

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

② ラットを用いた 1 世代の繁殖性試験

(資料 T-15)

試験機関: Huntingdon Research Centre(英国)

報告書作成年: 1978 年

検体の純度:

試験動物: CFY 系ラット、1 群雌雄各 20 匹、投与開始時 6 週齢

投与期間: P 世代 ; 投与開始から F₁ 児離乳までの 17 週間
(1977 年 4 月~8 月)

投与方法: 検体の 1000ppm 及び 100000ppm を含有した飼料を自由に摂食させた。飼料は週 1 回調製した。対照群には基礎飼料のみを投与した。

試験方法及び試験項目: 概要を下表にまとめた。

一般状態及び死亡率; 全動物の全検査期間に一般状態及び生死を毎日観察した。

交配及び妊娠の確認; 雌雄 1 対 1 で同居させ、翌日陰栓及び精子により交尾を確認し、これを妊娠 0 日とした。妊娠の確認は触診及び出産をもって行った。

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

$$\text{妊娠率} = \frac{\text{妊娠した雌動物数}}{\text{交配した雌動物数}} \times 100$$

妊娠期間; 妊娠 0 日から分娩までの期間

交尾前期間; 同居させてから交尾確認までの期間

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

血液学的検査;投与後6週時に各群雌雄5匹ずつ、17週時に各群雌雄10匹ずつを対象として、眼窩洞から採血し、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数、MCHC、MCV、網状赤血球数、白血球数、白血球百分比、ハイツ小体数、血小板数、プロトロンビン時間を測定した。

血液生化学検査;上記の血液学的検査における同一の検査時期、動物を対象として、尿素、糖、総蛋白、蛋白分画(アルブミン、 α_1 、 α_2 、 β 、 γ グロブリン)、A/G比、アルカリフォスファターゼ、GPT、Na、K、メトヘモグロビン量、スルホヘモグロビン量を測定した。

尿検査;投与後6週時に各群雌雄5匹ずつ、17週時に各群雌雄10匹ずつについて、pH、比重、蛋白、還元物質、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン、ヘモグロビン量、沈渣を検査した。

眼検査;投与前、投与後6週時、17週時に全動物を検眼鏡により検査した。

骨髓検査;投与後18週時の屠殺時に親動物各群雌雄5匹ずつにつき骨髓を採取し、骨髓細胞総数、骨髓細胞分類数を計数した。

血漿ヘモグロビン量の検査;試験終了時に親動物各群雌雄約10匹ずつを対象として、心臓穿刺により採取し、血漿ヘモグロビン量を測定した。

肉眼的病理検査;試験終了時の全生存動物及び死亡児を対象として検査を行った。

臓器重量;投与後18週時の全親動物及び同腹児の雌雄各1匹を対象として、解剖ののち脳、腎臓、下垂体、副腎、甲状腺、脾臓、心臓、肝臓、精巣、卵巣、子宮の重量を測定した。また、対体重比も算出した。

病理組織学的検査;途中死亡例及び100000ppm投与群の全動物と対照群雌雄10匹ずつ、ならびに100000ppm投与群及び対照群の同腹児の雌雄各1匹を対象として、心臓、肺、リンパ節(頸部及び腸間膜)、胸腺、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、膀胱、甲状腺、胃、副腎、十二指腸、回腸、盲腸、眼、脳、下垂体、骨髓(胸骨)、精巣、卵巣、子宮、大腿骨、膝関節及び肉眼的病変部について、病理標本を作製し、検鏡した。

1000ppm投与群の全親動物及び対照群の残余の雌雄各10匹については、肝臓、脾臓のみについて検査した。また、1000ppm投与群の同腹児の雌雄各1匹の肝臓について

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

検査した。なお、染色法は、ヘマトキシリンエオジン染色の他、腎臓、肝臓については Oil Red O 染色とPAS染色も実施して検鏡した。

結 果:

世代	期間(日数)	作業手順	試験項目
P	生育(60)	雌雄1対1で交配 交尾は陰垢標本で確認	一般状態、生死を毎日観察 体重、摂餌量を2週1回測定 6週目に各群雌雄5匹ずつにつき、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、全動物の眼検査
	交配(20)		交配状況の観察、雌は交配確認まで1日おきに体重測定 妊娠0、7、14、20日目に体重測定
	妊娠(21) 出産		出産状況の観察 新生児数、死産児数、外表異常、性別及び児体重測定
F ₁	哺育(21)		母動物の出産後0、7、14、21日目体重測定 出生後0、4、12、21日目生存児数、児体重測定
	離乳		母動物について各群雌雄10匹ずつにつき、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、全動物の眼検査 全動物及び同腹児の雌雄各1匹の臓器重量測定 全生存動物及び死亡児の肉眼的病理検査 親動物各群雌雄5匹の骨髄検査、途中死亡例、最高投与群の全親動物、対照群雌雄各10匹ずつ、ならびに最高投与群と対照群の同腹児の雌雄各1匹を病理組織学的検査

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

親動物:一般状態、死亡率、摂餌量、体重の増加、尿検査、眼検査、骨髄検査、肉眼的病理検査では検体投与の影響はみられなかった。交尾前期間、妊娠率、妊娠期間についても検体投与の影響はみられなかった。血液学的検査についてはヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数、MCHCについて雄 1000ppm 以上の投与群、雌 100000ppm 投与群で低下が認められた。血液生化学検査については雄 1000ppm 以上の投与群、雌 100000ppm 投与群で糖の低下及び GPT の上昇が認められた。雌雄とも 1000ppm 以上の投与群でメトヘモグロビン量、スルホヘモグロビン量の増加が認められた。臓器重量では雌 1000ppm 以上の投与群、雄 100000ppm 投与群で肝臓の重量増加が、雌雄とも 1000ppm 以上の投与群で脾臓の重量増加が認められた。病理組織学的検査では雌雄とも 1000ppm 以上の投与群で、肝臓の細胞肥大、クッパー細胞の色素沈着、脾臓の含鉄赤血球がみられた。

児動物:同腹児数、児の累積死亡率、同腹児重量、児体重などは検体投与の影響はみられなかった。外形異常、肉眼的病理検査も検体投与の影響はみられなかった。臓器重量では 100000ppm 投与群で肝臓及び脾臓の重量増加がみられ、病理組織学的検査では 100000ppm 投与群に軽度の小葉中心性肝細胞の肥大がみられた。

以上の結果から、ラットの一世代にわたってジフルベンズロン原体を飼料中に混入して投与した場合、1000ppm 投与群で赤血球系検査成績の低下、メトヘモグロビン量、スルホヘモグロビン量の増加、肝臓・脾臓の重量増加、病理組織学的検査の異常所見がみられたことより、親動物に対する最大無作用量は推定しえなかった。しかしながら繁殖能に対しては 100000ppm 投与群でも影響はみられなかった。

児動物に対しては 100000ppm 投与群で肝臓・脾臓の重量増加、軽度の小葉中心性肝細胞の肥大が認められたことより、申請者は児に対する最大無作用量は 1000ppm(雄 74mg/kg/日、雌 98mg/kg/日)と判断する。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

世 代		親:P 児:F ₁														
投 与 量 (ppm)		対照群 (0)				1000				100000						
		雄 20		雌 20		雄 20		雌 20		雄 20		雌 20				
親 動 物	動物数									糞尿淡色化						
	一般状態															
	死亡率 (%)	0		0		5		5		0		5				
	摂餌量 (g/匹/週)	203		172		200		165		199		160				
	体重増加量(g) (0~16週)	430		184		451		187		419		179				
	検体摂取量(mg/kg/日)	—		—		74		98		7349		9312				
	妊娠動物数	—		17		—		18		—		18				
	母動物の体重(g)	妊娠中	0日			297				294				291		
			7			324				323				322		
			14			362				358				357		
			20			432				435				436		
		哺育中	0日			341				344				333		
			7			344				352				362		
			14			345				353				360		
			20			328				337				346		
	検査時期(週)	6	17	6	17	6	17	6	17	6	17	6	17	6	17	
	検査動物数	5	10	5	10	5	10	5	9	5	10	5	10	5	10	
	血液学的検査	ヘマトクリット値					96 ↓				96 ↓		92 ◯		92 ◯	
		ヘモグロビン量					93 ◯				93 ◯		91 ◯		91 ◯ 93 ↓	
		赤血球数					88 ◯				96 ↓		83 ◯		92 ◯ 90 ◯	
MCHC						97 ◯		97 ↓		96 ↓		97 ◯		97 ↓ 97 ↓		
MCV						110 ◯						113 ◯				
白血球好中球数												189 ↑				
血小板数						115 ↑				121 ↑				115 ↑		
プロトロンビン時間										155 ↑		124 ◯				
尿素												110 ↑				
糖						91 ↓				80 ◯		86 ◯				
血液生化学検査	総蛋白											95 ◯				
	α ₁ -グロブリン					88 ◯		108 ↑				81 ◯		108 ◯		
	α ₂ -グロブリン					120 ↑				120 ↑						
	A/G比					116 ◯		87 ↓				115 ◯		94 ↓		
	アルカリフォスファターゼ											131 ↑		80 ↓ 50 ↓		
	GPT					134 ◯				739 ◯		457 ◯				
	Na							101 ↑		101 ◯				101 ↑		
	スルホヘモグロビン量					156 ◯		190 ◯ 165 ◯ 183 ◯		196 ◯		314 ◯		215 ◯ 257 ◯		
	外ヘモグロビン量					300 ◯		600 ◯ 500 ◯ 500 ◯		600 ◯		800 ◯		800 ◯ 600 ◯		
	尿検査	検体投与による影響はみられなかった														
眼検査	検体投与による影響はみられなかった															

Williams の検定 ↑ ↓ : 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アグロカネショウ株式会社にある。

世 代		親:P 児:F ₁							
投 与 量 (ppm)		対照群 (0)		1000		100000			
親	臓	検 査 動 物 数	雄 20	雌 20	雄 19	雌 19	雄 20	雌 19	
		肝 臓	重 量				117 [○]	110 ↑	132 [○]
	対体重比					117 [○]	111 [○]	134 [○]	
	脾 臓	重 量			134 [○]	125 [○]	154 [○]	157 [○]	
		対体重比				126 [○]		156 [○]	
	卵 巢	重 量						114 ↑	
		対体重比						112 ↑	
	肉 眼 的 病 理 検 査		検体投与による影響はみられなかった						
	骨 髄 検 査		検体投与による影響はみられなかった						
	動 物	臓	検 査 動 物 数	雄 20	雌 20	雄 19	雌 19	雄 20	雌 19
肝 臓			細胞肥大	0	0	0	3	15	17
		クッパー細胞色素沈着	0	0	2	3	6	13	
脾 臓		含鉄赤血球	軽 度	4	10	18	10	20	13
			中 等 度	0	1	1	6	0	6
妊 娠 率 (%)		85.0		94.7		94.7			
妊 娠 期 間 (日)		21.9		22.2		22.1			
交 尾 前 期 間 (日)		3.0		2.0		3.0			

Williams の検定 ↑ ↓ : 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アグロカネショウ株式会社にある。

世 代		親:P 児:F ₁						
投 与 量 (ppm)		対照群 (0)		1000		100000		
児 動 物	出 産 時 母 動 物 数	17		18		18		
	生 存 児 数	出 産 時	12.7		12.8		13.7	
		4 日 後	12.3		12.7		13.3	
		12 日 後	12.2		12.6		13.2	
		21 日 後	12.0		12.4		13.2	
	累 積 死 亡 率 (%)	出 産 時	1.5		2.1		0.7	
		4 日 後	4.3		2.9		3.0	
		12 日 後	5.3		3.7		3.7	
		21 日 後	6.8		5.2		3.7	
	同 腹 児 体 重 (g)	出 産 時	80.9		81.8		88.1	
		4 日 後	119.6		125.2		134.7	
		12 日 後	288.7		297.1		323.4	
		21 日 後	552.2		573.1		644.8 ↑	
	児 体 重 (g)	出 産 時	6.4		6.5		6.5	
		4 日 後	9.8		10.0		10.3	
		12 日 後	24.3		24.2		24.9	
		21 日 後	47.2		47.4		49.4	
	性 比 (雄/雌)	21 日 後	1.14		0.89		0.97	
臓 器 重 量	検 査 動 物 数		雄 17	雌 16	雄 18	雌 18	雄 18	雌 18
	体 重 (g)		101.7	92.4	108.9	94.4	124.0 ↑	109.8 ◦
	心 臓	重 量					117 ^c	117 ^c
		対 体 重 比					145 ^c	141 ^c
	肝 臓	重 量					124 ^c	122 ^c
		対 体 重 比					146 ^c	144 ^c
	脾 臓	重 量					123 ↑	122 ↑
		対 体 重 比						
	腎 臓	重 量					114 ↑	
	精 巢 / 子 宮	重 量					122 ↑	205 ^c
肉 眼 的 病 理 検 査		検 体 投 与 に よ る 影 響 は み ら れ な か っ た						
病 理 組 織 学 的 検 査	肝 細 胞 肥 大	0	0	0	0	12/18	9/18	

Williams の検定 ↑ ↓ : p < 0.05, ◦◦ : p < 0.01, ↑↓ : p < 0.001

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

③ ラットを用いた二世世代繁殖試験

(資料 T-16)

試験機関 : Huntingdon Research Centre (英国)
[GLP 対応]
報告書作成年 : 1995 年

検体の純度 :

供試動物 : [CrL:CD(SD)BR] VAF/Plus 系ラット雌雄、週齢 : 投与開始時点で約 6 週
体重 : 雄 175~214 g、雌 121~160 g、1 群雌雄各 32 匹 (F₀ 世代)

試験期間 : 1993 年 3 月 2 日 ~ 12 月 9 日 (F₀ 世代への投与開始 ~ F₁ 世代の最終屠殺)

投与期間

F₀ 世代 : 投与開始から F₁ 児離乳時までの約 14 週間 (交配前 10 週間)

F₁ 世代 : 離乳時から F₂ 児離乳時までの約 23 週間 (交配前 12 週間)

投与方法 : 検体を 0、500、5000 及び 50000 ppm を含有した飼料を自由に摂取させた。検体混入飼料は週に 1 回調製した。

用量設定根拠 :

交配・調製・選抜及び観察・検査項目 : 概要を次表にまとめた。

一般状態及び死亡率 : F₀ 及び F₁ 世代の全動物について、投与の影響を毎日検査した。一般症状は、投与の最初の 2 週間は毎日、その後は週に 1 回観察し記録した。

体重増加量 : 各世代の投与開始時 (F₀ 世代は 6 週齢、F₁ 世代は 4 週齢) に、全動物の体重を測定し、その後は週に 1 回測定した。交配期間中は、毎日全雌の体重を測定して分娩まで継続した。分娩した母動物については、分娩後日並びに 7、14 及び 21 日後に測定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

摂餌量: 交配前(F₀世代の-1~10週目及びF₁世代の5~16週目)は、毎週ケージごとに摂餌量を測定した。同居中は測定しなかったが、雄については交配を確認した後のF₀世代の13週目及びF₁世代の19週目に測定した。交尾を確認した雌については、妊娠0、7、14及び21日目に測定した。

食餌効率: 摂餌量および体重変化量から食餌効率を求めた。

検体摂取量: 群平均体重、摂餌量及び飼料中濃度から、1週間の群平均検体摂取量を計算した。

飲水量: 各世代について、交配前投与期間中の最初の2週間及び終わりの2週間中に毎日測定した。

発情周期: 交配1週間前から交配20日間まで、膣スミアを毎日検査して発情周期を確認した。

交配及び妊娠の確認: 最長20日間にわたって交配のために同群の雌雄を1:1で同居させ、膣栓またはスミア中の精子の存在により交尾を確認し、確認した日を妊娠0日とした。

交配能力に関する指標: 各雌動物について、交配、交尾、妊娠及び分娩の観察に基づいて、以下の項目を計算した。

$$\text{交尾率} = \frac{\text{交尾動物数}}{\text{交配動物数}} \times 100$$

$$\text{妊娠率} = \frac{\text{妊娠動物数}}{\text{交配動物数}} \times 100$$

妊娠期間

分娩した雌について、交尾確認日から児動物を最初に認めた日までの期間

血液学的検査: 生存している全ての動物の屠殺前に、エーテル麻酔下で眼窩洞から採血して以下の項目を測定した。

ヘマトクリット、ヘモグロビン、赤血球数、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、平均血球容積(MCV)、総白血球数、血小板数、トロンボテスト(Owrem法)、白血球分画、メトヘモグロビン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

児動物の観察:

出生～21 日目:

全ての同腹児について、分娩直後から哺育中に以下の 2 項目について検査した。

児動物数の測定、性別の判定、分娩時の体重測定、外表異常の観察、毎日の生死及び異常の観察、死亡児の剖検、生存児の出生後 4、8、12、16 及び 21 日目の体重測定

同腹児の選択:

分娩後 4 日目に、雌雄各 4 匹を無作為に選択して、同腹児を 8 匹に調整した。これらの選択された動物の体重は、分娩後 28 日目にも測定した。

各種指標の算出: 以下の指標を求めた。

$$\text{性比率(雄)} = \frac{\text{雄動物数}}{\text{児動物数}} \times 100$$

$$\text{着床後胚死亡率} = \left[\frac{(\text{着床痕数} - \text{分娩児数})}{\text{着床痕数}} \right] \times 100$$

$$\text{産児の死亡率} = \left[\frac{(\text{分娩児動物数} - \text{生存児動物数})}{\text{分娩児動物数}} \right] \times 100$$

$$\text{4 日目までの児動物の累積死亡率} = \left[\frac{(\text{分娩児動物数} - \text{生後 4 日目生存児動物数})}{\text{分娩児動物数}} \right] \times 100$$

$$\text{8 日目までまたはその後の児動物の累積死亡率} = \left[\frac{(\text{生後 4 日目児動物数} - \text{生後 } x \text{ 日目生存児動物数})}{\text{分娩児動物数}} \right] \times 100$$

ここで、x は同腹児の体重測定日

離乳前期間中には、全ての同腹児の児動物について、立ち直り反射、驚愕反射及び空中正向反射を示すようになるまでの発育段階に達する週齢を調査した。

次世代用の児動物の選択: 生後 21 日目に、雌雄それぞれ合計 28 匹を選択した。選択した F₁ 動物については、性成熟を評価するために雄の包皮分離日及び雌の膈開口日を、それぞれ生後 35 日及び 28 日からモニターした。過剰の児動物は屠殺して、外表異常及び内臓検査を行った。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

精子の検査：F₀ 及び F₁ の雄動物について、精子は両側輸精管から採取し、精子の数、運動性及び形態を検査した。左精巣は精子細胞数の計数のために用いた。

臓器重量及び病理組織学的検査：F₀ 及び F₁ 動物の以下の臓器重量を測定した。

精巣上体、肝臓、脳下垂体、脾臓、腎臓、卵巣、前立腺、精巣

病理組織学的検査は、生殖器官(対照群及び 50000 ppm 群の F₀ 及び F₁ 動物)、妊娠させ得なかった全ての雄及び非妊娠の雌の生殖器(低及び中用量群)並びに特定の臓器(肉眼的異常を示した全群の F₀ 及び F₁ 動物の肝臓及び脾臓)について実施した。妊娠しなかった雌の子宮も検査した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

試験方法の概要

世代	期間(週間)	交配・調整・選抜	観察・検査項目
F ₀	生育 (10週)		一般症状、生死観察: 毎日 体重、摂餌量測定: 週1回
	交配 (約3週)	雌雄 1:1 で交配 交尾は、膣栓またはスメア中の精子の存在で確認(妊娠0日)	交配状況の観察 体重測定: 毎日
	妊娠 (3週)		体重測定、摂餌量測定: 毎日及び毎週
	F ₁ 分娩		妊娠期間算出、出産状況の観察: 産児数、性別検査、生存児数、外表異常及び同腹生存児体重測定
	F ₁ 哺育	出産後 4 日に同腹児数を 8 匹 (雌雄各 4 匹)に調整、残りは淘汰	母動物の体重、摂餌量測定 F ₁ 動物の生死、症状観察: 毎日 F ₁ 動物の体重測定: 出生後 4、8、12、16、21 日 死亡児の剖検
F ₁ 離乳	生後 21 日目に、継代用の雌雄各 28 匹を可能な限り各腹から選抜	継代用 F ₁ 動物の選抜時に体重測定 反射試験 継代用を除いた F ₁ 動物の肉眼的病理検査、臓器重量測定 F ₀ 親動物の肉眼的病理検査、病理組織学的検査、精子検査 最高用量群の F ₀ 雄動物の繁殖能を確認	
F ₁	生育 (12週)		F ₁ 動物の性成熟検査
	交配 (約3週)	(F ₀ 世代に準ずる)	(F ₀ 世代に準ずる)
	妊娠 (3週)		最高用量群の F ₁ 雄動物の繁殖能力を確認
	F ₂ 分娩	(F ₀ 世代に準ずる)	(F ₀ 世代に準ずる)
	F ₂ 哺育 (3週)		
F ₂ 離乳			

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

結 果:

一般状態及び死亡率: 50000 ppm 群の F₀ 及び F₁ 世代の雌雄には、全試験期間にわたって淡黄色糞が認められたが、検体の色調が淡白色を呈していたことから、この淡黄色糞は検体の影響によるものと判断された。その他の検体投与に関連する一般症状は何れの群にも認められなかった。

投与に関連した死亡例は、何れの投与群にもみられなかった。

体重変化: 50000 ppm 群の F₀ 世代の雌雄の平均体重増加量が、投与 1 週目に対照群より顕著に減少した(雄のみに有意差あり)。その後、雄の全体的な体重増加量は、屠殺時点までに対照群と同等になった。雌では、交配開始時点まで対照群より顕著に減少したままであった。

500 及び 5000 ppm 群の雌雄の体重増加量は、対照群と同等であった。

妊娠中の雌の平均体重増加量及び哺育期間中の体重変化のパターンは、何れの投与群の両世代にわたって投与の影響を受けていなかった。

摂餌量: F₀ 及び F₁ 世代の 50000 ppm 群の雄では、交配前後に対照群より摂餌量が僅かに多かった。F₀ 世代の雄の投与 1 週目には明らかな影響はみられなかった。F₀ 世代の 50000 ppm 群の雌の摂餌量が、投与 1 週目に減少していた。両世代における妊娠及び哺育期間中の摂餌量は、投与の影響を受けていなかった。

食餌効率: 性別及び世代にかかわらず、各群間には一貫した差はみられなかった。

測定週	群および投与量 (ppm)							
	F0 雌				F1 雌			
	0	500	5000	50000	0	500	5000	50000
0~6 週	9.2	10.0	10.1	10.8	6.7	7.8	7.3	7.4
7~13 週	7.2	7.0	7.6	6.4	6.6	6.5	7.0	6.4
14~16 週	3.5	3.3	3.4	3.0	3.4	3.3	3.6	3.0
17~19 週	2.1	2.1	2.4	2.0	1.9	2.3	2.4	2.1

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

検体摂取量：

測定日	群および投与量 (ppm)					
	F0 雌			F1 雌		
	500	5000	50000	500	5000	50000
妊娠						
0～6 日	45.6	466	4716	44.7	450	4227
7～13 日	44.1	446	4445	43.6	454	4147
14～16 日	43.7	449	4329	43.2	440	4150
17～19 日	39.1	411	3827	41.2	408	3798
哺育						
1～6 日	66.1	642	6856	60.3	566	5134
7～13 日	102.5	864	9017	84.3	863	8389

飲水量：5000 及び 50000 ppm 群の雌雄において、交配前の最終 2 週間に飲水量の増大が認められた。

交配、妊娠及び分娩：全ての項目について、投与に関連した影響はみられなかった。また、交配に失敗した雌雄には、投与に関連すると考えられる繁殖能に影響するような肉眼的または病理組織学的変化はみられなかった。

産児に関する項目：

着床及び総同腹児の死亡：いずれの投与群及び世代においても、平均着床痕または着床後死亡胚数に明らかな影響はみられなかった。

同腹児の数、産児死亡率及び性比：全ての項目において、明らかな影響はみられなかった。

同腹児及び産児体重：50000ppm 投与群の F0 で分娩時及び分娩後 4 日目の間引き前で対照群に比し僅かに減少していた。その他の群では差は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

離乳前の発育：驚愕反射、立ち直り反射及び空中正向反射を示すようになった平均週齢時に対する投与の影響はみられず、F₁ の児動物にみられた対照群との僅かな差も、毒性学的に意義があるものでなかった。

投与群／ 投与量 (ppm)	同腹 児数	妊娠 日数	平均到達日齢			瞳孔反射 (分娩後 20 日) %
			立ち直り 反射	驚愕反射	空中正向 反射	
0	23	22.0	23.8	34.0	37.2	100
500	22	21.9	23.5	34.2	37.3	100
5000	24	22.0	23.7	34.1	37.2	100
50000	20	22.0	23.6	34.2	37.1	100

児動物の異常：4 日目及び離乳時点における F₁ 及び F₂ の児動物についての肉眼的病理検査結果に、投与の影響はみられなかった。

性成熟：膣開口日及び包皮分離日には投与に関連すると考えられる影響はみられなかった。

血液学的検査：両世代の雌雄への投与により、ヘマトクリット、ヘモグロビン及び赤血球数の減少に特徴付けされる貧血が全ての用量群にみられた。

50000 及び 5000 ppm 群の両世代の雌雄において、平均ヘマトクリットが高かった。50000 ppm 群の両世代の雌雄において、平均赤血球ヘモグロビン濃度が境界ではあるが、時々に対照群よりも有意に上昇した。F₀ 世代の雄では、5000 ppm 群に同様の影響がみられた。

これらの所見は、軽度の多染性赤血球がみられた投与群の動物数増加により確認された。F₀ 世代では、軽度の赤血球の大小不同の発現頻度に増大がみられ、これにハウエルジョリー小体の出現が伴っており、その出現は F₁ 世代の雌において顕著であった。これらの所見は、鏡検でみられた脾臓におけるヘモジデリン沈着の発現頻度の増加及び肝臓における褐色色素貪食クッパー細胞の存在と関連していた。

両世代の雌雄において、全ての投与群で用量に比例したヘモグロビン濃度の統計学的有意な上昇がみられた。

以上の他に、50000 ppm 群の F₀ 世代の雌及び両世代の雄において、総白血球数に統計学的に有意な増加がみられた。

肉眼的病理検査：両世代において、全投与群の親動物の脾臓に肉眼的変化として主に肥大及びうつ血が発現し、雄の 50000 または 5000 ppm 群では脾臓に小嚢胞が各 1 例観察された。対照群には、この発現はみられなかった。

親動物の剖検時にみられた他の肉眼的変化の発現頻度、種類及び分布には、両世代

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

共に投与の影響はみられなかった。

臓器重量： 臓器重量の測定結果を次表に示した。両世代の全ての投与群の両性において、対照群と比較した平均脾臓重量に、用量に関連して統計学的有意な増加がみられた。

両世代の 5000 及び 50000ppm 投与群の雌で、肝臓重量が対照群に比べて有意に高値を示した。これに対し、F₁ 雄の全投与群で対照群に比べて有意に低値を示した。これらのことから、雄の肝臓重量は用量との関連性はみられず、雄に対しては毒性学的意義がないものと考えられた。

他に、F₀ 及び F₁ 世代の屠殺時点における親動物の臓器重量に対する一貫したまたは用量に関連した影響はみられなかった。

雄性 F₁ の 50000ppm 投与群で、脳下垂体重量が対照群に比べて有意に高値を示していたが、F₁ 雌及び F₀ の雄には類似した変化はみられなかった。

精子の観察： 両世代から選抜した雄親動物の精子を観察した結果、精子の数、運動性及び形態に明らかな投与影響は認められなかった。

〔病理組織学的検査 — F₀ 世代〕

肝臓 — 5000 及び 50000 ppm 群において、次表に示すように用量に関連した頻度で小葉中心性肝細胞肥大の発現がみられた。

— 全ての投与群において、褐色色素貪食クッパー細胞発現の頻度及び程度は用量に関連してみられた。

脾臓 — 全ての投与群において、下表に示すようにヘモジデリンの沈着が用量に相関してみられた。

— 5000 及び 50000 ppm 群では、用量に関連した頻度で赤脾髄のうっ血が発現した。

これらの病理組織学的変化は、投与群にみられた脾臓重量の増加と相関しているとみられ、さらに脾臓におけるヘモジデリン沈着の発現頻度の増加及び肝臓における褐色色素貪食クッパー細胞の増加は、これらの群の赤血球パラメーターに相関したものと考えられた。その他の所見は、用量依存性がなく、対照群にもみられたので、毒性学的重要性はないものと考えられる。

交配能力が弱い雌雄ラットにおいて雄の両側精巣における間質の増生、細精管の萎縮、精子の欠如及び雌で黄体の欠如または減少が観察された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

〔病理組織学的検査 — F₁世代〕

肝臓 — 5000 及び 50000 ppm 群の雌雄に、次表に示すように用量に相関して小葉中心性肝細胞肥大の発現がみられ、両群の雌における対体重比の増加と統計学的に有意に相関していた。

— 50000 ppm 群の雄では、小葉中心性肝細胞の空胞化の発現頻度が増加していた。

— 全ての投与群において、用量相関した褐色色素貪食クッパー細胞の増加がみられた。

脾臓 — 5000 及び 50000 ppm 群の雄では、次表に示すようにヘモジデリン沈着が増加していた。

— 5000 及び 50000 ppm 群の雌雄では、用量に関連した頻度で赤脾髄のうっ血が発現した。

これらの病理組織学的変化は、投与群にみられた脾臓重量の増加と相関しているとみられ、さらに脾臓におけるヘモジデリン沈着の発現頻度の増加及び肝臓における褐色色素貪食クッパー細胞の増加は、これらの群の赤血球パラメーターに相関したものと考えられた。

以上の結果より 2 世代に亘って本剤を試料中に混入して投与した場合、500ppm 以上の投与群において脾臓重量の増加、および病理組織学的所見として脾臓のヘモジリデン沈着、肝臓における褐色色素貪食クッパー細胞が観察され、また赤血球の減少及びメトヘモグロビンの上昇がみられ、血液に対する影響も確認された。繁殖能に対しては何ら影響はみられなかった。

したがって、無毒性量は親動物及び児動物に対して 500ppm (F₀: 雄 29.5 mg/kg/日、雌 42.0 mg/kg/日、F₁: 雄 31.0 mg/kg/日、雌 44.9 mg/kg/日) 以下と判断される。

繁殖については、最高投与量の 50000ppm でも影響がみられなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

親動物の概要:

世 代		親:F0								
投 与 量 (ppm)		対照群(0)		500		5000		50000		
動 物 数		雄 32	雌 32	雄 32	雌 32	雄 32	雌 32	雄 32	雌 32	
親 動 物	一般状態	投与に関連した変化なし				淡色糞				
	死亡数	0	0	0	0	0	0	1	0	
	体 重 増 加量(g)	0~1週	59	27	59	26	57	29	54**	25
		4~16週	-	-	-	-	-	-	-	-
		分娩後21日	-	40.7	-	42.3	-	42.9	-	50.7*
	累 積 摂餌量 (g/動物)	1週	170	126	172	123	169	126	168	118**
		2~10週	1685	1200	1743	1173	1736	1209	1801**	1179
		5~16週	-	-	-	-	-	-	-	-
		13~20週	1485	-	1527	-	1538	-	1586**	-
		20~26週	-	-	-	-	-	-	-	-
	飲水量 (ppm)	1~2週	464.9	363.3	463.2	377.1	465.2*	390.5*	481.5**	385.6*
		9~10週	536.3	418.8	583.4	441.1	588.1*	474.8*	611.5**	451.0*
	交配日数	-	3.0	-	2.5	-	3.0	-	3.0	
	妊娠動物数	-	29	-	29	-	30	-	31	
	分娩後の同腹児総死亡 動物数	-	0	-	0	-	2	-	0	
	離乳完了母動物数	-	29	-	29	-	28	-	31	
	妊娠期間	-	22.2	-	22.0	-	22.2	-	21.8	
	血 液 学 的 検 査	ヘマトクリット値	53	52	49**	45**	47**	44**	46**	43**
		ヘモグロビン量	14.4	14.6	13.5**	12.6**	13.2**	12.4**	13.1**	12.4**
赤血球数		7.5	7.1	6.9**	6.2**	6.5**	5.8**	6.3**	5.7**	
MCHC		27.3	28.4	27.5	27.8	27.9*	28.4	28.3*	29.0*	
MCV		71	73	71	73	73**	75**	74**	76**	
多染性赤血球		3	0	11	9	24	17	29	16	
赤血球の大小不同		22	1	28	8	26	11	31	13	
ハウエル-ジョリー小体	0	0	1	0	0	0	4	1		
臓 器 重 量	検 査 動 物 数	雄 32	雌 32	雄 32	雌 32	雄 32	雌 32	雄 32	雌 32	
	脾臓 対体重比	0.77	0.50	0.95**	0.66**	1.17**	0.80**	1.40**	0.88**	
	肝臓 対体重比	24.66	13.09	23.82	12.81	24.36	14.03**	25.58	14.05**	
	脳下垂体 対体重比	17.1	-	16.8	-	16.3	-	17.2	-	

*: 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アグロカネショウ株式会社にある。

世 代			親(F0)								
投 与 量 (ppm)			対照群(0)		500		5000		50000		
親 動 物	病理組織学的検査										
	検 査 動 物 数		雄 32	雌 32	雄 32	雌 32	雄 32	雌 32	雄 32	雌 32	
	肝 臓	小葉中心 性肝細胞 肥大	軽度	0	0	0	0	3	6*	14**	12**
			中度	0	0	0	0	0	0	1	5*
			合計	0	0	0	0	3	6*	15**	17**
		褐色色素 貪食クッパ 一細胞	軽度	0	0	9**	14**	17**	22**	24**	23**
			中度	0	0	0	2	3	6*	7**	9**
			合計	0	0	9**	16**	20**	28**	31**	32**
	脾 臓	ヘモジリデ ン沈着	軽微	25	6	15	0	10	2	0	0
			軽度	7	23	15*	21	20**	11	18**	10
			中度	0	3	2	11*	2	19**	14**	22**
			合計	32	32	32	32	32	32	32	32
	赤脾髓のうっ血		0	0	0	0	12**	7**	18**	12**	
	検査動物数		—	—	—	雌 27	雄 28	—	雄 27	雌 28	
	黄体数減少		—	—	—	2	—	—	—	—	
	軽微な両側の精巣上体 頭における精子の欠如		—	—	—	—	1	—	—	—	
	軽微な精巣における間 質の増生		—	—	—	—	1	—	—	—	
	顕著な両側の精巣管の 萎縮		—	—	—	—	1	—	—	—	
顕著な精細管の片側性 萎縮		—	—	—	—	—	—	1	—		
黄体の欠如		—	—	—	—	—	—	—	1		

* : $p \leq 0.05$ 、** : $p \leq 0.01$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

世 代		親:F1								
投 与 量 (ppm)		対照群(0)		500		5000		50000		
動 物 数		雄 28	雌 28	雄 28	雌 28	雄 28	雌 28	雄 28	雌 28	
親 動 物	一般状態	投与に関連した変化なし						淡色糞		
	死亡数	0	0	0	1	0	0	0	0	
	体 重 増 加量(g)	0~1週	—	—	—	—	—	—	—	—
		4~16週	407	186	421	178	423	178	430	188
		分娩後21日	—	42.7	—	45.5	—	48.0	—	46.0
	累 積 摂餌量 (g/動物)	1週	—	—	—	—	—	—	—	—
		2~10週	—	—	—	—	—	—	—	—
		5~16週	2096	1552	2221*	1537	2199**	1622	2324**	1585
		13~20週	—	—	—	—	—	—	—	—
	累 積 飲水量 (ppm)	20~26週	1294	—	1358	—	1361	—	1421**	—
		1~2週	—	—	—	—	—	—	—	—
		9~10週	—	—	—	—	—	—	—	—
		5~6週	298.5	296.2	323.3	298.5	346.2**	325.8**	356.4**	339.3**
	交配日数	9~10週	497.6	444.7	547.3	436.9	562.5*	468.5	613.1**	504.8*
		交配日数	4.0		5.0		3.0		4.0	
	妊娠動物数	—	23	—	23	—	24	—	23	
	分娩後の同腹児総死亡動物数	—	0	—	1	—	0	—	2	
	離乳完了母動物数	—	23	—	23	—	24	—	22	
	妊娠期間	—	22.0	—	21.8	—	22.0	—	21.9	
	血 液 学 的 検 査	ヘマトクリット値	50	50	47**	44**	45**	41**	44**	41**
		ヘモグロビン量	15.4	15.5	14.2**	13.5**	13.9**	13.0**	13.7**	13.3**
		赤血球数	7.6	7.2	6.9**	6.2**	6.5**	5.7**	6.3**	5.6**
		MCHC	30.6	31.0	30.4	30.9	30.5	31.8	31.1	32.5*
MCV		66	69	67	70*	70**	72**	70**	73**	
多染性赤血球		2	0	23	17	23	22	24	26	
赤血球の大小不同		20	0	23	3	21	1	23	2	
ハウエル-ジョリー小体		0	0	0	6	4	7	4	18	
臓 器 重 量	検 査 動 物 数	雄 28	雌 28	雄 28	雌 27	雄 28	雌 28	雄 27	雌 28	
	脾臓 対体重比	0.81	0.52	1.03**	0.71**	1.20**	0.92**	1.37**	1.04**	
	肝臓 対体重比	24.20	13.43	22.56*	13.54	22.12*	14.48**	23.82*	14.67**	
	脳下垂体 対体重比	15.4	—	15.9	—	16.6	—	17.5**	—	

*: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アグロカネショウ株式会社にある。

世 代		親(F1)									
投 与 量 (ppm)		対照群(O)		500		5000		50000			
親 動 物	病理組織学的検査										
	検 査 動 物 数		雄 28	雌 28	雄 28	雌 27	雄 28	雌 28	雄 27	雌 28	
	肝 臓	小葉中心性 肝細胞肥大	0	0	0	0	2	10**	10**	12**	
		小葉中心性肝細胞 の軽度の空胞化	10	2	7	0	6	1	19*	5	
		褐色色素 貪食クッパ 一細胞	軽微	0	0	14**	12**	18**	16**	17**	20**
			軽度	0	0	0	0	8**	10**	7*	6*
	合計		0	0	14**	12**	26**	26**	24**	26**	
	脾 臓	ヘモジリデ ン沈着	軽微	20	7	19	4	3	0	0	0
			軽度	8	16	9	17	22**	12	21**	10
			中度	0	5	0	6	3	16**	6*	18**
			合計	28	28	28	27	28	28	27	28
	赤脾髄のうっ血		0	0	0	0	12**	19**	17**	18**	

* : $p \leq 0.05$ 、** : $p \leq 0.01$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

児動物の概要:

世代		児:F _i				
投与量 (ppm)		0	500	5000	50000	
児動物	母動物数	29	29	29	31	
	着床痕数	14.0	14.2	13.9	14.4	
	着床死亡率(%)	9.6	7.3	6.6	8.6	
	同腹児数	合計数	12.7	13.1	13.0	13.2
		生存数	12.6	12.6	12.9	12.9
	分娩時生存率(%)		98.4	96.0	99.8	97.7
	4日生存率(%)		95.9	94.2	98.5	96.3
	21日(離乳時)生存率(%)		99.1	98.6	99.1	100
	性比 (雄%)	生後0日	46.7	46.2	54.5	48.1
		生後4日	48.5	49.0	50.6	49.1
		生後21日	48.5	49.3	50.1	49.1
	児の 平均体重(g)	生後0日	6.1	6.0	6.1	5.8
		生後4日(児数選別前)	9.4	9.1	9.2	8.7*
		生後4日(児数選別後)	9.5	9.1	9.3	8.6*
		生後8日	17.2	16.6	16.7	15.9*
		生後12日	26.2	25.4	25.7	24.8
		生後16日	35.4	34.8	34.9	33.9
生後21日		51.3	50.3	49.6	48.3**	
包皮分離日(雄:平均日齢)		45.9	46.1	45.0	46.1	
膺開口日(雌:平均日齢)		33.0	32.7	33.3	32.6	

* 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アグロカネシヨウ株式会社にある。

世代		児:F ₂				
投与量 (ppm)		0	500	5000	50000	
児 動 物	母動物数	23	22	24	20	
	着床痕数	14.0	14.0	13.6	14.1	
	着床死亡率(%)	9.5	5.3	10.4	9.4	
	同腹児数	合計数	12.9	13.1	12.3	12.8
		生存数	12.8	13.0	12.1	12.7
	分娩時生存率(%)		99.3	99.0	98.2	99.3
	4日生存率(%)		98.9	94.8	96.8	96.9
	21日(離乳時)生存率(%)		98.4	98.9	100	99.4
	性比(雄%)	生後0日	47.7	42.7	51.8	53.7
		生後4日	50.5	49.1	50.3	51.8
		生後21日	50.9	49.9	50.3	52.2
	児の平均体重 (g)	生後0日	6.1	6.0	6.3	6.2
		生後4日(児数調整前)	9.3	9.0	9.5	9.3
		生後4日(児数調整後)	9.3	9.0	9.6	9.4
		生後8日	17.0	16.2	17.0	17.1
生後12日		26.4	24.7	26.0	26.1	
生後16日		36.1	34.2	35.1	35.2	
生後21日		51.5	48.6	48.7	50.0	
包皮分離(雄:平均日齢)		-	-	-	-	
膣開口(雌:平均日齢)		-	-	-	-	

*P≤0.05、**P≤0.01

- 測定していない

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

④ ラットにおける催奇形性試験

(資料 T-17)

試験機関:Huntingdon Research Centre(英国)

報告書作成年:1975年

検体の純度:

試験動物:CD系ラット、体重125~242g、1群雌20匹

試験期間:投与期間10日間(器官形成期)

試験方法:検体を0.5%トラガントゴムに懸濁し、1、2及び4mg/kgの投与量で妊娠後6日目から15日目までの10日間、毎日1回経口投与した。なお、対照群には溶媒のみを同様に投与した。

試験項目:

母体:一般状態及び生死を毎日観察し、妊娠1、3、6、10、14、20日目に体重を測定した。妊娠20日目に帝王切開し、黄体数、着床数、生存胎児数及び吸収胚数を検査した。

生存胎児:性別を観察し、体重を測定した。各同腹児群の約2/3の胎児については骨格標本作製し、骨格異常の有無を検査し、残りの胎児については内蔵異常の有無を検査した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

結 果:

		対 照	ジフルベンズロン			
		0 (賦形剤)	1	2	4	
親 動 物	1 群当たり動物数	20	20	20	20	
	一 般 状 態	検体投与による影響はみられなかった				
	死 亡 数	0	0	0	0	
	体 重 増 加 量 (g)	183	190	178	192	
	妊 娠 率 (%)	90	95	85	90	
	流 産 数	0	0	1	0	
	着 床 所 見	検査動物数	18	19	16	18
		黄 体 数	15.5	13.8	13.1	14.2
		着 床 数	11.7	11.3	10.1	11.0
		生存胎児数	11.2	10.5	9.2	10.3
吸収胚数		0.5	0.7	0.9	0.7	

投 与 量 (mg/kg/日)			対 照	ジフルベンズロン			
			0 (賦形剤)	1	2	4	
胎 児 動 物		1 腹児重量(g)	41.00	40.76	34.93	40.89	
		胎児体重(g)	3.65	3.87 ↑	3.85	3.99 ◊	
		性比(雄/雌)	0.70	1.19	0.92	0.87	
	重症奇形	検査数	202	200	147	186	
		発現率 (%)	1.0	0.4	1.0	0	
	軽症奇形	内 蔵	検査数	63	68	32	67
			発現率(%)	10.5	1.5	14.9	5.6
		骨 格	検査数	137	131	114	119
			発現率(%)	6.6	3.1	0.8	3.2
	骨格検査	過剰肋骨	検査数	137	131	114	119
			発現率(%)	13.3	14.6	11.7	13.7
		過剰肋骨の内、 胸骨分節の変化	検査数	17	18	12	16
			発現率(%)	30.9	36.2	10.0	31.9
		正常肋骨の内、 胸骨分節の変化	検査数	120	113	102	103
			発現率(%)	52.7	28.5 ↓	29.8 ↓	23.9 ◊

Wilcoxon 法 ↑ ↓ : 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アグロカネショウ株式会社にある。

奇形を次のように分類した。

重 症：稀れでかつ致死性の恐れのあるもの、及び稀れかあるいは致死性のあるもの(所見例：
眼球の発育不全、内蔵逆位、腎臓の空洞化、皮下浮腫等)

軽 症：正常状態とは軽度の差で、肉眼的病理検査でしばしばみられるもの(所見例；腎臓の軽
い空洞化、軽い硬膜下出血、軽い皮下浮腫、精巣の変位等)及び骨格検査でしばしばみ
られるもの(所見例；尾仙骨弓の化骨遅延、両側 1 本ずつの肋骨の縮小、1 本の胸骨中
枢の二分化・欠如等)

結 果：

親動物

親動物の各種観察項目、検査項目ともに全投与群で検体投与による影響はみられなかった。

胎児動物

胎児動物については、平均胎児体重が全投与群において対照群より高く、1mg、4mg 投与群で
有意差が認められたが、検体投与によるものとは考えられない。また、正常肋骨のうち胸
骨分節の変化が全投与群において対照群より低く、有意差が認められたが、明らかな用量相
関性に乏しいので、検体投与によるものとは考えられない。

以上の結果から、申請者としてジフルベンズロン原体を妊娠ラットに投与したときの母体における最大
無作用量は 4mg/kg/日であり、最高投与量の 4mg/kg/日でも胎児に対して催奇形性を及ぼさないと
判断する。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

⑤ ラットを用いた催奇形性試験(限度試験)

(資料 T-18)

試験機関 : Toxicol Laboratories Limited(英国)

[GLP 対応]

報告書作成年: 1988 年

検体の純度:

供試動物 : SD系 [CrL:CD(SD)BR] ラット、体重; 妊娠0日 220~266 g
1群; 交配した雌 24 匹

投与期間 : 10 日間; 妊娠 6~15 日(投与期間: 1987 年 5 月 26 日~6 月 4 日)

投与方法 : 検体を 1.0%(w/v)トラガカントゴム溶液に懸濁し、1000 mg/kg の投与量を 10 mL/kg の容量で妊娠 6 日から 15 日目までの 10 日間にわたって毎日 1 回経口投与した。交尾を確認した日を妊娠 0 日とし、妊娠 20 日目に動物を屠殺した。
対照群には、1.0%トラガカントゴム溶液のみを同様に投与した。

用量設定根拠:

観察・検査項目:

親動物: 一般状態及び生死を毎日観察し、体重は妊娠 0、6、15 及び 20 日に測定した。
摂餌量は、妊娠 0~6、6~11、11~15 及び 15~20 日に測定した。妊娠 20 日目に動物を屠殺し、帝王切開により胎児を取り出した。母動物の妊娠状況、黄体数、生存及び死亡胎児数、着床数、早期及び後期死亡胚数並びに妊娠子宮重量を測定した。

生存胎児: 生存胎児について、性別、体重、外表異常を検査した。各同腹児の半数の胎児はブアン固定後、内臓異常の検査を行い、残りの胎児はアルコール固定後、骨格をアリザリンレッドで染色し骨格異常を検査した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

結 果： 試験結果の概要を表 1 に示した。

親 動 物：

死亡及び一般状態： 死亡例は認められなかった。投与群の動物の一般状態にも投与に関連した変化はみられなかった。

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

剖 検： 投与群の 1 匹に横隔膜ヘルニアが認められた以外は異常は認められず、このヘルニアは偶発的な所見であると考えられる。妊娠数、黄体数、着床数、生存胎児数、着床前及び着床後死亡胚数にも、対照群と投与群との間に有意差は認められなかった。

生存胎児： 胎児の体重及び性比は、投与の影響を受けていなかった。大異常(外表/内臓及び骨格異常)並びに小異常(外表/内臓異常)も、投与の影響を受けていなかった。投与群において、小異常(骨格異常)を有する胎児数が僅かに多かったが、通常的背景データ内であった。投与群の胎児の骨格に有意差がみられるものがあったが、その差は僅かであったため、対照群の胎児と同様の化骨状態を示しているものと考えられた。

以上の結果より、ジフルベンズロン原体を妊娠ラットに投与したときの母動物及び胎児動物における無毒性量は 1000 mg/kg/day であった。また、胎児動物に対して催奇形性はないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

表 1: 結果の概要

投 与 群 (mg/kg/日)		0	1000	
1 群当り動物数		24	24	
親 動 物	妊娠動物数	22	23	
	一般状態	異常なし	異常なし	
	死亡数	0	0	
	体重変化	異常なし	異常なし	
	摂餌量	異常なし	異常なし	
	剖検所見	投与に関連した変化はみられなかった		
	着 床 所 見	平均黄体数 ^{a)}	17.4±2.4	17.9±2.6
		平均着床数 ^{a)}	14.5±1.9	15.3±1.6
		平均生存胎児数 ^{a)}	14.0±1.8	14.6±2.1
		平均着床前死亡胚率 ^{b)}	15.1	13.3
平均着床後死亡胚率 ^{b)}		3.6	5.2	

^{a)} 分散分析

^{b)} Kruskal-Wallis

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

結果の概要 — 続き —

体 重 (g)		雄	3.39±0.19	3.22±0.16
		雌	3.36±0.27	3.20±0.25
性 比(雄/雌)			53/47	55/45
胎 児 動 物	外 表 ・ 内 臓 異 常	検査胎児数	308	335
		大異常	胃、脾臓及び肝臓を共有した腹部で 合体した二重体;1つの頭部; 脳ヘルニア及び上顎の発育不全	0
	異常反転した後肢		0	1
	馬蹄形腎		0	1
	小異常	発育不全の胎児(< 2gの体重)	0	2
		浮腫性胎児	0	1
		胴体の短小化	0	2
		くも膜下出血	0	1
		腹部出血	1	0
		腎盂の拡張: 片側または両側性	15	10
		尿管拡張:片側または両側性	17	16
	側脳室の拡張	1	0	
	骨 格 検 査	検査胎児数	154	167
		大異常	頭骨;後頭骨:奇形	0
頭骨;頭頂骨間:奇形			0	2
頭骨;頭頂骨:奇形			0	2
頭骨;下顎骨、前頭骨、鼻骨:欠損			0	1
椎骨;腰椎数:2			0	1
椎骨;腰椎体:未化骨、椎弓:奇形			0	1
小異常		椎骨;胸椎数:12	1	0
		椎骨;腰椎数:7	2	2
		椎骨;胸椎体:1本または それ以上の二分化	1	4
		椎骨;胸椎体:1本または それ以上の化骨遅延	3	2
		椎骨;胸椎体:1本または それ以上が未化骨	1	7
		椎骨;胸椎体:1本または それ以上が奇形または化骨遅延	0	1

a) 分散分析

b) Kruskal-Wallis

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

結果の概要 — 続き —

投与群 (mg/kg/日)		0	1000		
胎 児 動 物	骨 格 検 査	椎骨;腰椎体:1本または それ以上が二葉化	1	2	
		椎骨;仙骨:1本または それ以上が化骨遅延	2	3	
		椎骨;仙骨:1本または それ以上が未化骨		1	
		肋骨;第13および14肋骨の過剰	5	4	
		肋骨;第12右肋骨と第13左肋骨との 結合	1	0	
		肋骨;波状肋骨	1	0	
		胸骨分節;第1:化骨遅延	0	2	
		胸骨分節;第2:化骨遅延	2	7	
		胸骨分節;第3:化骨遅延	0	5	
		胸骨分節;第4:化骨遅延	0	4	
		胸骨分節;第1:未化骨	0	1	
		胸骨分節;第2:未化骨	1	3	
		胸骨分節;第3:未化骨	0	2	
		胸骨分節;第4:未化骨	0	3	
		胸骨分節;1または2本が、二葉化、 二分化または不明確	12	24	
		後肢帯;恥骨:化骨遅延	2	12	
		後肢帯;座骨:化骨遅延	3	4	
		後肢帯;恥骨:未化骨	3	4	
		変異	頭骨;後頭骨:化骨遅延	51	44
		頭骨;頭頂骨間:化骨遅延	22	17	
	頭骨;頭頂骨:化骨遅延	3	1		
	頭骨;前頭骨:化骨遅延	0	1		
	頭骨;舌骨:未化骨	34	26		
	脊骨;尾骨椎体:<2	3	12		
	脊骨;尾部神経弓数:0	3	14		
	脊骨;頸椎体:1本または それ以上が化骨	42	71		
	脊骨;胸椎体:1本または それ以上が二葉化	57	86 [*]		
	胸骨分節;第5:未化骨	40	50		
胸骨分節;第6:未化骨	5	26 [*]			
前肢;中手骨:未化骨	68	73			
前肢;指骨の化骨	6	4			
後肢;中足骨:未化骨	0	2			

^{a)} 分散分析

^{*} p < 0.05

^{b)} Kruskal-Wallis

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

⑥ ウサギにおける催奇形性試験

(資料 T-19)

試験機関:Huntingdon Research Centre(英国)

報告書作成年:1975年

検体の純度:

試験動物:New Zealand系白色ウサギ、体重2910~4100g、1群雌13匹

試験期間:投与期間13日間(器官形成期)

試験方法:検体を0.5%トラガカントゴムに懸濁し、1、2及び4mg/kgの投与量で妊娠後6日目から18日目までの13日間、毎日1回経口投与した。なお、対照群には溶媒のみを同様に投与した。投与量設定に関しては、ラットの催奇形性試験(資料 T-16)の投与量0、1、2及び4mg/kgと同じにした。

[申請者注]試験実施当時、異なる動物種を比較する場合は、同じ投与量を用いるという考え方が一般的であった。

試験項目:

母体:一般状態及び生死を毎日観察し、妊娠1、6、10、14、21、28日目に体重を測定した。
妊娠29日目に帝王切開し、黄体数、着床数、生存胎児数及び吸収胚数を検査した。

生存胎児:性別を観察し、体重を測定した。各同腹児群の全胎児については骨格標本作製し、骨格異常の有無を検査し、残りの胎児については内蔵異常の有無も検査した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

結 果:

投 与 量 (mg/kg/日)		対 照	ジフルベンズロン			
		0 (賦形剤)	1	2	4	
親 動 物 着 床 所 見	1群当たり動物数	13	13	13	13	
	一 般 状 態	検体投与による影響はみられなかった				
	死 亡 数	1	1	2	0	
	体 重 増 加 量 (g)	535	511	647	601	
	妊 娠 率 (%)	100	100	100	100	
	流 産 数	0	1	0	2	
	着 床 所 見	検査動物数	12	11	11	11
		黄 体 数	10.9	10.4	10.2	10.7
		着 床 数	9.9	8.8	9.1	10.2
		生存胎児数	9.0	7.6	8.5	8.5
吸収胚数		0.9	1.2	0.6	1.7	

投 与 量 (mg/kg/日)			対 照	ジフルベンズロン			
			0 (賦形剤)	1	2	4	
胎 児 動 物 骨 格 検 査	1 腹 児 重 量 (g)		365.6	316.7	363.6	342.0	
	胎 児 体 重 (g)		42.4	41.7	43.2	41.2	
	性 比 (雄/雌)		1.05	1.26	0.70	1.15	
	重 症 奇 形	検 査 数		108	84	93	93
		発 現 率 (%)		2.9	2.3	2.7	1.5
	軽 症 奇 形	内 蔵	検 査 数	105	83	91	92
			発 現 率 (%)	4.2	7.7	0	0
		骨 格	検 査 数	105	83	91	92
			発 現 率 (%)	11.3	13.8	6.2	7.9
	骨 格 検 査	過剰肋骨	検 査 数	105	83	92	92
			発 現 率 (%)	39.9	62.7	43.7	51.6
		過剰肋骨の内、 胸骨分節の変異	検 査 数	44	48	40	46
			発 現 率 (%)	12.0	0	0	4.0
		正常肋骨の内、 胸骨分節の変異	検 査 数	61	35	52	46
			発 現 率 (%)	6.9	22.9	22.9	6.6

※統計処理は未実施

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

奇形を次のように分類した。

重症：稀れでかつ致死性の恐れのあるもの、及び稀れかあるいは致死性のあるもの(所見例；
脊椎の発育不全、肢の湾曲、全ての胸骨分節の癒合、頭頂骨の歪曲、上あごの無化骨、
腎臓の発育不全、脳出血、肺動脈と上行大動脈の癒合、不完全な心室間隔膜等)

軽症：正常状態とは軽度の差で、肉眼的病理検査でしばしばみられるもの(所見例；胆嚢の縮
小、肺葉の発育不全等)及び骨格検査でしばしばみられるもの(所見例；縫合骨、距骨の
無化骨、胸骨分節の癒合・過剰化骨・扁平化等の変化)
親動物の各種観察項目、検査項目ともに全投与群で検体投与による影響はみられな
かった。また、胎児動物についても、全投与群で検体投与による影響はみられな
かった。

以上の結果から、ジフルベンズロン原体を妊娠ウサギに投与したときの母体における最大無作用量は
4mg/kg/日であった。また、最高投与量の 4mg/kg/日でも胎児に対して催奇形性を及ぼさないと判断さ
れる。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

⑦ ウサギを用いたジフルペンズロンの催奇形性試験(限度試験)

(資料 T-20)

試験機関 : Toxicol Laboratories Limited (英国)

[GLP 対応]

報告書作成年: 1988 年

検体の純度:

供試動物 : ニュージーランド系白色種のウサギ、月齢: 約 4 ヶ月齢、体重: 妊娠 0 日の平均 3.61 ~ 3.70 kg、1 群; 交尾雌 16 匹

投与期間 : 13 日間: 妊娠 7 ~ 19 日まで (投与期間: 1987 年 7 月 21 日 ~ 8 月 3 日)

投与方法 : 検体を 1.0% (w/v) トラガカントゴム溶液に懸濁し、1000 mg/kg の投与量を 10 mL/kg の容量で妊娠 7 日から 19 日目までの 13 日間にわたって毎日 1 回経口投与した。交尾を確認した日を妊娠 0 日とし、妊娠 28 日目に動物を屠殺した。対照群には、1.0% トラガカントゴム溶液のみを同様に投与した。

用量設定根拠:

観察・検査項目及び結果:

親動物 : 一般状態及び生死を毎日観察し、体重は妊娠 0、3、7 ~ 19、22、25 及び 28 日に測定した。摂餌量は、妊娠中に 2 日毎に計 13 回測定した。途中死亡動物について剖検し、妊娠 28 日目まで生存していた動物は屠殺して、帝王切開により胎児を取り出した。母動物の妊娠状況、黄体数、生存及び死亡胎児数、着床数、早期及び後期吸収胚数並びに妊娠子宮重量を測定した。

生存胎児 : 生存胎児について、性別、体重、外表異常を検査した。屠殺した胎児は 70% アルコールに固定して内臓異常の検査を行い、その後にアリザリンレッド S を用いて染色して骨格異常を検査した。

生存胎児の健康または生存を損なう、あるいは潜在的に損なうおそれのある先天的な構造異常を大異常およびその他の欠損を小異常とした。また、妊娠 28 日目の胎児の化骨の程度および肋骨数の差異を変異とした。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

結 果： 試験結果の概要を次頁の表に示した。

親 動 物：

死亡及び一般状態： 死亡例は認められなかったが、投与群の 1 例に歩行異常がみられた。剖検により右後肢の脱臼が認められたので、この歩行異常は被験物質と関連しないものと考えられた。

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

剖 検： 投与群および対照群の各 1 例に肺の出血がみられたが、この出血は対照群にもみられたことから投与に関連しないものと考えられた。妊娠数、黄体数、着床数、生存胎児数、着床前及び着床後死亡胚数は、対照群と同等であった。

生存胎児： 胎児の体重及び性比には、投与の影響がみられなかった。大異常(外表／内臓および骨格異常)並びに小異常(外表／内臓異常および骨格異常)の種類および発現率にも投与の影響はみられなかった。

以上の結果より、ジフルベンズロン原体を妊娠ウサギに投与したときの母動物および胎児動物における無毒性量は 1000 mg/kg/日であった。また、1000 mg/kg/日でも胎児動物に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

結果の概要

投与群 (mg/kg/日)		0	1000		
1群当り動物数		16	16		
親動物	妊娠動物数	14	13		
	一般状態	異常なし	異常なし		
	死亡数	0	0		
	体重変化	異常なし	異常なし		
	摂餌量	異常なし	異常なし		
	剖検所見	投与に関連した変化はみられなかった			
	着床所見	平均黄体数 ^{a)}	12.0±2.8	11.9±3.4	
		平均着床数 ^{a)}	9.6±2.3	8.9±2.0	
		平均生存胎児数 ^{a)}	8.4±1.9	8.0±2.3	
		平均着床前死亡率(%) ^{b)}	19.4	22.7	
平均着床後死亡率(%) ^{b)}		11.2	10.8		
体重 (g)	雄	37.6±3.5	37.9±3.2		
	雌	37.4±3.6	37.1±3.6		
性比(雄/雌)		50/50	53/47		
胎児動物	検査胎児数		117	104	
	外表・内臓異常	大異常	頭部右側の奇形:片側性の無眼、鼻開口部の拡張、無口	1	
			肺動脈弁の閉鎖	1	1
			関節拘縮	1	
			前肢:短指	1	
	小異常	左総頸動脈の分岐異常(無名動脈から発生)	1	1	
			胆嚢の小型化	2	
			曲尾		1
	検査胎児数		117	104	
	骨格検査	大異常	頭骨:右眼窩洞、頬骨弓及び鼻骨の欠損、右下顎骨:短縮及び奇形	1	
椎骨:腰椎数:8			4	4	
小異常		椎骨:胸椎体:1またはそれ以上が二葉化または二分化		1	
		胸骨分節:1本またはそれ以上:軽度の癒合	5	1	
		胸骨分節:1本またはそれ以上:奇形またはずれ	5	2	
		胸骨分節:1本またはそれ以上:二葉化または二分化	10	5	
		胸骨分節:第5:未化骨	24	19	
		胸骨分節:第6:化骨遅延	3	1	
		胸骨分節:第6:未化骨	17		
		後肢帯:恥骨:化骨遅延	1	1	
		前肢:第5中手骨:未化骨	1		
		前肢:指骨:未化骨	1		
		後肢:距骨:未化骨	1		

^{a)} 分散分析

^{b)} Kruskal-Wallis

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

結果の概要—続き—

投 与 群 (mg/kg/日)		0	1000
変 異	椎骨;胸椎数:13	44	35
	椎骨;腰椎数:6	23	13
	椎骨;尾部神経弓数:≤6	32	28
	椎骨;尾椎体数:≤14	13	18
	肋骨;第13肋骨の過剰	59	48
	胸骨分節;第5:化骨遅延	22	25
	前肢;骨端:未化骨	28	12
	前肢;上腕骨骨端:未化骨	40	35
	後肢;骨端:未化骨	51	42
	後肢;脛骨骨端:未化骨	47	47

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

9)変異原性

① 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 T-21)

試験機関:(財)残留農薬研究所

報告書作成年:1978年

検体の純度:

方法:ヒスチジン要求性のサルモネラ菌(TA系5株)及びトリプトファン要求性大腸菌(WP2*hcr*株)を用い、ラット肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9Mix)の存在下及び非存在下でAmesらの方法で変異原性を検定した。尚、検体による菌株の生育阻止が認められない場合は、5000 μ g/plateを最高濃度とした。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

結 果:

薬 物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9 Mix の 有 無	復帰変異 colony 数/plate					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			WP2 hcr	TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
対 照 (DMSO)		-	13	1	99	3	12	17
			7	4	104	9	11	14
ジフルベンズロン	10	-	15	1	111	7	14	34
			13	4	99	2	11	26
	50	-	18	4	95	6	9	24
			19	4	110	8	11	10
	100	-	14	2	104	8	9	21
			9	4	102	2	6	17
500	-	18	4	98	4	3	25	
		9	3	99	3	11	28	
1000	-	9	3	84	9	10	19	
		8	8	100	7	14	28	
5000	-	11	1	68	6	12	18	
		14	1	93	2	9	14	
対 照 (DMSO)		+	15	3	149	6	11	22
			15	7	104	6	14	23
ジフルベンズロン	10	+	15	2	101	8	23	27
			16	1	139	6	14	33
	50	+	10	1	123	6	14	22
			14	7	143	9	15	24
	100	+	14	0	112	10	8	17
			20	3	117	8	18	22
500	+	14	5	103	7	14	23	
		13	5	103	10	13	23	
1000	+	18	2	95	9	24	16	
		13	8	92	1	15	19	
5000	+	23	4	98	4	12	20	
		11	1	103	5	15	23	
陽性対照 2-amino- anthracene	10	-	16	13	129	12	27	38
			13	6	123	13	19	30
陽性対照	10	+	167	158	>3000	418	>3000	>3000
			180	113	>3000	574	>3000	>3000
陽性対照		-	1824 ^{a)}	944 ^{b)}	956 ^{c)}	>10000 ^{d)}	>3000 ^{e)}	335 ^{f)}
			1692	894	882	>10000	>3000	359

- a) AF-2 0.25 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) β -propiolactone 50 $\mu\text{g}/\text{plate}$
c) AF-2 0.05 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) 9-aminoacridine 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$
e) 2-nitrofluorene 50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ f) AF-2 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$

ジフルベンズロン存在下ではいずれの変異株においても対照群と比べ復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。一方、陽性対照として用いた 2-amino-anthracene、AF-2、 β propiolactone、9-aminoacridine 及び 2-nitrofluorene では明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

以上の結果から、ジフルベンズロン原体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

② 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 T-22)

試験機関: Western Regional Research Center
(米国)

報告書作成年: 1979 年

検体の純度: 原体 及び 23.5%水和剤

方 法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌(TA100、TA98、TA1535、TA1537)を用い、ラット肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9Mix)の存在下及び非存在下で Ames らの方法で変異原性を検定した。

結 果:

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9 Mixの有無	復帰変異平均 colony 数/plate			
			TA100	TA98	TA1535	TA1537
対 照 (DMSO)		—	151 \pm 19(6)	24 \pm 5(4)	20 \pm 2(4)	12 \pm 3(4)
ジフルベンズロン 原 体	10	—	163 (2)	29 (2)	21 (2)	9 (2)
	100	—	151 (2)	23 (2)	21 (2)	9 (2)
	1000	—	139 (2)	24 (2)	20 (2)	10 (2)
ジフルベンズロン 23.5%水和剤	19	—	144 (2)	27 (2)	20 (2)	13 (2)
	186	—	137 (2)	33 (2)	25 (2) \uparrow	7 (2)
	1860	—	165 (2)	25 (2)	15 (2)	7 (2)
対 照 (DMSO)		+	144 \pm 16 (6)	37 \pm 3 (4)	12 \pm 5 (4)	16 \pm 1 (4)
ジフルベンズロン 原 体	10	+	155 (2)	38 (2)	18 (2)	14 (2)
	100	+	125 (2)	37 (2)	14 (2)	10 (2)
	1000	+	134 (2)	35 (2)	14 (2)	9 (2)
ジフルベンズロン 23.5%水和剤	19	+	151 (1)	36 (2)	16 (2)	15 (2)
	186	+	156 (2)	32 (2)	17 (2)	16 (2)
	1860	+	154 (2)	28 (2)	16 (2)	11 (2)
陽性対照		—			>1000 ^{c)} \diamond	>1000 ^{d)} \diamond
		+	\sim 1000 ^{a)} \diamond	\sim 1000 ^{b)} \diamond		

a) Aflatoxin B₁ 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$

b) Aflatoxin B₁ 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

c) N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoamine 5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) 9-Aminoacridine 100 $\mu\text{g}/\text{plate}$

()は反復数を示す。 \uparrow : >平均 2 S.D., \diamond : >平均 3 S.D.

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

ジフルベンズロン原体、23.5%水和剤ともに S-9 の有無にかかわらず、菌株 TA100、TA98、TA1535、TA1537 において対照と比べ復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。一方、陽性対照として用いた Aflatoxin B₁、N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine 及び 9-aminoacridine では明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果から、ジフルベンズロン原体及び 23.5%水和剤は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

③ 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 T-23)

試験機関 : Duphar B.V.(オランダ)

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1990 年

検体の純度 :

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び TA1538 を供試菌株として、代謝活性化系(S-9 mix)の存在下及び非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

本試験では検体をジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解して、8、40、200 及び 1000 µg/プレートの 4 用量を設定し、各 3 反復で 2 回の試験を実施した。陽性対照物質は、代謝活性化の非存在下ではアジ化ナトリウム(SA)及び 4-ニトロ-o-フェニレンジアミン(4NPDA)、その存在下では 2-アミノアントラセン(2AA)、ニュートラルレッド(NR)及び 2-アセチルアミノフルオレン(2AAF)を、供試菌株に応じて使い分けた。

用量設定根拠 :

試験結果 : 結果を次頁以降の表に示す。

検体により誘発された供試菌株の復帰変異コロニー数は、S-9 mix 非存在下及び存在下のいずれにおいても、各供試菌株の陰性対照値の 2 倍を上回らなかった。

一方、陽性対照では、それぞれの供試菌株において十分な復帰突然変異コロニー数が認められた。溶媒(DMSO)対照における復帰変異コロニー数は、全ての供試菌株で自然復帰コロニー数の範囲内であった。

以上の結果から、ジフルベンズロン原体は代謝活性化を含む本試験下では、復帰変異誘発性は有しないものと判定される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

1 回目の試験: (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬剤	濃度 (μg /プレート)		S-9 mix	復帰コロニー数/プレート				
				塩基対置換型		フレームシフト型		
				TA100	TA1535	TA98	TA1537	TA1538
対照	0	—	87 \pm 1	13 \pm 6	22 \pm 6	5 \pm 2	23 \pm 7	
検体	8	—	102 \pm 12	9 \pm 4	22 \pm 8	4 \pm 1	23 \pm 6	
	40	—	116 \pm 16	8 \pm 3	17 \pm 1	6 \pm 2	22 \pm 3	
	200	—	104 \pm 5	7 \pm 2	20 \pm 4	7 \pm 5	31 \pm 6	
	1000	—	109 \pm 5	14 \pm 1	20 \pm 3	8 \pm 4	18 \pm 7	
陽性 対照	SA	5	—	540 \pm 9	340 \pm 78	—	—	
	4NPDA	100	—	—	—	1101 \pm 252	195 (n=2) 1481 \pm 273	
対照	0	+	86 \pm 18	11 \pm 2	24 \pm 6	8 \pm 2	21 \pm 6	
検体	8	+	94 \pm 8	10 \pm 1	21 \pm 3	6 \pm 2	23 \pm 10	
	40	+	99 \pm 3	10 \pm 2	23 \pm 5	8 \pm 3	21 \pm 5	
	200	+	90 \pm 20	9 \pm 5	25 \pm 2	10 \pm 5	27 \pm 3	
	1000	+	82 \pm 10	10 \pm 5	25 \pm 1	6 \pm 2	19 \pm 3	
陽性 対照	2AA	2	+	999 \pm 22	33 \pm 5	1319 \pm 109	—	
	NR	5	+	—	—	—	113 \pm 15	
	2AAF	20	+	—	—	—	324 \pm 28	

注)

SA: アジ化ナトリウム
 4NPDA: 4-ニトロ-o-フェニレンジアミン
 2AA: 2-アミノアントラセン
 NR: ニュートラルレッド
 2AAF: 2-アセチルアミノフルオレン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

2 回目の試験: (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬剤	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 mix	復帰コロニー数/プレート				
			塩基対置換型		フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA98	TA1537	TA1538
対照	0	-	104 \pm 11	12 \pm 2	18 \pm 3	9 \pm 1	31 \pm 9
検体	8	-	117 \pm 9	11 \pm 1	19 \pm 2	8 \pm 3	28 \pm 3
	40	-	121 \pm 20	11 \pm 2	20 \pm 7	8 \pm 3	26 \pm 3
	200	-	126 \pm 12	9 \pm 1	23 \pm 5	5 \pm 2	29 \pm 3
	1000	-	120 \pm 14	8 \pm 1	22 \pm 3	6 \pm 2	28 \pm 4
陽性 対照	SA 5	-	716 \pm 60	551 \pm 31	-	-	-
	4NPDA 100	-	-	-	1050 \pm 93	245 \pm 14	1085 \pm 88
対照	0	+	101 \pm 6	13 \pm 4	25 \pm 4	5 \pm 3	25 \pm 3
検体	8	+	107 \pm 12	9 \pm 2	27 \pm 5	6 \pm 3	34 \pm 10
	40	+	111 \pm 5	8 \pm 5	30 \pm 8	7 \pm 1	32 \pm 4
	200	+	104 \pm 12	11 \pm 4	34 \pm 1	7 \pm 4	28 \pm 6
	1000	+	105 \pm 9	8 \pm 1	23 \pm 6	7 \pm 1	27 \pm 4
陽性 対照	2AA 2	+	1145 \pm 125	48 \pm 10	1680 \pm 15	-	-
	NR 5	+	-	-	-	159 \pm 1	-
	2AAF 20	+	-	-	-	-	322 \pm 20

注)

- SA: アジ化ナトリウム
 4NPDA: 4-ニトロ-o-フェニレンジアミン
 2AA: 2-アミノアントラセン
 NR: ニュートラルレッド
 2AAF: 2-アセチルアミノフルオレン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

④ チャイニーズハムスター卵細胞を用いた *in vitro* 染色体異常誘発性試験 (資料 T-24)

試験機関: Hazleton Biotechnologies Co. (オランダ)

(GLP 対応)

報告書作成年: 1986 年

検体の純度:

方法: チャイニーズハムスターの継代培養した卵巣細胞(CHO 細胞)を用いて、代謝非活性化法及び代謝活性化法によってジフルベンズロンの染色体異常誘発性を検討した。

予備試験の結果、代謝非活性化法、代謝活性化法のいずれにおいても、6.7~200 μ g/mL では細胞の生存率に低下がみられなかった。しかし、代謝非活性化法において、200 μ g/mL で細胞分裂の遅延がみられた。

これらの結果から、本試験では、代謝非活性化法、代謝活性化法のいずれも 250、200、150、100 μ g/mL の 4 用量を設定した。

代謝非活性化における被験物質の処理時間は、細胞分裂周期の遅延を考慮して、100 μ g/mL 処理のみ 9 時間とし、他の用量は 16.5 時間とした。また、代謝活性化法では薬物代謝酵素系(S 9Mix)の存在下において、被験物質を 2 時間にわたり処理し、その後被験物質及び S 9Mixを含まない培養液で 9 時間培養した。

培養終了後、細胞浮遊液をスライドグラスに滴化し、ギムザ染色して、各用量当たり 100 個の分裂中期象を観察した。観察は、染色体の異常を、ギャップなど、染色体に生じたもの、染色体型切断結合によるもの、細切粉化したもの、その他に分類し、計数した。

陽性対照は代謝非活性化法では、マイトマイシンC(MMC)を用い、代謝活性化法では、シクロホスファミド(CP)を用いた。また、無処理対照群及び溶媒対照群(DMSO)を設け、それぞれ同様に処理した。これらの処理濃度は結果の表中に示した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

結 果：結果は下表にまとめて示した。

代謝活性化の有無 (+/-)	薬物	濃度	観察細胞数	染色体異常数								細胞当たりの異常数	異常細胞比率 (%)	1個以上の異常を有する細胞の比率 (%)	
				TB	TD	F	TR	SB	AF	R	O				
-	無処理対照	—	100							1			0.010	1.0	0.0
	溶媒対照 DMSO(%)	1	100							1			0.010	1.0	0.0
	ジフルヘンスロン ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	100	200						2				0.010	1.0	0.0
		150	200							1			0.005	0.5	0.0
		200	200			1			1				0.010	1.0	0.0
		250	200	1					1	2	1		0.025	2.0	0.5
	陽性対照 MMC(ng/mL)	500	25	2				2				ID 1	0.200	12.0 \uparrow	4.0
+	無処理対照	—	100					1					0.01	1.0	0.0
	溶媒対照 DMSO(%)	1	100										0.00	0.0	0.0
	ジフルヘンスロン ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	100	200	1						1		MT 1	0.015	1.5	0.0
		150	200	1					1	1		MT 1	0.020	2.0	0.0
		200	200							2			0.020	2.0	0.0
		250	200	1								DM1	0.010	1.0	0.0
	陽性対照 CP(ng/mL)	50	25										0.36	32.0 \uparrow	4.0

χ^2 検定 \uparrow : $p < 0.05$ 、

TB: 染色体切断、TD: 染色体損失、F: フラグメント、TR: 三方体、

SB: 染色体切断、AF: 中心節欠損フラグメント、R: 環状形成、O: その他の変化、MT: 切細変化、DM: 複数の切細変化、ID: 切細染色分体の損失

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

ジフルベンズフロンは、代謝非活性化法、代謝活性化法においても、処理時間、処理濃度にかかわらず、染色体異常発現率を増加させなかった。

一方、陽性対照として用いた MMC あるいは CP では、明らかに染色体異常発現率の増加がみられた。

以上の結果から、チャイニーズハムスター卵細胞を用いた *in vitro* 細胞学的試験におけるジフルベンズフロンの染色体異常誘発能は、代謝非活性化法及び代謝活性化法のいずれにおいても陰性であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

⑤ リンパ腫細胞を用いた前進変異性試験

(資料 T-25)

試験機関: Western Regional Research Center

報告書作成年: 1979 年

検体の純度:

方 法: L5178Y 系マウスのリンパ腫 TK+/- 細胞を用い、Swiss-Webster 系雄マウス肝臓ホモジネートの上清の存在下及び非存在下で変異原性を検定した。TK+/- 変異コロニーを分離するために Trifluorothymidine を培地に加えた。検体の溶媒としては DMSO を用い、暴露時間は非代謝活性化法では 4 時間、代謝活性化法では 2 時間とした。突然変異発現時間は 3 日間とし、その後細胞を軟寒天の平板培地で 10 日間培養した。そして各濃度についてコロニー数と変異コロニー数を計数し、突然変異頻度を求めた。陽性対照としては Ethyl methanesulfonate (EMS) 及び Dimethylnitrosoamine (DMN) を使用した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

結 果:

薬 物	濃 度 ($\mu\text{g/mL}$)	代謝 活性化の 有無	相対浮遊液 生育率(%) ^a	コロニー数/ 100 細胞	変異コロニ ー数/ 10^6 細胞	相対全 生育率(%) ^b	突然変異 頻度 ($\times 10^6$) ^c (注)
対 照 (DMSO)		-	104	85	38	105	45
			98	86	60	99	70
			98	83	56	96	67
ジフルヘンスロン	1.17	-	91	101	61	109	60
			102	76	64	91	84
	4.69	-	103	99	66	120	67
			91	125	78	135	62
	18.75	-	95	70	78	79	111
			88	104	71	108	68
	37.5	-	95	64	66	71	103
			91	74	74	80	100
	75	-	89	66	47	70	71
			86	74	50	76	68
	150	-	83	80	74	79	93
			75	88	53	78	60
	300	-	72	88	76	75	86
			61	70	53	51	76
対 照 (DMSO)		+	100	90	52	100	58
			109	96	41	115	43
			91	85	42	86	49
ジフルヘンスロン	1.17	+	109	103	55	124	53
			109	109	44	131	40
	4.69	+	115	82	46	104	56
			108	84	48	101	57
	18.75	+	112	73	46	90	63
			115	99	46	126	46
	37.5	+	111	83	48	102	58
			103	74	51	84	69
	75	+	112	122	48	151	39
			106	88	50	103	57
	150	+	102	82	34	92	41
			130	87	50	125	57
	300	+	108	98	37	117	38
			108	87	48	104	55
EMS	500	-	83	49	350	48	714
			78	46	348	43	757
			80	51	343	48	673
DMN	3×10^{-4} M	+	37	35	207	14	591
			32	38	226	13	595
			37	32	197	13	616

a: 検体の細胞培養反復数 \div 対照の細胞培養反復数 $\times 100$

b: 相対浮遊液生育率 \times 検体のコロニー数/100 細胞 \div 対照のコロニー数/100 細胞

c: 変異細胞数/mL \div 細胞数/mL $\times 100$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

ジフルベンズロン処理後、代謝活性化の有無にかかわらずコロニー数の減少はみられなかった。また、リンパ腫 TK+/- から TK-/- への前進突然変異頻度の増加も認められなかった。一方、陽性対照として用いた Ethyl methanesulfonate 及び Dimethylnitroso-amine では明らかな前進突然変異頻度の増加を示した。

以上の結果から、ジフルベンズロン原体は代謝活性化を含む本試験条件下で前進変異誘発性は有しないものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

⑥ マウスを用いた小核試験

(資料 T-26)

試験機関:Western Regional Research Center (米国)

報告書作成年:1979 年

検体の純度:

方 法: Swiss-Webster 系マウス(体重 20~30g)を用い、1 群雄 5 匹とした。

投与は屠殺 30 時間前と 6 時間前に行った。検体投与は 15、150、1500mg/kg とし、経口投与した。陰性対照は溶媒のコーン油を経口投与した。陽性対照はトリエチレンメラミン(TEM) 0.25mg/kg を腹腔内注射した。実験は 2 回実施し、実験 1、実験 2 とした。個体ごとの 1000 個の多染性赤血球(PCE)中の小核を有する PCE 数、500 個の正染性赤血球(NCE)中の小核を有する NCE 数を計測し、NCE/PCE も求めた。各群の平均値は、実験 1 と実験 2 の値を合計し、動物数の 10 で除した。

結 果:結果を次頁に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

薬物	動物番号	1000個のPCE中の小核を有するPCE数		500個のNCE中の小核を有するNCE数		NCE数/PCE数	
		実験1	実験2	実験1	実験2	実験1	実験2
対照 コーン油	1	1	0	1	0	0.39	0.47
	2	3	4	1	0	0.45	0.49
	3	0	2	0	0	0.79	0.59
	4	1	5	0	1	0.52	0.74
	5	0	0	1	0	1.60	0.72
	(平均)	1.6		0.4		0.68	
Triethylenemelamine 0.25 mg/kg.i.p.	1	11	26	3	0	0.42	0.50
	2	13	42	0	1	0.36	0.72
	3	39	33	1	1	2.62	0.68
	4	48	24	1	1	1.94	0.83
	5	28	63	0	3	1.01	0.91
	(平均)	33 ↑		1.1		1.00	
ジフルベンズロン 15 mg/kg	1	1	3	2	0	0.30	0.72
	2	1	1	2	1	0.31	0.59
	3	2	1	1	0	0.54	0.51
	4	1	3	1	2	1.18	0.69
	5	1	2	1	1	1.33	0.94
	(平均)	1.6		1.1		0.71	
ジフルベンズロン 150 mg/kg	1	0	1	3	0	0.32	0.46
	2	2	1	0	1	0.28	0.77
	3	2	4	0	1	0.55	0.72
	4	4	2	2	2	0.54	1.07
	5	0	0	0	0	0.55	1.03
	(平均)	1.6		0.9		0.63	
ジフルベンズロン 1500 mg/kg	1	2	3	1	2	0.55	0.50
	2	4	3	2	1	0.58	0.72
	3	1	2	0	1	0.31	0.68
	4	2	4	0	1	0.62	0.83
	5	1	4	0	0	0.79	0.91
	(平均)	2.6		0.8		0.65	

Kruskal Wallice の方法 ↑:p<0.01

検体投与群は小核を有する多染性赤血球数及び正染性赤血球数の頻度において投与量と 관련된増加または対照と比して有意な増加はなかった。一方、陽性対照として用いた Triethylenemelamine では顕著な小核を有する PCE 数の増加がみられた。

以上の結果から、ジフルベンズロン原体のマウスを用いた小核試験での変異原性は陰性であると判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

⑦ 細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 T-27)

試験機関:(財)残留農薬研究所

報告書作成年:1978年

検体の純度:

方法: 枯草菌の組換修復機構保持株(H-17)と欠損株(M-45)を用い、rec-assay法でDNAの損傷の誘発性を検定した。尚、検体による菌株の生育阻止帯が認められない場合は、2000 μ g/disk を最高濃度とした。

結果:

薬物	濃度 (μ g/disk)	阻止域 (mm)		差 (mm)
		M-45	H-17	
対照(DMSO)	—	0	0	0
ジフルベンズロン	20	0	0	0
	100	0	0	0
	200	0	0	0
	500	0	0	0
	1000	0	0	0
	2000	0	0	0
Kanamycin	10	6	4	2
Mitomycin C	0.1	10	1	9

ジフルベンズロン存在下においては、両株に生育阻止を認めなかった。

一方、陽性対照として用いた Mitomycin C では両株の間に顕著な生育阻止の差が生じた。

以上の結果よりジフルベンズロンの DNA 損傷性は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

⑧ ラット初代培養肝細胞を用いた不定期 DNA 合成(UDS)試験

(資料 T-28)

試験機関 : RCC Notox B.V.(オランダ)

[GLP 対応]

報告書作成年: 1990 年

検体の純度:

供試動物 : Wistar 系雄性ラットの初代培養肝細胞

試験方法 : 検体並びに陽性対照の 4-ニトロキノリン-N-オキシド(4-NQO、代謝活性化の非存在下: -S9 mix)及び 7,12-ジメチルベンゾアントラセン(DMBA、代謝活性化の存在下: +S9 mix)は、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した。8~10 週齢のラットから麻醉下で肝臓を摘出し、Hank's 緩衝塩溶液(HBSS)、続いて塩化カルシウムを加えたコラゲナーゼ/HBSS 液を用いて灌流した。その後ペトリ皿中で BSA 液などを処理し、肝細胞浮遊液を調製した。

用量設定根拠:

不定期 DNA 合成試験: カバースリップ上に肝細胞を接種した 90 分後に、検体を 3H-チミジン(10 μ Ci/mL)と共に加えた。陽性及び溶媒対照を含めた全ての用量について、3 連で試験した。細胞を、18 時間にわたって暴露した。暴露後の細胞を HBSS 液を用いて洗浄し、メタノール-酢酸 3:1(v/v)を用いて固定した。

オートラジオグラフィ: 細胞を固定した後、カバースリップを顕微鏡用スライド上にのせた。これらのスライドを、42°Cの Ilford K5D エマルジョン中に浸漬し、室温暗所で 2 時間乾燥した。乾燥後、シリカゲルを敷いた遮光ボックス中に入れた。写真用エマルジョンを、4°Cで 7~14 日間にわたって感光させた。エマルジョンを、15°Cの Kodak D19 現像液中で 4 分間現像し、Milli-RO 水中で洗浄して Kodak 定着液中で 5 分間定着させた。スライドを、水道水で洗浄した後、細胞をヘマトキシリン/アゾプロキシシン染色した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

粒子の計数;検査前に、全てのスライドを無作為にコード化した。カバースリップ上の細胞 50 個について、核の粒子数を計数して平均値及び標準偏差を計算した。種々の濃度の検体で処理した細胞質内の粒子数が対照と差異が無い場合、核内粒子数から細胞質内の粒子数を差し引くことにより、各細胞について補正した核内の粒子数を求めた。

試験の判定基準; 本試験は、以下の基準に適合している場合に適合とした。

- a) バックグラウンド粒子数が、20 個以下であること。
- b) 陽性対照物質では、粒子数が有意に増加すること。
- c) 用量設定範囲には、予備用量設定試験で明らかになった毒性発現濃度が含まれていること。または 5 mg/mL までその範囲が広げられていること、または溶解限度までその範囲が広げられていること。

結 果: 不定期 DNA 修復試験の結果を、次頁以降に示した。

核または細胞質当りの粒子数の増加は、検出されなかった。また、検体のいずれの濃度においても、補正した核の粒子数の増加はみられなかった。

陽性対照物質 DMBA および 4NQO は、核当りの粒子数が有意に 90~134 倍に増加していた。バックグラウンド粒子数は平均当り 20 個以下であった。したがって、試験条件は適切であり、代謝活性化系が適切に機能したと結論できる。

以上の結果から、ジフルベンズロン原体は、ラット肝細胞の初代培養株を用いた本試験条件下において、不定期 DNA 合成を誘発しないと結論される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

1 回目の試験:

試験濃度	核内の粒子 計数値 ^a	細胞質内の粒子 計数値 ^a	補正した核の 粒子計数値	3 反復の平均	相対細胞生存率 (%)	
溶媒対照 (DMSO)	3 ± 2	4 ± 2	0 ± 2	0	100	
	3 ± 2	4 ± 2	0 ± 2			
	3 ± 2	4 ± 2	-1 ± 3			
検 体 μg/mL	1	5 ± 3	6 ± 2	-1 ± 3	-2	116
		4 ± 3	7 ± 2	-2 ± 3		
		4 ± 3	6 ± 2	-2 ± 2		
	3	4 ± 2	7 ± 2	-3 ± 2	-2	81
		4 ± 2	8 ± 2	-3 ± 2		
		5 ± 3	6 ± 2	-1 ± 3		
	10	4 ± 3	5 ± 2	-1 ± 3	-2	76
		5 ± 2	6 ± 2	-2 ± 3		
		4 ± 2	6 ± 2	-2 ± 2		
	33	5 ± 3	6 ± 2	-1 ± 3	-1	57
		4 ± 3	6 ± 2	-1 ± 3		
		3 ± 2	5 ± 2	-2 ± 3		
	100	5 ± 2	6 ± 2	-2 ± 3	-2	27
		5 ± 2	7 ± 3	-2 ± 2		
		5 ± 3	6 ± 2	-1 ± 3		
	333	4 ± 2	5 ± 2	-1 ± 2	-2	36
		5 ± 3	6 ± 2	-2 ± 2		
		5 ± 3	7 ± 2	-2 ± 2		
	1000	計数せず				4
	陽性対照 DMBA 50 μM	93 ± 40	11 ± 4	82 ± 37	101	20
		122 ± 47	14 ± 3	108 ± 44		
		126 ± 46	14 ± 3	112 ± 44		
	陽性対照 4-NQO 10 μM	182 ± 56	16 ± 4	167 ± 53	134	31
		140 ± 56	13 ± 4	127 ± 53		
121 ± 59		12 ± 4	109 ± 56			

^a 各カバースリップについて、50 個の細胞を計数した。

DMBA: 7,12-ジメチルベンゾアントラセン

4-NQO: 4-ニトロキノリン-N-オキシド

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

2 回目の試験:

試験濃度		核内の粒子 計数值 ^a	細胞質内の粒子 計数值 ^a	補正した核の 粒子計数值	3 反復の平均	相対細胞生存率 (%)
溶媒対照 (DMSO)		5 ± 2	8 ± 2	-3 ± 2	-3	100
		5 ± 2	7 ± 2	-2 ± 3		
		3 ± 2	7 ± 2	-4 ± 2		
検体 μg/mL	1	4 ± 2	7 ± 2	-3 ± 2	-2	103
		5 ± 2	6 ± 2	-1 ± 2		
		3 ± 2	7 ± 2	-3 ± 2		
	3	4 ± 2	7 ± 2	-3 ± 2	-3	98
		4 ± 2	7 ± 2	-3 ± 1		
		4 ± 2	6 ± 2	-3 ± 2		
	10	2 ± 2	7 ± 2	-5 ± 3	-4	81
		2 ± 2	6 ± 2	-5 ± 2		
		4 ± 2	7 ± 2	-3 ± 2		
	33	3 ± 2	6 ± 2	-3 ± 3	-4	95
		2 ± 2	7 ± 2	-5 ± 3		
		4 ± 2	7 ± 2	-3 ± 2		
	100	2 ± 2	5 ± 2	-3 ± 2	-3	47
		4 ± 2	7 ± 2	-3 ± 2		
		4 ± 2	8 ± 2	-4 ± 3		
	333	スライド上に細胞がみられなかった			-3	8
		3 ± 2	5 ± 2	-2 ± 2		
		3 ± 2	7 ± 2	-4 ± 2		
陽性対照 DMBA 50 μM		104 ± 55	11 ± 5	94 ± 52	91	41
		76 ± 32 ^b	9 ± 4	67 ± 32		
		126 ± 43	15 ± 3	111 ± 42		
陽性対照 4-NQO 10 μM		139 ± 56	14 ± 3	125 ± 54	90	47
		76 ± 37	12 ± 4	64 ± 34		
		96 ± 44	14 ± 3	82 ± 43		

^a 各カバースリップについて、50 個の細胞を計数した。

^b 37 個の細胞を計数した。

DMBA: 7,12-ジメチルベンゾアントラセン

4-NQO: 4-ニトロキノリン-N-オキシド

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

10) 生体機能影響

生体機能影響試験

(資料 T-29)

試験機関: 三共株式会社中央研究所

報告書作成年: 1979 年

検体の純度:

投与液: ジフルベンズロンは 0.3%CMC 懸濁液とし、対照動物には 0.3%CMC 液のみを投与した。

試験期間: 1978 年 12 月 10 日～27 日

1. マウスの一般症状

供試動物: ddY 系マウス、体重 約 25g、1 群雄 5 匹

方法: 検体の 1000 及び 3000mg/kg を経口投与し、投与直後より 4 時間 Irwin の行動観察表により一般症状を観察、記録した。

結論: 各投与群ともマウスの行動に対し全く影響を及ぼさなかった。

2. マウスの中枢神経系に対する影響

1) チオペンタール麻酔に及ぼす影響

供試動物: ddY 系マウス、体重 約 25g、1 群雄 5 匹

方法: 検体 1000mg/kg を経口投与 60 分後にチオペンタールナトリウム 30mg/kg を静注し、麻酔時間を正向反射の消失を指標として測定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

結 果:

薬 物	麻酔時間($\chi \pm$ 秒)
対 照	205 \pm 10
ジフルベンズロン	206 \pm 7

検体 1000mg/kg の経口投与では、チオペンタール麻酔に影響は及ぼさなかった。

2) 抗電撃痙攣作用

供試動物: ddY 系マウス、体重 約 25g、1 群雄 5 匹

方 法: 検体 1000mg/kg を経口投与 60 分後にマウスの両角膜に銀球電極を接触させ、1000V、12.5mA、0.25 秒の交流電撃を加え、発現する強直性痙攣発現率と致死率を測定した。

結 果:

薬 物	死亡数/痙攣動物数/供試動物数
対 照	1/5/5
ジフルベンズロン	0/5/5

検体 1000mg/kg の経口投与では、抗電撃痙攣作用はみられなかった。

3) 抗レセルピン作用

供試動物: ddY 系マウス、体重 約 25g、1 群雄 5 匹

方 法: 検体 1000mg/kg を経口投与直後にレセルピン 2mg/kg を皮下注射し、以後 90、120 と 180 分後に眼瞼下垂と運動失調症状を 0~3 のスコアで採点し、合計点により比較した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

結 果:

薬 物	合計スコア	抑制率(%)
対 照	27	—
ジフルベンズロン	27	0

$$\text{抑制率} = \frac{\text{ジフルベンズロンの合計スコア} - \text{対照合計スコア}}{\text{対照合計スコア}} \times 100$$

検体 1000mg/kg の経口投与では、抗レセルピン作用はみられなかった。

4) 鎮痛作用

供試動物: ddY 系マウス、体重 約 25g、1 群雄 5 匹

方 法: 酢酸-Writhing 法

検体 1000mg/kg を経口投与 30 分後に 0.6%酢酸 0.2mL/匹を腹腔内に注射し、5 分後から 10 分間の Writhing の回数を測定し、対照群の Writhing 数に対する抑制率を求めた。

結 果:

薬 物	Writhing 抑制率(%)
ジフルベンズロン	0

検体 1000mg/kg の経口投与では、鎮痛作用はみられなかった。

3. イヌの呼吸、循環器系に及ぼす影響

供試動物: Beagle 系雌雄イヌ、体重 8~10kg、3 匹(報告書に雌雄各匹数の記載なし)

方 法: ペントバルビタールナトリウム 30mg/kg の静注により麻酔し、背位固定し、呼吸は気管内カニューレを挿入し、呼吸流量計トランスジューサーを介し、血圧は左股動脈内にカニューレを挿入し、血圧トランスジューサーを介し、心拍数は動脈波によってタコメーターを駆動させ、右頸動脈及び右股動脈血流量は非観血型電磁血流計によりそれぞれ測定し、ポリグラフに同時に記録した。検体 1000mg/kg は予め十二指腸に挿入しておいたカニューレより投与した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

結果: 検体 1000mg/kg の十二指腸投与では、麻酔イヌにおける呼吸、血圧、心拍数、頸動脈血流量及び股動脈血流量に対し全く影響を及ぼさなかった。

4. 自律神経系に及ぼす影響

1) ウサギの摘出回腸の運動に及ぼす影響

供試標本: 体重約 3kg の日本白色種雄ウサギをペントバルビタールナトリウム 30mg/kg で静注麻酔後開腹し、回盲部より約 30cm 上部の回腸を摘出し標本とした。

申請者注: 報告書にウサギの使用匹数の記載なし

方法: 回腸標本は O₂ 95%、CO₂ 5% の混合ガスを通気させ、38°C のタイロード液を満した organ bath 内に懸垂し、自動運動をひずみトランスジューサーを介して記録した。検体は 1 回目に 10⁻⁴g/mL、2 回目に 10⁻³g/mL を bath 内に注入した。

結果: 10⁻⁴g/mL (1 回目) と 10⁻³g/mL (2 回目) の濃度では、ウサギの回腸の自動運動に対し全く影響をおよぼさなかった。

2) モルモットの鎮痙作用

供試標本: 体重約 300g の Hartley 系雌性モルモット 3 匹を用い、頭部強打により致死せしめ、約 2cm の回腸標本を摘出した。

方法: 上記 4-1) の方法と同様に標本の張力を記録した。アセチルコリン (1 × 10⁻⁸g/mL) 及びヒスタミン (1 × 10⁻⁸g/mL) 投与し、その収縮反応を測定した後に洗浄し、検体 1 × 10⁻³g/mL を添加した後再び上記の収縮剤を注入し収縮反応を測定し、各々の収縮抑制率を求めた。

結果:

薬物	抑制率 (%)	
	アセチルコリン	ヒスタミン
ジフルベンズロン	25	20

検体 10⁻³g/mL の濃度ではアセチルコリン、ヒスタミンによる回腸の収縮に対し、有意な抑制作用は示さなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

5. マウスの泌尿器系に及ぼす影響

供試動物: ddY 系マウス、体重 約 25g、1 群雄 5 匹

方 法: 検体 1000mg/kg(0.3mL/10g 体重)を経口投与後 1 群(5 匹)をデシケーター内の 濾紙上におき 2 時間放置し、濾紙の重量の増加より尿量を測定し、Na⁺、K⁺は濾紙を蒸留水に浸漬させ、溶出させた後蛍光光度計によって測定した。

結 果:

薬 物	尿 量	Na ⁺ 排泄	K ⁺ 排泄
対 照	2.9g	467 μ Eq	352 μ Eq
ジフルベンズロン	2.3g	376 μ Eq	285 μ Eq

検体 1000mg/kg の経口投与では尿排泄量、Na⁺、K⁺排泄量に有意な影響はなかった。

6. ラットの消化器系に及ぼす影響 (胃液分泌量に及ぼす影響)

供試動物: Donryu 系ラット、体重 約 200g、1 群雄 5 匹

方 法: Shay 法

48 時間絶食後エーテル麻酔下を開腹し、幽門輪部を結紮直後に検体 1000mg/kg を十二指腸内に投与した。再び閉腹し、4 時間後エーテルによる深麻酔で致死させ、胃液を採取し、胃液量を測定した。

結 果:

薬 物	胃 液 量 (mL/100g/4hr)
対 照	3.3 \pm 0.2
ジフルベンズロン	2.9 \pm 0.2 ($p > 0.05$)

検体 1000mg/kg の十二指腸内投与では、胃液分泌量に有意な影響はみられなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

7. モルモットの体性神経系に及ぼす影響（局所麻酔作用）

供試標本：Hartley系モルモット、体重約300g、1群雄5匹

方法：角膜刺激法検体投与前に片方の眼の中心部及び周囲4カ所(計5カ所)の角膜に1/2注射針のマンドリンを垂直に当て一定の強さの刺激を与えて確実に角膜反射(瞬目反応)を示す動物のみを試験に供した。検体の1%液0.1mLを眼結膜嚢内に滴下し、5、10、20及び30分後に上記5カ所の角膜刺激を行い、3カ所以上角膜反射が消失した場所を局所麻酔作用ありと判定する。

結果：

薬物	局所陽性動物/使用動物			
	5分	10分	20分	30分
対照	0/5	0/5	0/5	0/5
ジフルベンズロン	0/5	0/5	0/5	0/5

検体1%液の眼粘膜嚢内投与では、角膜の局所麻酔作用は認められなかった。

8. ラットのカラゲニン浮腫に及ぼす影響

供試動物：Wistar一今道系ラット、体重約150g、1群雄5匹

方法：検体は1000mg/kgを経口投与30分後に、カラゲニンの1%懸濁液0.05mL/ラットを足蹠裏に皮下注射して浮腫をおこさせた。カラゲニン注射前と3時間後に足蹠の体積を測定し、その差を浮腫強度とし、対照群の浮腫強度に対する抑制率を測定した。

結果：

薬物	浮腫強度(mL)	抑制率(%)	有意差
対照	0.71±0.04	—	
ジフルベンズロン	0.59±0.03	17	p>0.05

検体1000mg/kgの経口投与によりラット足蹠のカラゲニン浮腫に対して有意な影響はみられなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネショウ株式会社にある。

以上の結果から、ジフルベンズロン 1000mg/kg の経口または十二指腸内投与及び *in vitro* でのそれぞれの対応量の投与により一般症状、中枢神経系、呼吸・循環器系、自律神経系、泌尿器系、消化器系、体性神経系、カラゲニン浮腫に何らの影響は与えなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアグロカネシヨウ株式会社にある。

ジフルベンズロンの「生体機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

試験項目	供試動物	動物数	投与経路(溶媒)	投与量(mg/kg)	最小影響量(mg/kg)	無毒性量(mg/kg)	結果の概要
一般症状	マウス	♂5	経口	1000、3000	>3000	3000	影響なし
麻酔時間	マウス	♂5	経口	1000	>1000	1000	影響なし
抗痙攣	マウス	♂5	経口	1000	>1000	1000	影響なし
抗レセルピン作用	マウス	♂5	経口	1000	>1000	1000	影響なし
鎮痛作用	マウス	♂5	経口	1000	>1000	1000	影響なし
呼吸循環器系	イヌ	3	腸管内投与	1000	>1000	1000	影響なし
摘出回腸(自動運動)	ウサギ		<i>In vitro</i>	10^{-3} 、 10^{-4} g/mL	$>10^{-3}$ g/mL	10^{-3} g/mL	影響なし
摘出回腸(鎮痙作用)	モルモット	♀3	<i>In vitro</i>	10^{-3} g/mL	$>10^{-3}$ g/mL	10^{-3} g/mL	影響なし
尿排泄	マウス	♂5	経口	1000	>1000	1000	影響なし
胃液分泌	ラット	♂5	経口	1000	>1000	1000	影響なし
局所麻酔	モルモット	♂5	経口	0.1%溶液 0.1mL	>0.1%溶液 0.1mL	0.1%溶液 0.1mL	影響なし
カラゲニン浮腫	ラット	♂5	経口	1000	>1000	1000	影響なし