を示した。陽性対照のシクロホスファミドも有糸分裂指数を低下させた。

3) 染色体異常

結果を次頁の表に示した。

S9-Mix 非存在下

処理時間 4 時間および総培養時間 18 または 30 時間の経過後、異常を有する中期細胞数の生物学的に意味があり統計学的に有意な増加は検出されなかった。処理時間および総培養時間が 18 時間の場合も同じであった。

一方、陽性対照のマイトマイシン C による処理は、異常を有する中期細胞数の明確かつ統計学的に有意な増加を引き起こし、試験系の感受性が適切であることを立証した。

S9-Mix 存在下

処理時間 4 時間および総培養時間 18 または 30 時間の経過後、異常を有する中期細胞数に生物学的に意味のある増加は検出されなかった。なお、700 μ g/mL で観察された異常出現頻度の統計学的に有意な増加（処理時間 4 時間、総培養時間 18 時間）は、背景データ範囲内（表脚注参照）であったため、生物学的意味はないものと判断した。

一方、陽性対照のシクロホスファミドは明白な染色体異常を誘発し、試験系の感受性ならびに使用した S9 mix の活性が確認された。

以上の結果に基づき、検体は本試験条件においてチャイニーズハムスターV79細胞に対して染色体異常誘発性は陰性と判断された。

表. 結果

| 薬物 | 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | S9 mix | 処理 時間 | 回収 時間 | 観察 細胞 数 | 異常の分類 | | | | | | | | | | | | | 構造異常 細胞(%) | | 倍数 性細胞 数 |
|----------|-----------------------------------|-----------|----------|----------|---------------|-------|----|----|---|---|------|----|----|-----|-----|----|----|------|--------------------|----|----------------|
| | | | | | | ギャップ | | | | | 染色体型 | | | その他 | | | | | ギャップ | | |
| | | | | | | g | ig | b | f | d | ib | if | id | ex | maE | ma | cd | 含む | 除外 | | |
| 溶媒 対照 | 0 | | | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2.5 | 2.5 | 18 | |
| 検体 | 125 | - | 4 | 18 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.0 | 2.0 | 15 | |
| | 250 | | | | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 1 | 0 | 0 | 0 | 5.0 | 4.5 | 13 | |
| | 600 | | | | | 2 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 4 | 5 | 0 | 0 | 0 | 4.5 | 4.5 | 17 | |
| MMC | 0.1 | | | | | 0 | 5 | 38 | 5 | 1 | 32 | 6 | 5 | 83 | 5 | 0 | 0 | 58.0 | **58.0 | 13 | |
| 溶媒 対照 | 0 | | | | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1.5 | 1.5 | 15 | |
| 検体 | 125 | + | 4 | 18 | 200 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2.0 | 2.0 | 17 | |
| | 250 | | | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3.5 | 3.5 | 19 | |
| | 700 | | | | | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 4 | 6 | 0 | 0 | 0 | 5.5 | ^{a)} *5.5 | 14 | |
| CP | 2 | | | | | 3 | 0 | 28 | 3 | 0 | 46 | 4 | 7 | 69 | 2 | 0 | 0 | 50.0 | **49.5 | 12 | |
| 溶媒 対照 | 0 | - | 4 | 30 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0 | 0.0 | 14 | |
| 検体 | 600 | | | | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.0 | 2.0 | 14 | |
| 溶媒 対照 | 0 | + | 4 | 30 | 200 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.0 | 2.0 | 17 | |
| 検体 | 700 | | | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.5 | 1.5 | 17 | |
| 溶媒 対照 | 0 | | | | | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.0 | 3.0 | 13 | |
| 検体 | 50 | - | 18 | 18 | 200 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.5 | 1.5 | 18 | |
| | 100 | | | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1.5 | 1.5 | 10 | |
| | 300 | | | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.5 | 1.5 | 20 | |
| MMC | 0.03 | | | | | 1 | 5 | 12 | 4 | 0 | 21 | 2 | 3 | 18 | 0 | 0 | 0 | 26.5 | **25.5 | 14 | |

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (Fisher exact test)

600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で検体の沈殿が認められた。

^{a)}背景対照範囲内の変化 (0.0~8.5%, 1999-2009年 162試験, DMSO 4時間処理/18時間回収)

MMC: マイトマイシンC

CP: シクロホスファミド

g: 染色体型ギャップ,

ig: 染色体型ギャップ,

b: 染色体型切断

f: 染色体型断片,

d: 染色体型欠失,

ib: 染色体型切断

if: 染色体型断片,

id: 染色体型欠失,

ex: 交換

maE: 交換を含む重複異常,

ma: 重複異常,

cd: 染色体破損

マウスを用いた小核試験

(毒性資料No. 原体-25)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：2010年

検体純度：

供試動物：NMRI (Cr1:NMRI BR) 系マウス、6～12週齢、1群雌雄各5匹、
体重 雄:38～46g、雌:28～37g

試験方法：検体を0.5%クレモホア EL 水溶液に懸濁させ、1N 水酸化ナトリウム水溶液で pH を 6～8 とした。500、1000 及び 2000mg/kg の各用量を 24 時間間隔で 2 回腹腔内投与した。溶媒対照群には 0.5%クレモホア EL 水溶液を同様に投与した。陽性対照群にはシクロホスファミドを生理食塩水に溶解し、20mg/kg の用量で単回腹腔投与した。検体投与群および溶媒対照群の投与容量は 20mL/kg、陽性対照群は 10mL/kg とした。

最後の投与の 24 時間後に動物を屠殺し、各動物から大腿骨を採取し、Schmid の方法で塗沫標本を作製し、May-Grünwald・ギムザ染色した。顕微鏡で標本観察し、各動物につき 2000 個の多染性赤血球を検査し、小核を有する赤血球数を計測した。また、多染性赤血球に対する正染性赤血球および小核を有する正染性赤血球の割合も記録した。

なお、雄では最低用量 500mg/kg で用量に関連のない、小核を有する多染性赤血球のわずかな増加がみられたため、独立させた再評価を行うために並行して作製していた標本を観察して評価した。

用量設定根拠：

結 果：結果の概要を次頁の表に示した。

雌雄全ての検体投与群で無関心、粗毛(雌のみ)、体重減少、痙れん、呼吸困難などが屠殺時まで認められ、検体が全身的に暴露されていることが示された。また、死亡は認めなかった。

溶媒対照群でも軽度の痙れんが観察された。陽性対照群ではいかなる症状も認められなかった。両対照群ともに死亡は認められなかった。

溶媒対照群に比べ、雌雄共に 1000mg/kg および 2000mg/kg 群で多染性赤血球あたりの正染性赤血球数の増加がみられたが、陽性対照群では変化はみられなかった。

雄の最低用量 500mg/kg において小核を有する多染性赤血球数がわずかに増加し、統計学的に有意 ($p < 0.05$) となった。しかし、より高用量投与群である 1000 および 2000mg/kg 群での小核を有する多染性赤血球数の発生は対照群と同等であり、用量との関連性を認めなかった。これを確認するために、雄について平行して作成された別の標本を観察して、独立した再評価を行った。再評価の結果、小核を有する多染性赤血球の発生頻度は背景対照範囲内 (1.4~5.8 (雄/1999-2008 年, 91 試験)) にあり、生物学的に意味のある、または統計学的に有意な増加は再現されなかった。これらのことから、最初の評価でみられた雄 500mg/kg 投与群でのわずかな小核を有する多染性赤血球の増加は偶発性のものと考えられた。

雌の検体投与群では小核を有する多染性赤血球に対照群との間に統計学的有意差は認められず、生物学的にも意義のある変動は認めなかった。

一方、陽性対照群では小核を有する多染性赤血球の顕著で有意な増加が認められた。

以上の結果、検体は in vivo における本試験条件下で骨髓多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断された。

表. 試験結果 (平均値)

| 採取時間 | 薬 剤 | 投与量 (mg/kg) | 性 | 観察動物数 | ^{a)} NCE /PCE2000 | ^{b)} MNCE /NCE2000 | ^{c)} MNPCE /PCE2000 |
|------------|---------------|-------------|----------|-------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 最終投与後 24時間 | 溶媒対照 (Cre EL) | 0×2回 | 雄 | 5 | 1848 | 3.5 | 3.2 |
| | 検体 | 500×2回 | | 5 | 2281 | 6.5 | *7.8 |
| | | 1000×2回 | | 5 | *4148 | 5.4 | 5.8 |
| | | 2000×2回 | | 5 | *3009 | 5.2 | 4.0 |
| | 陽性対照 (CP) | 20×1回 | | 5 | 1710 | 3.6 | **23.6 |
| | 溶媒対照 (Cre EL) | 0×2回 | 雌 | 5 | 3019 | 1.6 | 2.6 |
| | 検体 | 500×2回 | | 5 | 3831 | 1.9 | 3.6 |
| | | 1000×2回 | | 5 | *4904 | 1.1 | 3.0 |
| | | 2000×2回 | | 5 | *7549 | 1.5 | 4.4 |
| | 陽性対照 (CP) | 20×1回 | | 5 | 3291 | 2.1 | **17.8 |
| | 溶媒対照 (Cre EL) | 0×2回 | 雄 再評価 | 5 | 2005 | 3.0 | 5.0 |
| | 検体 | 500×2回 | | 5 | 2411 | 6.0 | 5.6 |
| | | 1000×2回 | | 5 | *4180 | 5.5 | 4.8 |
| | | 2000×2回 | | 5 | *4020 | 5.0 | 3.4 |
| 陽性対照 (CP) | 20×1回 | 5 | | 2191 | 5.5 | **28.2 | |

*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$ (Wilcoxon ranking tests)

#; 生物学的意義のある増加

^{a)} NCE/PCE2000 : 多染性赤血球2000個あたりの正染性赤血球数

^{b)} MNCE/NCE2000 : 正染性赤血球2000個あたりの小核を有する正染性赤血球数

^{c)} MNPCE/PCE2000 : 多染性赤血球2000個あたりの小核を有する多染性赤血球数

Cre EL: 0.5%クレモホアEL

CP: シクロホスファミド

ラット肝細胞を用いた *in vivo* 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験

(毒性資料 No. 原体-26)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2013 年

検体純度：

供試動物：Wistar 系ラット、7~11 週齢、一群雌雄各 4 匹

平均体重 雄；271.5g、雌；186.4g

試験方法：検体投与群、溶媒対照投与群ならびに陽性対照投与群について各投与 4 時間後処理群および 16 時間後処理群を設けた。

検体を 30%ジメチルスルホキシド(DMSO)・70%ポリエチレングリコール 400(PEG400) (溶媒)に溶解し、用量 1000 および 2000mg/kg で雌雄のラットに単回経口投与した。対照群には溶媒のみを同様に投与した。

陽性対照群は N,N'-dimethylhydrazinedihydrochloride(DMH) 80mg/kg (4 時間後処理群) と 2-acetylaminofluorene (2-AAF)100mg/kg (16 時間後処理群) を単回経口投与した。DMH は生理食塩水で調製し、2-AAF は DMSO:PEG400(1:9)で調製した。投与容量はいずれの群も 10mL/kg とし、投与溶液の調製は投与日に行った。

4 時間後処理群では投与 1、2 および 4 時間後、16 時間後処理群では投与 1 および 16 時間後に一般状態を観察した。

投与 4 時間後または 16 時間後にラットを麻酔下で、門脈を介して肝臓にコラゲナーゼを含むハンクス緩衝液を灌流させた。粗細胞懸濁液をステンレスメッシュでろ過して細胞を単離した。単離肝細胞はハンクス液で 2 回洗浄した。細胞生存率および細胞数を確認した。洗浄した肝細胞を遠心分離して Williams E(WME)培地中に分散させた後、円形カバースリップを入れた 6 穴プレートに各 2.5mL(2.0×10^5 細胞/mL) 入れ、37°Cで空气中 5% CO₂を含む加湿条件で培養した。培養終了後に培地を除き、リン酸緩衝液で洗浄して非接着の細胞を除去した。トリチウムチミジン (³HTdR；5 μ Ci/mL(18.5×10^4 Bq/mL)，比活性 70 - 90Ci/mmol (25.9×10^{11} - 33.3×10^{11} Bq/mmol) を含み、1%FCS を含有する 2mL の培地 (WME/1%FCS) を加え、4 時間標識した後に 0.25mM の非標識チミジンを含む WME/1%FCS で洗浄した。同じ培地で一晚培養を行った。培地を 1%クエン酸低張液に交換し、オートラジオグラフィーでの粒子の検出を良くするために核を膨化させた。メタノール:酢酸 (3:1) でカバースリップ上の細胞を固定し、エタノールで洗浄後、風乾させた。カバースリップをスライドガラスに載せ、写真乳剤で被覆し、4°Cで 12~14 日遮光ボックス内に置いた。その後、室温で現像・定着させ、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。コード化したスライドの細胞中銀粒子数をカウント (動物あたり 2 枚のスライドについて各 50 個の細胞について実施) して核および細胞質の粒子数、正味粒子数 (核内粒子数-細胞質粒子数)、修復期細胞 (正味粒子数 5 以上) の割合を求めた。

用量設定根拠；

結 果：検体投与後、4 時間後処理群では雄でのみ 1000 および 2000mg/kg 群で活動性低下や下痢が全例みられ、2000mg/kg 群の 1 例では流涎もみられた。また、16 時間後処理群では雄でのみ 1000 および 2000mg/kg 群の数例に流涎がみられ、1000mg/kg 群 1 例では活動性低下、粗毛あるいは腹臥姿勢、よろめき歩行がみられた。雌ではいずれの投与群にも一般状態の変化は認めなかった。

次表にみられるようにいずれの検体投与群にも正味核粒子数の増加は認められなかった。また、修復期細胞の割合も増加を認めなかった。

一方、陽性対照群では正味核粒子数と修復期細胞の明らかな増加がみられた。

以上の結果より、本検体はラットへの最大投与量 2000mg/kg 投与で肝細胞における DNA 修復合成につながる DNA 損傷を示さなかった。

表. *in vivo* 不定期 DNA 合成試験成績 (平均値)

| 処理群 (時間) | 性別 | 薬剤 | 用量 (mg/kg) | 平均粒子数 | | | 修復期細胞 | |
|---------------------|---------------------|-------|---------------|-------|--------|--------|-------|-------|
| | | | | 核内 | 細胞質 | 正味数 | 粒子数 | (%) |
| 4 | 雄 | 溶媒対照* | 0 | 27.64 | 39.76 | -12.12 | 9.45 | 6.5 |
| | | 検体 | 1000 | 21.02 | 27.16 | -6.14 | 10.62 | 13.75 |
| | | | 2000 | 17.91 | 26.21 | -8.30 | 7.76 | 7.25 |
| | DMH ^{a)} | 80 | 77.10 | 38.71 | 38.39 | 40.43 | 95.50 | |
| | 雌 | 溶媒対照* | 0 | 13.70 | 23.49 | -9.79 | 7.67 | 1.33 |
| | | 検体 | 1000 | 13.43 | 24.68 | -11.25 | 4.73 | 2.00 |
| 2000 | | | 14.11 | 27.06 | -12.95 | 9.87 | 2.33 | |
| DMH ^{a)} | 80 | 58.35 | 22.39 | 35.96 | 37.04 | 97.00 | | |
| 16 | 雄 | 溶媒対照* | 0 | 23.82 | 39.12 | -15.30 | 7.29 | 3.75 |
| | | 検体 | 1000 | 28.74 | 41.49 | -12.76 | 9.86 | 5.33 |
| | | | 2000 | 27.54 | 42.40 | -14.86 | 7.90 | 3.25 |
| | 2-AAF ^{b)} | 100 | 50.16 | 26.23 | 23.92 | 25.05 | 95.33 | |
| | 雌 | 溶媒対照* | 0 | 13.24 | 23.11 | -9.87 | 7.04 | 5.67 |
| | | 検体 | 1000 | 18.42 | 29.54 | -11.12 | 10.56 | 4.50 |
| 2000 | | | 24.92 | 38.73 | -13.81 | 9.68 | 5.25 | |
| 2-AAF ^{b)} | 100 | 37.86 | 25.92 | 11.94 | 18.48 | 68.50 | | |

* 30%DMSO-70%PEG400

^{a)} 陽性対照 DMH: N,N'-dimethylhydrazinedihydrochloride

^{b)} 陽性対照 2-AAF: 2-acetylaminofluorene

注) 以下の群は 3 例の平均とした。

4 時間処理群 雌 溶媒対照群 1 例は処理不良のため除く

4 時間処理群 雌 検体投与群 1 例は肝細胞の生存率の低下のため除く (<60%)

16 時間処理群 雄 1000mg/kg 群 1 例は肝細胞の生存率の低下のため除く (<60%)

16 時間処理群 雄 2-AAF 1 例は灌流が不備のため除く

16 時間処理群 雌 溶媒対照群 1 例は灌流が不備のため除く

(14) 生体機能に及ぼす影響

薬理試験

(毒性資料No.原体-27)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2012 年

検体の急性毒性が弱いため、本試験における検査項目は状態観察および呼吸・血圧に対する影響のみとした。

検体の純度：

用量設定根拠：雌雄ラットおよび雌雄マウスを用いた急性経口毒性試験(毒性資料 No. 原体-1、2)では、2000mg/kg の投与においてラットおよびマウスともに死亡および症状は認められなかった。そのため、本試験での最高用量をガイドライン規定の上限である 2000mg/kg とし、以下公比約 3 で低下させた 600 および 200mg/kg を設定した。

また、これら急性経口毒性試験において雌雄とも毒性症状が見られず感受性に差が認められなかったことから、本試験ではラットおよびマウスともに雄性動物を選択した。

一般症状および行動に及ぼす影響

供試動物：Crlj:CD1(ICR)系マウス 1 群雄 5 匹

試験開始時：週齢；5～6 週齢、体重；23.2～27.1g

試験方法：検体を 0.5%メチルセルロース 400 水溶液に懸濁し、0(対照群)、200、600 および 2000mg/kg の用量で約 18 時間絶食させたマウスに強制経口投与した。投与容量は 20mL/kg とした。

検体投与前、検体投与後 0.5、1、2、3、6 および 24 時間に Irwin の多次元観察法に従い一般症状および行動を観察した。

結果：いずれの観察時間においても投与に関連した所見は認められなかった。尚、200mg/kg 群で投与 6 時間後の身づくろい回数が対照群に比し有意な高値を示したが、600mg/kg 以上の群で同様の変化が認められなかったことから、偶発的な変化であると考えられた。

表 認められた症状(有意差の認められた症状)

| 症状 | 観察時間 | 用量 (mg/kg) | | | |
|---------|------|------------|-----|-----|------|
| | | 0 | 200 | 600 | 2000 |
| 検査動物数 | 6 時間 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 身づくろい回数 | | 0 | ↑4 | 1 | 0 |

数値は回数/2分/群

↑ : p<0.05 (Dunnett' s test)

呼吸・循環器系に対する作用

[無麻酔ラットの血圧および心拍数の測定]

供試動物 : Cr1:CD(SD)系ラット 1群雄5匹

試験開始時 : 週齢 ; 6~7 週齢、体重 ; 163.0~203.9g

試験方法 : 検体を 0.5%メチルセルロース 400 水溶液に懸濁し、0(対照群)、200、600 および 2000mg/kg の用量で約 18 時間絶食させたラットに強制経口投与した。ラットは投与前に加温器(設定温度 38℃)で約 15 分温めた。投与容量は 20mL/kg とした。検体投与前、検体投与後 1、2、3 および 6 時間に血圧および心拍数を測定した。

結果 : 平均血圧が 600mg/kg 群で投与 1 時間後に対照群と比べ有意な高値を示したが、他の測定時間並びに 2000mg/kg 群では有意な変化が認められなかったことから、偶発的な変化と考えられた。

収縮期血圧、拡張期血圧および心拍数については、有意な変動は認められなかった。

表 平均血圧 (mmHg)

| 観察時間 | 用量 (mg/kg) | | | |
|-------|------------|------|-------|------|
| | 0 | 200 | 600 | 2000 |
| 投与前 | 85.5 | 87.9 | 87.1 | 86.9 |
| 1 時間後 | 82.9 | 94.1 | ↑97.3 | 92.7 |
| 2 時間後 | 86.9 | 86.5 | 97.7 | 87.6 |
| 3 時間後 | 84.6 | 93.2 | 96.4 | 85.4 |
| 6 時間後 | 92.2 | 97.9 | 99.9 | 94.4 |

↑ : p<0.05 (Dunnett' s test)

[ラットの呼吸に及ぼす影響]

供試動物：CrI:CD(SD)系ラット 1群雄5匹

試験開始時：週齢；6～7週齢、体重：172.8～211.4g

試験方法：検体を0.5%メチルセルロース400水溶液に懸濁し、0(対照群)、200、600および2000mg/kgの用量で約18時間絶食させたラットに強制経口投与した。投与容量は20mL/kgとした。

ラットを無給餌無給水の条件で呼吸測定装置に入れ、検体投与前、検体投与後0.5、1、2、3および6時間に呼吸数および1回換気量を測定した。

結果：呼吸数および1回換気量に、対照群と投与群間で有意な変化は認められなかった。

以上の結果から、本検体はマウスの一般症状および行動、並びにラットの呼吸および循環器系に対して、最高用量の2000mg/kgまで影響を示さなかったため、無作用量は2000mg/kgと考えられた。

総表 生体機能への影響に関する試験の総括表

| 項目 | | 供試動物 | 1群 当り 動物数 | 投与 方法 | 投与量 (mg/kg) | 無作用量 (mg/kg) | 作用量 (mg/kg) | 結果の概要 |
|-------------|------------|------|-----------------|----------|----------------------|-----------------|----------------|-------|
| 一般症状および行動 | | マウス | ♂5 | 経口 | 0, 200, 600, 2000 | 2000 | — | 影響なし |
| 呼吸・ 循環器系 | 呼吸 | ラット | ♂5 | 経口 | 0, 200, 600, 2000 | 2000 | — | 影響なし |
| | 血圧・ 心拍数 | | | | | 2000 | — | 影響なし |

(15) その他

ラットを用いた飼料混入投与による 28 日間反復経口投与毒性試験

-ラットを用いた 90 日間反復経口投与毒性試験(毒性資料No.原体-10)の用量設定試験

(毒性資料No.原体-28)

試験機関:

[GLP 非対応]

報告書作成年: 2009 年

本試験の目的:

検体の純度:

試験動物: Wistar Rj:WI (IOPS HAN)ラット、1 群雌雄各 5 匹
投与開始時 7 週齢、体重 雄 250~269g、雌 169~190g

投与期間: 28 日間 (2008 年 8 月 6 日~2008 年 9 月 4 日)

投与方法: 検体を 0、500、7000 および 12000ppm の濃度で飼料中に混合し、28 日間投与した。検体を混入した飼料は試験期間中 2 回調製した。

観察・検査項目および結果:

一般状態および死亡率;

全動物について、生死を毎日 2 回 (週末と休日は 1 回) 確認し、一般状態を少なくとも 1 日 1 回観察した。詳細な身体検査を少なくとも週 1 回実施した。

認められた一般症状を表 1 に示す。

7000ppm 以上の雌雄群で尿の着色(濃い黄色)および肛門性器部、腹部又は尾部の汚れが投与 9 日から 29 日の間に認められた。500ppm 以下の雌雄群では検体投与に関連した臨床症状は何ら認められなかった。

試験期間中に死亡は認められなかった。

表 1 一般症状

| 性別 | 雄 | | | | 雌 | | | |
|-------------------|---|-----|------|-------|---|-----|------|-------|
| | 0 | 500 | 7000 | 12000 | 0 | 500 | 7000 | 12000 |
| 投与量 (ppm) | 0 | 500 | 7000 | 12000 | 0 | 500 | 7000 | 12000 |
| 所見/検査動物数 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 尿の着色(濃い黄色) | 0 | 0 | 5** | 5** | 0 | 0 | 5** | 5** |
| 汚れ(肛門性器部、腹部または尾部) | 0 | 1 | 5** | 5** | 0 | 0 | 3 | 4* |

*: p<0.05、**: p<0.01 (Fisher 検定、申請者による)

体重；

全動物の体重を、投与開始日およびその後週1回測定した。更に、剖検前にも体重を測定した。

体重の推移を図1および図2に示す。

12000ppm群において、雌雄ともに投与期間中の体重増加量が対照群に比し低下傾向を示した(平均累積体重増加量；雄-9%、雌-15%、統計学的有意差なし)。7000ppm以下の群では投与による体重への影響は認められなかった。

図1 雄の体重推移

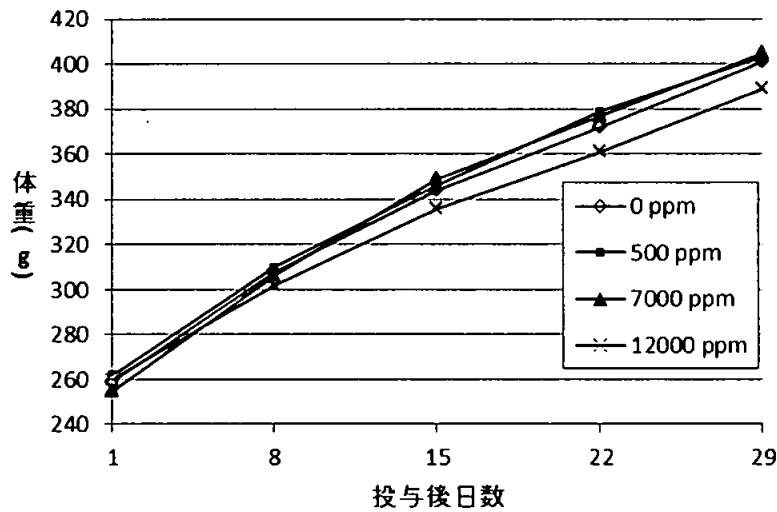
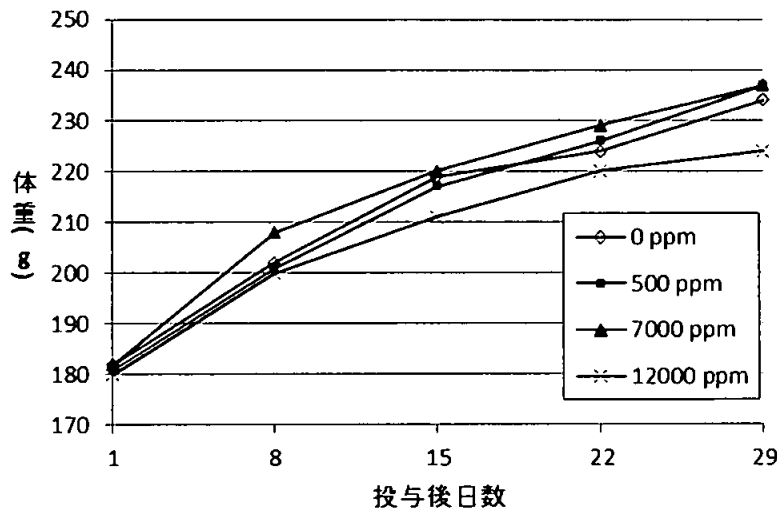


図2 雌の体重推移



摂餌量；

全動物の摂餌量を週1回測定した。

投与による摂餌量への影響は雌雄共にいずれの投与群においても認められなかった。

検体摂取量；

各群の検体摂取量を表 2 に示した。

表 2 検体摂取量

| 投与量 (ppm) | | 500 | 7000 | 12000 |
|-----------------------|---|------|------|-------|
| 検体摂取量 (mg/kg 体重/日) | 雄 | 35.7 | 500 | 852 |
| | 雌 | 38.3 | 551 | 945 |

臨床検査；

全動物について、投与 30 又は 31 日後に麻酔下で後眼窩静脈叢から採血し、以下の検査に供した。動物は採血前一晩絶食させた。

血液学的検査

以下の項目について測定した。

赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、網状赤血球数、白血球数、白血球分画、血小板数、プロトロンビン時間

いずれの検査項目にも統計学的な有意差は雌雄共にいずれの投与群においても認められず、従って投与の影響は認められなかった。

血液生化学的検査

以下の項目について測定した。

総ビリルビン、グルコース、尿素、クレアチニン、総蛋白、アルブミン、総コレステロール、トリグリセリド、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、アルカリホスファターゼ

対照群と比較して統計学的に有意差が認められた項目を表 3 に示す。

表 3 血液生化学的検査 (有意差の認められた項目)

| 項目/投与量 (ppm) | 雄 | | | 雌 | | |
|--------------|-----|------|-------|-----|------|-------|
| | 500 | 7000 | 12000 | 500 | 7000 | 12000 |
| 総コレステロール | | ↑133 | ▲150 | | ↑137 | (125) |
| 総ビリルビン | | (57) | (29) | | (50) | ↓25 |
| ASAT | | | | | ↓68 | ↓69 |

↑ : $p < 0.05$ 、▲↓ : $p < 0.01$ (Dunnett, 但し総ビリルビンは Dunn's rank sum)
 表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの
 () は統計学的に有意ではないが参考値として示した。

総コレステロールが 7000ppm 以上の雌雄群で増加し、12000ppm 群の雌を除いて統計学的有意差を伴った。また総ビリルビンが 12000ppm 群の雌で有意に減少した。7000ppm 以上の雄群および 7000ppm の雌群でも総ビリルビンに減少傾向が認められたが、対照

群との間に統計学的な有意な差はみられなかった。一方、7000ppm以上の雌群でASATの有意な減少が認められたが、用量との関連がなく、偶発的なものと考えられた。

申請者注) 総ビリルビンおよびASATは上昇したときに毒性学的に意味のある所見と考えられることから、今回認められたこれらの減少は毒性学的意義が低いものと考えられた。

剖検；

投与30又は31日後に、全生存動物を屠殺し、剖検した。動物は屠殺前一晩絶食させた。

認められた肉眼的病理所見を表4に示す。

表4 肉眼的病理所見

| 性別 | | 雄 | | | | 雌 | | | |
|----------|----|---|-----|------|-------|---|-----|------|-------|
| 投与量(ppm) | | 0 | 500 | 7000 | 12000 | 0 | 500 | 7000 | 12000 |
| 検査動物数 | | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 肝臓 | 腫大 | 0 | 0 | 3 | 5** | 0 | 0 | 0 | 2 |

** : p<0.01 (Fisher 検定、申請者による)

7000ppm以上の雄群および12000ppm群の雌で肝臓の腫大が認められ、投与によるものと考えられた。

その他検体投与に起因すると考えられる所見は雌雄ともにいずれの群においても認められなかった。

臓器重量；

全生存動物について、以下の臓器重量を測定し、対体重比および対脳重量比を算出した。

副腎、脳、腎臓、肝臓、卵巣、下垂体、脾臓、甲状腺(上皮小体を含む)、精巣、子宮(子宮頸部を含む)

対照群と比較して統計学的に有意差が認められた項目を表5に示す。

表5 臓器重量(有意差の認められた項目)

| 性別 | | 雄 | | | 雌 | | |
|----------|-------|-----|------|-------|-----|------|-------|
| 投与量(ppm) | | 500 | 7000 | 12000 | 500 | 7000 | 12000 |
| 腎臓 | 対体重比 | | | ▲114 | | | |
| 肝臓 | 実重量 | | ▲120 | ▲127 | | ↑120 | ↑119 |
| | 対体重比 | | ▲120 | ▲134 | | ▲119 | ▲123 |
| | 対脳重量比 | | ↑118 | ▲129 | | ↑121 | ▲122 |

↑ : p<0.05、▲ : p<0.01 (Dunnett 検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの

7000ppm 以上の雌雄群で、肝臓重量(実重量、対体重比、対脳重比)が有意に増加し投与の影響と考えられた。

また、12000ppm 群雄で腎臓の対体重比が有意に増加したが、実重量の増加を伴っておらず、また病理組織学的検査で何ら異常所見は認められなかったことから毒性学的意義は低いと考えられた。

病理組織学的検査；

以下の臓器・組織について、精巣、精巣上体は Davidson 液で、その他は 10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、ヘマトキシリン・エオシン(H&E)で染色し検査した。*を付した臓器・組織については全群の全動物について、その他については対照群および 12000ppm 群の全動物について検査した。なお、上皮小体については病理組織学的検査を実施しなかった。

副腎、精巣上体、腎臓*、肝臓*、卵巣、膀胱、下垂体、脾臓、甲状腺(上皮小体を含む)*、精巣、子宮(子宮頸部を含む)、膈、肉眼的異常部位*

主要な病理組織学的所見を表 6 に示す。

表 6 主要な病理組織学的所見

| 性別 | | 雄 | | | | 雌 | | | |
|----------|------------|---|-----|------|-------|---|-----|------|-------|
| | | 0 | 500 | 7000 | 12000 | 0 | 500 | 7000 | 12000 |
| 投与量(ppm) | | 0 | 500 | 7000 | 12000 | 0 | 500 | 7000 | 12000 |
| 検査動物数 | | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 肝臓 | 小葉中心性肝細胞肥大 | 0 | 0 | 5** | 5** | 0 | 0 | 4* | 5** |
| | 濾胞上皮細胞肥大 | 0 | 0 | 0 | 4* | 0 | 0 | 3 | 4* |

*: p<0.05, **: p<0.01 (Fisher 検定、申請者による)

7000ppm 以上の雌雄群で肝臓に小葉中心性肝細胞肥大(軽微から軽度)が認められた。また、7000ppm 以上の雌群および 12000ppm 群の雄の甲状腺で、濾胞上皮細胞の肥大(軽微から軽度)が認められ、これらの所見は投与に関連したものと考えられた。

その他に認められた所見は用量に関連した頻度の増加もなく偶発的なものと考えられた。

肝酵素測定；

最終屠殺時に全動物の肝臓の一部をホモジナイズしてマイクロゾーム画分を調製し、以下の測定に供した。

総チトクローム P450 量

分光光度法により、マイクロゾーム画分中の総 P450 量を測定した。

P450 アイソザイム活性

エトキシレゾルフィン、ペントキシレゾルフィン、ベンゾキシレゾルフィンおよびラ

ウリン酸を基質として、それぞれ EROD、PROD、BROD および LAH 活性を測定した。LAH は各群毎に 5 匹の試料を合わせて測定した。

EROD : ethoxyresorufin-O-deethylase
 PROD : pentoxyresorufin-O-depentylase
 BROD : benzoxyresorufin-O-debenzylase
 LAH : lauric acid hydroxylase

UDPGT 活性

4-ニトロフェノールを基質として、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ (UDPGT) 活性を測定した。

肝酵素測定結果を表 7 に示す。

表 7 肝酵素測定 (統計学的に有意な差)

| 性別 | 雄 | | | 雌 | | |
|-------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 投与量 (ppm) | 500 | 7000 | 12000 | 500 | 7000 |
| P-450 | (98) | (119) | (115) | (96) | (123) | (119) |
| EROD | | | ↑138 | | | |
| PROD | | ↑1130 | ↑1658 | ↑374 | ↑1539 | ↑869 |
| BROD | ↑169 | ↑1872 | ↑2858 | ↑610 | ↑2456 | ↑1991 |
| LAH | (124) | (104) | (78) | (93) | (56) | (86) |
| UDPGT | | ↑200 | ↑215 | | ↑176 | ↑185 |

↑ : p<0.05, ↑ : p<0.01 (Dunnett 検定 ; 申請者により実施)

LAH; サンプル数が 1 のため統計処理は実施せず () に参考値として記載

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

総 P450 量は 7000ppm 以上でわずかな増加がみられたが、統計学的に有意な上昇はいずれの用量でも認められなかった。

PROD および BROD は 7000ppm 以上の雌雄群で個体差はあるものの統計学的に有意な増加が認められ、500ppm 群でも雄の PROD を除き有意な差がみられた。雌において PROD および BROD に用量に関連した増加が認められなかったが、これは個体間の変動が大きかったためと考えられた。また、500ppm 群の雌における PROD および同濃度の雌雄における BROD の統計学的に有意な増加は、個体間変動が大きかったことおよび病理組織学的変化が認められなかったことから毒性影響とは考えなかった。

UDPGT は 7000ppm 以上の雌雄群で顕著に増加した。

EROD は雄の 12000ppm 群で統計学的に有意な増加がみられたが軽度であり、個体変動も考えられることから検体投与の影響とは判断できなかった。LAH は投与の影響を受けなかった。

検体は PROD、BROD および UDPGT 活性を大きく上昇させたことから、フェノバルビタールに類似した肝薬物代謝酵素誘導パターンを示すと考えられた。

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。

以上、本試験における検体の影響として、7000ppm 以上の雌雄群で、尿の着色(濃い黄色)、肛門性器部、腹部又は尾部の汚れ、総コレステロールの増加、肝臓の腫大(雌は 12000ppm 群のみ)、肝臓重量の増加、小葉中心性肝細胞肥大、甲状腺濾胞上皮細胞肥大(雄は 12000ppm 群のみ)、P-450、PROD、BROD および UDPGT 活性の上昇が見られ、更に 12000ppm 雌雄群で体重増加量の抑制傾向が認められた。

従って、本試験における無毒性量は、雌雄ともに 500ppm(雄: 35.7mg/kg/日、雌: 38.3mg/kg/日)であると判断された。