

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Dithianon

1-9-1-2 イヌを用いた1年間反復混餌投与毒性試験

(資料 12)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1991 年

検体純度:

供試動物: 純系ビーグル種、1 群雌雄各 4 匹、4~6 カ月齢、

体重範囲 雄 5.60~8.80kg 雌 5.45~8.60kg

試験期間: 52 週間(1987 年 10 月 6 日~1988 年 10 月 6 日)

投与方法: 検体を 0、40、200 及び 1000ppm の濃度で飼料に混入し、52 週間にわたって随時摂食させた。検体を混入した飼料は 1 週間に 1 回調製した。

用量設定根拠:

同研究所で実施した予備試験により、1000ppm 以上の用量で飼料摂取量の顕著な減少を生じたことから、1000ppm を最大耐量と判断し、これを高用量とした。

観察・検査項目及び結果:

一般状態及び死亡率: 一般状態及び生死を毎日観察した。

投与期間中、検体投与に関連する症状及び死亡動物はみられなかった。

体重変化: 全動物について毎週 1 回体重を測定した。

投与期間中、検体投与に関連する体重の増減はみられなかった。

摂餌量: 全動物の摂餌量を毎日測定した。

摂餌量(g/動物/週)の対照群に対する比率を次表に示す。

性別	雄			雌		
投与量 (ppm)	40	200	1000	40	200	1000
投与 1-13 週	96	96	87DR ↓	95	96	92
投与 14-26 週	96	95	93	108	102	94
投与 27-52 週	93	89	93	101	96	91

統計学的手法: 用量反応検定 DR ↓: $p \leq 0.05$ 矢印のない数値は有意差なし。
表中の数値は、実験の目安として対照群を 100 とした場合の値を表した。

1000ppm 群において、雄では投与開始から 13 週間、対照群に比し減少傾向がみられた。雌では有意ではないが全投与期間減少傾向が見られた。

検体摂取量: 投与期間中の検体摂取量(mg/kg/日)は以下のとおりであった。

投与量 (ppm)		40	200	1000
検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	1.5	6.7	28.3
	雌	1.6	7.6	35.0

注) 週毎の平均検体摂取量より、申請者が計算して求めた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Dithiazon

血液学的検査：投与開始前、13、26 及び 52 週時に全動物について絶食約 18 時間後に頸静脈から採血し、以下の項目について検査した。

血色素量(Hb)、平均赤血球容積(MCV)、赤血球数(RBC)、平均赤血球血色素量(MCHC)、平均赤血球血色素濃度、ヘマトクリット値(PCV)、総白血球数(WBC)、白血球像、好中球(N)、リンパ球(L)、血小板数(PLAT)

対照群と比べ、統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

性別	雄					雌				
	投与量 (ppm)	40	200	1000		40	200	1000		
検査時期(週)			13	26	52		52	13	26	52
ヘモグロビン量			93	88↓	91			82 ^o	85↓	80↓
赤血球数			91	88↓	90↓		94↓	84↓	86↓	82↓
ヘマトクリット値			94	90↓	93			85↓	88↓	83↓
平均赤血球容積			DR↑							
平均赤血球血色素濃度				98↓				96↓	97↓	96↓
白血球数				DR↑	DR↑				DR↑	
好中球数					158↑				151↑	
リンパ球数					DR↑				144↑	
血小板数			134	139	143			122	132	122

統計学的手法：Dunnett 検定(両側) ††：p≤0.05、†††：p≤0.01、††††：p≤0.001

DR：用量反応検定(最高用量の欄に記載した)。

矢印のない数値は有意差なし。

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。

1000ppm 群の雌雄において、試験期間中ヘモグロビン、赤血球、ヘマトクリット及び平均赤血球血色素濃度の有意な減少/減少傾向がみられ、貧血の程度は雌がより強かった。有意差はないが、血小板の増加傾向も認められた。また 52 週時には、雌雄各 4 例中 3 例に標的赤血球が観察された。1000ppm 群の雌雄における白血球の有意(用量反応検定)な増加は、好中球及びリンパ球の有意な増加に関連していたが、それらの差異は小さく、生物学的に意義があるとは考えられない。

52 週時には 200ppm 群の雌に赤血球の減少がみられた。

血液生化学的検査：投与開始前、26 及び 52 週時に、全動物の頸静脈から絶食約 18 時間後に採取した血漿について以下の項目について検査した。

グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)、アルカリホスファターゼ(AIP)、クレアチニンホスホキナーゼ)、γ-グルタミルトランスフェラーゼ、ナトリウム(Na)、カリウム(K)、塩素、カルシウム、無機リン、血糖、尿素窒素(BUN)、総ビリルビン、クレアチニン(Creat)、総蛋白(T Prot)、アルブミン(Alb)、アルブミン/グロブリン比、総コレステロール

検体投与に関連した変化として、1000ppm 群の雌雄における尿素窒素、クレアチニン及びカリウムの減少、ならびに 1000ppm 群の雌におけるアルカリホスファターゼ(AIP)の増加がみられた。また、200ppm 群の雌でもクレアチニンの軽度の減少がみられた。その他に統計学的に有意差はなかったが、1000ppm 群の雄 2 例と雌 3 例で GPT 値の増

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

011111111111

加が、また雌 1 例に GOT とコレステロール値の増加がみられた。これらも肝臓に対する検体投与の影響と考えられた。

その他にみられた変化は生物学的に意義があるものとは考えられなかった。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

性別	雄				雌			
	40	200	1000		200		1000	
投与量 (ppm)	40	200	1000		200		1000	
検査時期 (週)	52	26	26	52	26	52	26	52
AIP		DR↑		DR*			214↑	180↑
尿素窒素			75↓				61*	69*
クレアチン	90*		80↓	80*		90↓	80*	80*
総蛋白		109↑						
アルブミン				DR↑				
ナトリウム					103↑		103↑	
カリウム			89↓				DR↓	

統計学的手法：Dunnett 検定 (両側)、Kruskal-Wallis 及び Wilcoxon 順位検定

↑：p ≤ 0.05、↓：p ≤ 0.01、**：p ≤ 0.001

DR：用量反応検定 (最高用量の欄に記載した)。

矢印のない数値は有意差なし。

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。

尿検査：投与開始前、13、26 及び 52 週時に全ての動物から、直接膀胱内にカテーテルを挿入して採尿し、以下の項目について検査した。

色調、比重、pH、蛋白、ブドウ糖、ケトン体、総ビリルビン、潜血、ウルビリノーゲン、尿沈渣

潜血が 26 週時に 1000ppm 群の雌 3 例、200ppm 群の雌 2 例 (対照群は 0 例)、また 52 週時に 1000ppm 群の雌 3 例 (対照群は 1 例) で認められた。これは検体投与の可能性も考えられた。

眼科学的検査：投与前、試験 13 及び 52 週に全例について検査した。

検体投与に起因する病変は認められなかった。

臓器重量：試験終了時に全生存動物について剖検を行い、次の臓器の重量を測定し、対体重比も算出した。

副腎、脳、肝臓、腎臓、卵巣/精巣及び精巣上体、甲状腺 (上皮小体を含む)

対照群と比べ、統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

1000ppm 群の雌雄において、肝臓及び腎臓の重量の増加がみられた。甲状腺は雌で用量反応性のある増加がみられたが、有意差はみられなかった。200ppm 群雌の肝臓及び腎臓とも有意差はなかったが、増加傾向にあった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

性 別		雄			雌			
投与量 (ppm)		40	200	1000	40	200	1000	
体 重		94	104	93	99	94	102	
腎 臓	左	重量		123		106	136 DR†	
		対体重比		133 ^o		112	135†	
	右	重量		126		105	127 DR†	
		対体重比		136 ^o		111	126†	
肝 臓	重量			141	116	120	168 DR†	
	対体重比		101	149†	117	127	164†	
甲 状 腺	左	重量					146	
		対体重比						138 DR†
	右	重量						137
		対体重比						134 DR†

統計学的手法：Dunnnett 検定(両側)、Kruskal-Wallis 及び Wilcoxon 順位和検定

††：p≤0.05、†††：p≤0.01、^o：p≤0.001

DR：用量反応検定(最高用量の欄に記載した)。

矢印のない数値は有意差なし。

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。

肉眼病理学的検査：試験終了時に全生存動物(各群雌雄それぞれ 4 例)について、剖検を行い肉眼的に検査した。

いずれの動物においても検体投与の影響と思われる所見はみられなかった。

病理組織学的検査：肉眼病理学的検査を実施した個体について以下の組織について病理組織標本を作製し、検鏡した。

全ての肉眼的異常部位、脳(脳幹を含む)、脊髄(腰部、頸部と中胸部)、下垂体、甲状腺(上皮小体を含む)、胸腺、気管、肺(主気管支を含む)、心臓、大動脈(弓と前腹壁)、唾液腺(下顎腺、舌下腺)、肝臓、胆嚢、脾臓、腎臓、副腎、膵臓、精巣/卵巣、子宮(体部と頸部)、精巣上体、前立腺、皮膚と乳腺(雌のみ)、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、リンパ節(下顎と腸間膜)、骨格筋(大腿四頭筋)、坐骨神経、胸骨(骨髄を含む)、大腿骨(関節面を含む)、眼球(視神経)

対照群と比べ、統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

検体投与の影響として 1000ppm 群の雌雄及び 200ppm 群の雌において、腎臓の色索沈着の増加と肝臓の肝細胞肥大がみられた。これらは両臓器における重量増加と併せて代謝活性の亢進を反映したもの、いわゆる適応性変化と考えられた。さらに 1000ppm 群の雌雄全例の肝臓において組織球内色素沈着と肝細胞核内封入体が認められた。組織球内色素は鉄染色陽性であることから、溶血の可能性が示唆された。しかし、これに対応する変化が脾臓及び骨髄にも確認できなかった。一方核内封入体の意義は不明であった。これらの変化も検体投与に関連して生じたものと考えられた。

リンパ球性甲状腺炎は甲状腺の重量増加に関連していたが、用量反応性がみられないこと、及びビーグル犬の背景データとしても知られていることから、検体投与に関連した病変とは考えられなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

主要な病理組織学的所見を以下に示す

性 別			雄				雌			
投与量 (ppm)			0	40	200	1000	0	40	200	1000
検査動物数			4	4	4	4	4	4	4	4
臓器	所見	程度								
腎臓	尿管色素沈着	なし	0	1	0	0	3	3	1	0
		軽微	4	3	4	1	1	1	3	2
		軽度	0	0	0	3	0	0	0	2
肝臓	組織球内色素沈着	なし	4	4	4	1	4	4	4	1
		軽微	0	0	0	1	0	0	0	1
		軽度	0	0	0	2	0	0	0	1
	肝細胞肥大	なし	4	4	4	0	4	4	0	0
		軽微	0	0	0	0	0	0	4	0
		軽度	0	0	0	4	0	0	0	3
		中～重度	0	0	0	0	0	0	0	1
核内封入体	あり	0	0	0	4	0	0	0	4	
甲状腺	リンパ球性甲状腺炎	なし	4	4	4	3	4	3	4	2
		中～重度	0	0	0	1	0	0	0	2

以上の結果から、本剤のイヌに対する1年間反復経口投与による影響として、1000ppm群の雌雄で摂餌量の減少傾向、貧血(ヘマトクリット、ヘモグロビン、赤血球数、MCHCの減少)、血小板の増加、尿素窒素、クレアチニン及びカリウムの減少、GPT値の増加が雄2/4例と雌3/4例でみられた。肝臓の肝細胞肥大を伴う肝重量の増加と尿管色素沈着を伴う腎重量の増加がみられた。また、雌ではアルカリホスファターゼの増加もみられた。

200ppm群では雌で赤血球数の減少、肝臓の肝細胞肥大を伴う肝重量及び尿管色素沈着を伴う腎重量の増加傾向がみられた。

従って本試験における無毒性量は雄で200ppm(6.7mg/kg/日)、雌で40ppm(1.6mg/kg/日)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 BASF ジャパン株式会社にある。

Date: 2003

1-9-2 ラットを用いた慢性毒性/発がん性試験

評価対象試験からの除外依頼 (資料 13)

ラットに対する慢性毒性試験は、最初の試験がハンティンドン リサーチ センター(1969)で実施され、その結果の抄録(1-8-2-1; 資料 13)を次頁以降に記載したが、以下の理由で評価の対照から除外していただきたい。1991 年に GLP 対応試験をヘーゼルトンラボラトリーズ(1-8-2-2; 資料 14)で再実施しているため、ラットに対する長期毒性試験は資料 14 で評価していただきたい。

評価対象から除外する理由

- 1) 動物数: 24 ヶ月後最終屠殺用の動物数が雌雄各 25 匹、中間屠殺用として 26 週時及び 52 週時とも雌雄各 5 匹が割付けられた。いずれも動物数が少ない。
- 2) 高用量群は一般状態不良のため全生存動物を雄は試験 88 週、雌は試験 96 週に屠殺した。
- 3) 臨床検査: 血液に関する検査が 52 週時に、対照群と高用量群のみである。その他の検査時期でも通常の全検査項目及び全試験群について検査されていない。
- 4) 組織学的検査: 最終屠殺動物は肉眼的に検査し、異常の認められた組織についてのみ組織学的に検査されており、高用量群の全組織が検査されていない。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

in thiazon

1-9-2-1 ラットを用いた 24 ヶ月混餌投与慢性毒性試験(評価対象から除外する成績)(資料 13)

試験機関:

報告書作成年: 1969 年

検体の純度:

試験動物: チャールズリバーCD系ラット、1群雌雄各35匹、開始時体重: 雄119~121g、雌116~117g、投与後26及び52週時に各群雌雄各5匹を中間屠殺した。

なお、1000ppm群は一般状態不良のため、全生存動物を雄は試験88週、雌は試験96週に屠殺した。

試験期間: 24ヵ月(1966年9月26日~1968年9月)

投与方法: 検体を0、20、200及び1000(但し、1~4週までは500ppm)の濃度で飼料に混入して、24ヵ月間にわたって自由摂取させた。対照群には基礎飼料のみを投与した。検体を混入した飼料は毎週調製した。

用量設定根拠: 投与量は、0、315、1250及び5000ppmを混入した飼料を4週間投与して行った予備試験で、315ppm群では何ら影響が認められなかったが、1250ppm群では摂餌量及び体重の減少が認められ、5000ppm群ではほとんどのラットが死亡したので、1000ppmを最高投与量とし、喫食性を考慮して、投与開始後の4週間はその半量の500ppmを投与した。

試験項目及び結果:

一般状態及び死亡率: 一般状態及び生死を毎日観察した。

投与開始後初期から13週間にわたって、被毛の黄変が200及び1000ppm群の雌雄で認められたが、26週までに1000ppm群の雌を除いて消失した。1000ppm群の雌でも徐々に軽減し、試験終了時にはかすかな斑状となった。

試験終了時の死亡率は次表の通りである。

投与量(ppm)		0	20	200	1000*
死亡率(%)	雄	64	68	64	72
	雌	64	52	60	60

* 雄は試験88週、雌は試験96週までの死亡率。

200ppmまでは検体投与による影響はなかったが、1000ppm群は一般状態不良のため全生存動物を雄は試験88週、雌は試験96週に屠殺した。

体重変化: 投与開始時及びその後は毎週1回、全ての生存動物の体重を測定した。

群平均体重の対照群に対する変動率を次表に示す。

200ppm群では、投与期間中、雌の体重増加が抑制され、1000ppm群では雌雄とも体重増加が抑制された。20ppm群雄の体重は増加した。

性別	雄			雌		
	投与量 (ppm)	20	200	1000	20	200
26 週	110	102	93	101	96	81
52 週	111	99	91	98	90	71
87 週	112	99	90	99	88	64
95 週	117	98	-	100	88	70
103 週	118	96	-	106	89	-

- : 全例屠殺のためデータなし。

表中の数値は対照群に対する変動率(%)を示す。

摂餌量及び食餌効率；全動物の摂餌量(g/ラット/週)を週 1 回測定し、食餌効率(飼料 g/体重増加 g)も算出した。

総摂餌量及び食餌効率を次表に示す。

性別	雄			雌			
	投与量 (ppm)	20	200	1000	20	200	1000
総摂餌量*		103	98	94	101	96	83
食餌効率	4 週時	107	110	98	74	89	95
	2 ヶ月目	89	98	116	104	110	144
	1-6 ヶ月平均	94	99	104	100	105	121
	1-12 ヶ月平均	94	102	106	102	111	139

* 雄は試験 88 週、雌は試験 96 週までの平均値。

摂餌量は 200ppm 群の雌及び 1000ppm 群の雌雄で減少が認められた。

食餌効率は試験開始後、最初の 1 ヶ月間は群間に大きな差はみられなかったが、特に、1000ppm 群の雌では 5 週目から 500ppm を 1000ppm に増量した後、低下した。200ppm 群の雌でも軽度であるが低下した。これらは摂餌量の低下及び体重増加の抑制に関連していた。

飲水量； 投与開始後 10、39、51 及び 84 週時に 1 週間の飲水量を測定した。

次表に飲水量 (mL/kg 体重/週) を示す。

性別	雄			雌		
	投与量 (ppm)	20	200	1000	20	200
39 週	92	102	115	111	130	174
51 週	96	105	128	101	129	169
84 週	76	98	111	103	104	149

表中の数値は対照群に対する変動率(%)を示す。

200ppm 群の雌で 39 及び 51 週時に増加が認められ、1000ppm 群の雌雄では 39、51 及び 84 週時に増加が認められた。

血液学的検査； 0、4、13、20、26、52 及び 78 週時に対照群及び 1000ppm 群の雌雄各 10 匹の眼窩静脈叢から採取し、以下の項目について検査した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

ヘマトクリット値(PCV)、ヘモグロビン量(Hb)、赤血球数、白血球数、白血球百分比、平均赤血球色素濃度(MCHC)及び平均赤血球容積(MCV)

また、26週時には200ppm群、78週時には20及び200ppm群の白血球を除く項目を、92週時には対照群及び1000ppm群の雌について、さらに103週時には対照群、20及び200ppm群について上記の全項目を測定した。

統計学的に有意差の見られた項目を次頁表に示す。

検査時期	性別	雄			雌		
	投与量(ppm)	20	200	1000	20	200	1000
13週	PCV	—	—	91 [↓]	—	—	100
	Hb	—	—	86 [○]	—	—	92 [○]
	赤血球	—	—	96	—	—	94 [↓]
20週	PCV	—	—	93 [↓]	—	—	98
	Hb	—	—	83	—	—	79 [○]
26週	Hb	—	—	93 [↓]	—	—	97
52週	PCV	—	—	93	—	—	91 [○]
	MCV	—	—	92 [↓]	—	—	96
78週	PCV	—	87 [↓]	89 [↓]	—	—	87 [○]
	Hb	—	—	86 [↓]	—	—	90
	赤血球	—	84 [↓]	100	—	—	90
	MCV	—	—	88 [○]	—	—	96

統計学的手法：t-検定：↓：p<0.05、↓：p<0.01、○：p<0.001 矢印のない数値は有意差なし。
—：検査せず。

200ppm群の雄で78週時にヘマトクリット値及び赤血球数の減少が認められた。1000ppm群の雌雄では、13週から78週時にかけて、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数、平均赤血球容積の減少が認められ、小球性貧血であることを示していた。92週(1000ppm群雌)及び103週時の検査では有意な差は認められなかった。

血液生化学的検査：投与後26、52及び84週時に対照群及び1000ppm群の雌雄各5匹の眼窩静脈叢から採取した血液から血清を分離して、以下の項目について検査した。

尿素、総還元物質(26及び52週)、グルコース(52週以降)、アルカリホスファターゼ(SAP)、GPT、ナトリウム、カリウム、総蛋白、蛋白分画及びA/G比

また、52週時には200ppm群の雄について、総蛋白及び蛋白分画を測定し、92週時には対照群及び1000ppm群の雌について、また103週時には対照群、20及び200ppm群の雌雄について全項目を測定した。

統計学的に有意差の見られた項目を次表に示す。

検査時期	性別	雄			雌		
	投与量(ppm)	20	200	1000	20	200	1000
26週	総蛋白	—	—	111 [○]	—	—	—
52週	総蛋白	—	1041	109 [○]	—	—	120 [○]
	アルブミン	—	—	—	—	—	125 [↑]
84週	総蛋白	—	—	—	—	—	118 [↑]
	アルブミン	—	—	—	—	—	125 [↑]

統計学的手法：t-検定：↑：p<0.05、↑：p<0.01、○：p<0.001 —：検査せず。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Beluzon

200ppm 群の雄で 52 週時に総蛋白の増加が認められたが、その変化は小さく、生理学的意義はないと考えられた。1000ppm 群の雄では 26 及び 52 週で、雌では 52 及び 84 週で総蛋白の増加が認められ、雌ではアルブミンの増加も認められた。

尿検査： 投与開始後 4、13、26、52、77 及び 83 週時に全群の雌雄、93 週時には対照群及び 1000ppm 群の雌及び 103 週時には 1000ppm 群を除く全群の雌雄各 10 匹から尿を採取し、以下の項目について検査した。

外観、pH、比重、蛋白、還元物質、グルコース、ケトン体、胆汁色素、胆汁酸塩、ウロビリリン及び沈渣

尿量が 1000ppm 群雄では 77 週まで、雌では 52 週まで多い傾向にあったが、その後認められなくなった。蛋白尿が 52 週以降 1000ppm 群で多いようであった。しかし、腎の尿濃縮機能に影響はなかった。

性別	雄				雌				
	投与量 (ppm)	0	20	200	1000	0	20	200	1000
尿量 (mL/kg)	13 週	6.3	7.1	7.8	10.5	5.0	5.7	6.4	8.8
	26 週	5.8	5.2	7.8	6.7	3.7	3.0	4.7	6.6
	52 週	11.9	12.9	13.0	19.0	9.7	6.8	9.9	12.1
	77 週	6.4	9.9	8.0	13.6	10.0	6.6	5.9	10.3
	83 週	11.8	7.2	13.5	9.2	10.5	6.2	7.1	8.4
	93 週	-	-	-	*	11.6	-	-	11.5
	103 週	13.1	15.8	23.8	*	13.5	17.5	18.5	*
蛋白 (mg%)	13 週	200	200	200	200	10	30	10	40
	26 週	500	300	500	500	450	100	200	300
	52 週	100	1000	1000	1000	400	500	1000	1500
	77 週	400	1000	1000	1000	300	900	1000	1000
	83 週	1000	900	900	2000	500	500	1000	1000
	93 週	-	-	-	*	600	-	-	1000
	103 週	600	500	500	*	400	500	600	*

- : 検査せず。 * : 屠殺のため該当なし。

また、78 週時には対照群及び 1000ppm 群の雌雄各 10 匹を対象にして、8 時間絶水後、一夜尿を採取し、遠沈後の上清の比重及び蛋白濃度を測定し、沈渣を検鏡して腎の尿濃縮機能について検査した。

影響があったと考えられる結果を次表に示す。

性別	雄				雌				
	投与量 (ppm)	0	20	200	1000	0	20	200	1000
尿量 (mL/kg)	78 週	8.02	-	-	9.59	5.94	-	-	9.80
蛋白 (mg/100mL)	78 週	1410	-	-	990	465	-	-	2410

- : 検査せず。

1000ppm 群雄で多尿症及び蛋白尿症がみられた。比重に差はなかった。雌雄の腎濃縮能に対照群との差は認められなかった。

臓器重量： 投与開始後 26 及び 52 週時に、各群雌雄各 5 匹及び試験終了時の全生存動物を対象として、以下の臓器重量を測定した。又、対体重比も算出した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Dithiane

心、肝、腎、副腎、卵巣、脾、精巣、甲状腺、子宮、脳(固定後)、下垂体(固定後)

統計学的な有意差が見られた検査項目を次表に示した。

検査 時期	性別	雄			雌			
		投与量 (ppm)	20	200	1000	20	200	1000
26 週 層 殺	肝 重量 対体重比			126			122	
				135 [↑]			133 [○]	
	腎 重量 対体重比			123 [↑]			124 [↑]	
				134 [↑]			136 [○]	
	精巣 重量 対体重比			108 [↑]	112 [↑]	—	—	—
				106	122 [↑]			
52 週 層 殺	肝 重量 対体重比			135 [↑]		123	119	
				132 [↑]		131 [↑]	162 [○]	
	腎 重量 対体重比			125		124	141 [↑]	
				121		134 [↑]	197 [○]	
	副腎 重量 対体重比			116			118	
				115			163 [↑]	
	甲状腺 重量 対体重比	153 [○]		153 [○]				
		127		151 [↑]				
最 終 層 殺	肝 重量 対体重比			—			—	
	脾 重量 対体重比	156 [↑]		—			—	
	甲状腺 重量 対体重比	131		—			—	

統計学的手法：t-検定：↑；p<0.05、↑↑；p<0.01、↑↑↑；p<0.001 矢印のない数値は有意差なし。
数値は対照群の値を100としたときの百分率(%)

1000ppm 群雌雄で肝臓、腎臓重量の増加/増加傾向が、26 及び 52 週時に、肝臓は重大がみられた。精巣重量は 26 週時のみ、副腎重量(対体重比)は 52 週時に雌のみ増加がみられた。200ppm 群雌では肝臓重量の増加が 52 週時にみられた。同群雄の精巣重量の増加が 26 週時のみみられたが、その後みられないことから検体投与の影響と考えられなかった。又、甲状腺の重量増加が 20 及び 1000ppm 群の雄で 52 週時のみにみられたが、用量関連性もないので、検体投与の影響と考えられなかった。

肉眼的病理検査：上記の臓器重量測定動物を対象として、肉眼的病理検査を実施した。

対照群及び検体投与群の全動物において、検体投与に関連した肉眼的病変は認められなかった。

病理組織学的検査：投与開始後 26 及び 52 週時の対照群及び 1000ppm 群の中間層殺動物、試験終了時の対照群及び 1000ppm 群の動物及び途中死亡全動物を対象として、以下の臓器/組織の標本を作製してヘマトキシリン・エオジン染色、さらに、腎臓&肝臓についてはオイル赤 O 染色を行ない、鏡検した。

副腎、大動脈、脳、盲腸、結腸、十二指腸、眼、大腿骨(骨髄)、心、回腸、腎、肝、肺、リンパ節(頸部及び腸間膜)、食道、卵巣、脾、下垂体、前立腺、唾液腺、坐骨神経、精囊、骨格筋、皮膚、脾、胃、精巣、胸腺、甲状腺、舌、膀胱、子宮

非腫瘍性病変：主要な非腫瘍性病変は次頁の表の通りであった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Reference

対照群を含め各群の動物で、慢性間質性肺炎、肝細胞の空胞化/脂肪沈着(多くは小葉中心性)及び炎症性細胞浸潤、慢性膵炎、心筋変性及び線維症、糸球体腎炎、腎尿管拡張などの病変が多発したが、いずれも加齢に伴う変化であり、中間層殺を含め、検体投与に起因するものではないと考えられた。

検査時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	20	200	1000	0	20	200	1000
26週層殺	検査動物数		5	0	0	5	5	0	0	5
	肺	慢性間質性肺炎	4			3	5			1
		袖口様リンパ球集合	1			2	0			4
	肝	細胞空胞化	4			0	1			0
		脂肪沈着	5			1	1			0
		炎症性細胞浸潤	2			3	2			3
52週層殺	検査動物数		5	0	0	5	5	0	0	5
	肺	慢性間質性肺炎	5			5	5			5
		袖口様リンパ球集合	0			2	0			0
	肝	細胞空胞化	2			2	2			2
		脂肪沈着	5			5	4			3
		炎症性細胞浸潤	2			4	2			3
		間質細胞肥大	1			0	2			2
		胆管重積	0			1	2			1
	膵	慢性膵炎	1			4	0			3
	腎	細管萎縮	2			2	1			0
糸球体腎炎		1			3	0			0	
途中死亡	検査動物数		12	11	13	13	10	10	11	10
	心	心筋変性	2	5	5	3	1	2	2	0
		心筋線維症	1	3	7	5	1	4	0	4
	肺	慢性間質性肺炎	5	6	6	9	8	6	4	8
		リンパ球浸潤	4	9	5	5	5	4	5	8
	肝	細胞空胞化	5	7	2	1	6	1	4	4
		脂肪沈着	6	5	3	3	9	3	4	4
		リンパ球浸潤	3	3	1	7	3	1	1	2
	膵	脂肪細胞増加	1	4	3	0	1	1	0	1
		慢性膵炎	1	1	3	2	0	0	0	2
	腎	糸球体腎炎	1	2	3	5	0	1	3	4
細管拡張		5	4	2	5	4	5	3	2	
間質リンパ球浸潤		0	0	1	3	2	1	2	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 BASF ジャパン株式会社にある。

Discussion

検査時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	20	200	1000	0	20	200	1000
	検査動物数		9	0	0	7	9	0	0	10
最終層級	心	心筋変性	6			5	7			5
		心筋線維症	5			0	1			1
	肺	慢性間質性肺炎	5			7	8			10
		袖口様リンパ球集合	7			7	9			9
	肝	細胞空胞化	3			3	4			5
		脂肪沈着	3			5	2			4
		リンパ球浸潤	2			6	2			2
		胆管重積	1			2	0			0
	脾	脂肪細胞増加	4			4	0			2
		動脈炎	2			1	0			0
		慢性脾炎	0			1	0			1
		脾島老年性過形成	2			1	0			0
	腎	糸球体腎炎	6			2	2			5
		細管拡張	2			4	6			3
		間質リンパ球浸潤	2			5	2			1
	副腎	皮質出血/変性	0			0	8			3

腫瘍性病変：腫瘍性病変の発現頻度を次頁以下の表に示す。

腫瘍性病変としては、下垂体腺腫、乳腺腺腫、甲状腺の腺腫が本系統においては高かった。しかし、検体投与に関連した発生率の上昇及び早期化はなかった。

検査動物数 ²⁾	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	20	200	1000	0	20	200	1000
途中死亡 ¹⁾	検査動物数 ²⁾		16	17	17	18	16	13	15	15
腎臓	線維肉腫 M									1
	脂肪腫							1		
	移行上皮癌 M			1						
副腎	皮質腺腫									1
リンパ組織	リンパ細胞腫瘍 M	1	1	1						
卵巣	腺腫						1			
子宮	線維肉腫 M						1			
膀胱	乳頭腫									1
結合組織	線維腫	1								
	粘液線維腫	1								
	線維肉腫 M	1		1	1				1	1
皮膚	角化棘細胞腫		1							
乳腺	腺腫					5	5	3	5	
	腺癌 M		1				1			
甲状腺	腺腫	1								
上皮小体	腺腫			1	2					
下垂体	腺腫		2	3	1	3	2	2	2	
中枢神経系	星状細胞腫 M	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BASF ジャパン株式会社にある。

Dithiane

最終屠殺 (1000ppm 群の雄は 88 週、雌は 96 週に屠殺、その他の群は 104 週に屠殺)

性別	投与量 (ppm)	雄				雌			
		0	20	200	1000	0	20	200	1000
検査動物数 ²⁾		9	8	8	7	9	12	10	10
肝臓	肝癌(非浸襲性) M リンパ管腫		1		1			1	
腎臓	脂肪腫 腎芽細胞腫 M			1				1	1
副腎	皮質腺腫		1						
膵臓	島細胞腺腫	1							
リンパ組織	リンパ細胞腫瘍 M		1						
精巣	中皮腫 間細胞腫	1			1				
卵巣	腺腫								1
結合組織	線維肉腫 M								2
乳腺	腺腫					6	10	5	1
甲状腺	腺腫 腺癌 M	3			1	1			
下垂体	腺腫	3	1	1		7	4	3	3
中枢神経系	星状細胞腫 M								1

全動物

検査動物数 ^{1,2)}		25	25	25	25	25	25	25	25
肝臓	肝癌(非浸襲性) M リンパ管腫		1		1			1	
腎臓	線維肉腫 M			1				1	1
	脂肪腫							1	
	脂肪肉腫 M			1				1	
	移行上皮癌 M 腎芽細胞腫 M								1
副腎	皮質腺腫		1						1
膵臓	島細胞腺腫	1							
リンパ組織	リンパ細胞腫瘍 M	1	2	1					
精巣	中皮腫 間細胞腫	1			1				
卵巣	腺腫						1		1
子宮	線維肉腫 M						1		
膀胱	乳頭腫								1
結合組織	線維腫	1							
	粘液線維腫	1							
	線維肉腫 M	1		1	1			1	3
皮膚	角化棘細胞腫		1						
乳腺	腺腫					11	15	8	6
	腺癌 M		1				1		
甲状腺	腺腫 腺癌 M	4			1	1			
上皮小体	腺腫			1	2				
下垂体	腺腫	3	3	4	1	10	6	5	5
中枢神経系	星状細胞腫 M	1							1

M: 悪性腫瘍を示す。

1) 26 週屠殺動物は含めなかった。

2) 対照群及び 1000ppm 群は組織学的に検査した全動物数。20 及び 200ppm 群の途中死亡動物は組織学的に検査した全動物数、最終屠殺動物数は肉眼的に検査し、異常の認められた組織についてのみ組織学的に検査した全動物数。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Bitlifenol

各群における腫瘍動物数、腫瘍総数、悪性及び良性腫瘍数は次表の通りであり、腫瘍の発生頻度に関して、検体投与による影響はなかった。

性 別		雄				雌			
		0	20	200	1000	0	20	200	1000
投 与 量 (ppm)		0	20	200	1000	0	20	200	1000
検査動物数		25	25	25	25	25	25	25	25
腫瘍数	良性	11	5	6	4	22	22	15	14
	悪性	3	4	3	3	0	2	2	6
腫瘍総数	腫瘍総数	14	9	9	7	22	24	17	20
腫瘍動物数	腫瘍動物数	12	9	8	7	16	18	14	14

以上の結果から、本剤の24ヵ月間飼料混入投与による慢性毒性試験における影響として、200ppm群で体重増加抑制、摂餌量の減少、ヘマトクリット値及び赤血球数の減少、肝及び腎重量の増加/増加傾向が認められ、また1000ppm群では小球性貧血(ヘモグロビン量及び平均赤血球容積の減少)がみられ、総蛋白及びアルブミンの増加、蛋白尿がみられた。従って、最大無作用量は20ppmであると判断される。

また、催腫瘍性はないものと考えられる。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

B. H. H. H. H.

1-9-2-2 ラットを用いた 24 ヶ月混餌投与慢性毒性/発がん性試験

(資料 14)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1991 年

検体純度：

供試動物：CrI : CD(SD)Br 系、1 群雌雄各 70 匹(発がん性群；1 群雌雄各 50 匹、衛星群；1 群雌雄各 20 匹)、6 週齢、体重範囲 雄 162.7~254.8g、雌 135.9~199.2g
なお、衛星群の動物は血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査に供した。

試験期間：24 ヶ月間(1986 年 9 月 23 日~1988 年 9 月 30 日)

投与方法：検体を 0、20、120 及び 600ppm の濃度で飼料に混入し、24 ヶ月にわたって随時摂食させた。検体を混入した飼料は 1 週間に 1 回調製した。

用量設定根拠：既存のデータをもとに設定した。

(報告書に根拠を明記されていないが、評価対象除外を依頼したデータを参考として、1000ppm は最大耐量を超え途中屠殺されていることから、高用量を 600ppm に設定されたと申請者は判断する)

観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡率：一般状態及び生死を毎日観察した。さらに、毎週 1 回詳細な一般状態の検査を行った。

試験終了時の死亡率を次表に示す。

投与量 (ppm)		0	20	120	600
死亡率 (%)	雄	72.9	57.1	71.4	71.0
	雌	65.7	45.7↓	48.6↓	37.3 ^o

統計学的手法：対比較検定：↓； $p \leq 0.05$ 、[↓]； $p \leq 0.01$ 、^o； $p \leq 0.001$

死亡率は雄では群間に差が見られなかったが、雌では投与群で下垂体及び乳腺腫瘍が減少したために死亡率が有意に低下した(生存率が高かった)。

主要な死因は次表のように下垂体腫瘍、四肢の病変、腎/尿路の病変、乳腺腫瘍等であった。

主要な死因

性 別	雄				雌			
	0	20	120	600	0	20	120	600
検査した死亡数	44	40	50	50	46	33	34	28
下垂体腫瘍	15	10	28	13	22	15	13	10
四肢の病変	9	9	5	9	2	1	2	1
尿路の病変	2	0	0	6	1	0	1	0
腎病変	0	0	0	11	0	0	0	3
乳腺腫瘍	0	0	0	0	9	7	6	5
皮下腫瘍	2	4	1	2	2	1	2	2
血リンパ性腫瘍	2	2	2	3	1	1	0	0

600ppm 群雌で被毛汚染及び粗毛が 3 週目ごろから目立ち始め、試験の経過につれてより顕著になった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Dithianon

体重変化：全動物について投与 16 週まで毎週 1 回、それ以降は 4 週間に 1 回体重を測定した。

統計学的有意差のみられた体重増加を以下に示す。

性別	雄			雌		
	20	120	600	20	120	600
0-12 週		107↑	95↓		107↑	70*
12-24 週			87↓			61*
24-36 週						57*
36-48 週						49*
48-60 週						76↓

統計学的手法：t-検定 ↑↓：p≤0.05、↑↑↓：p≤0.01、↑↑↑：p≤0.001
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。

平均体重は 600ppm 群の雌雄で全期間を通じて、対照群よりも低値で推移した。体重増加は雄が投与 24 週まで、雌が 60 週まで有意に減少した。

摂餌量：全動物の摂餌量を投与 16 週までは毎週 1 回、それ以降は 4 週間に 1 回測定した。

統計学的有意差のみられた摂餌量の変動を以下に示す。

性別	雄			雌		
	20	120	600	20	120	600
投与量 (ppm)	20	120	600	20	120	600
0-4 週	104↑	103↑	93*	103↑	104↑	86*
9-12 週			96↓			87*
24 週			96↓			83*
36 週						83*
48 週						83*
60 週						85*
72 週						87*
84 週						87*
96 週						89↓
104 週	111↑					81↓

統計学的手法：t-検定 ↑↑：p≤0.05、↑↑↑：p≤0.01、↑↑↑↑：p≤0.001
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。

600ppm 群の雄では投与後数週間、雌では試験期間中一貫して摂餌量の有意な減少がみられ、体重の増加抑制を伴っていた。

検体摂取量：投与期間中の検体摂取量 (mg/kg/日) は次表の通りであった。

投与量 (ppm)		20 ^a	120 ^b	600 ^b
検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	1	6	30
	雌	1	6	30

^a: FAO/WHO JMPR Evaluations 1992, Parts II, Toxicology, DITHIANON 185-191

^b: 20ppm の検体摂取量より概算した。

飲水量：衛星群の動物のケージ当たり飲水量を投与 44~47 週まで、毎日測定した。

いずれの群にも、検体投与に関連する変化はみられなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

血液学的検査：投与 13、26、52、78 及び 103 週時に、可能な限り衛星群の 20 匹*を対象として、一晩絶食後、後眼窩静脈から採血し、以下の項目について検査した。血液塗抹は 1 例を除く全瀕死動物から得た。

赤血球数 (RBC)、血色素量 (Hb)、ヘマトクリット値 (PCV)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、総白血球数、白血球型別百分率 (13~52 週は対照群と 600ppm 群のみ検査)、血小板数

*: 52 週の雄の 120 及び 600ppm 群、雌の対照群及び 120ppm 群は各 19 匹から、78 週は対照、20、120 及び 600ppm 群でそれぞれ雄は 17、15、16 及び 15 匹、雌は 16、17、16 及び 18 匹から採血した。103 週は本試験群の一部動物を含めたが、20ppm 群雄は 19 匹の採血となった。

対照群と比べ、統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

検査項目	検査時期 (週)	投与量					
		雄			雌		
		20	120	600	20	120	600
RBC	52						96 _u
	78			95 _l			
Hb	13	97 _l	97 _l	95 _o			
	52						95 _o
	103			89 _u			
PCV	13	96 _u	96 _o	93 _o			
	26	97 _l	96 _l	95 _u			
	52		96 _l	93 _o			97 _o
	78			91 _o			
	103			89 _u			
MCV	13			94 _o			97 _o
	26		97 _l	93 _o			98 _l
	52		97 _l	94 _o			
	78			95 _u			
	103				96 _u	97 _l	96 _u
MCH	13			97 _l			98 _l
	26			95 _o			
MCHC	13		102 _↑	102 _o			101 _o
	26	101 _↑		103 _o	99 _l		101 _o
	52		101 _↑	104 _o			
	78			101 _↑			

統計学的手法：t-検定：††；p≤0.05、† †；p≤0.01、***；p≤0.001

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。

600ppm 群の雌雄において、RBC、Hb、PCV 及び MCV の有意な減少がみられ、小球性貧血を示唆している。これら減少の程度及び時期的な頻度で雄がより高かった。これらは検体投与に起因した変化と考えられた。その他の統計学的に有意差のみられた変化は、生物学的に意義がないものと考えられた。

切迫動物の白血球数に投与関連性の変化はみられなかった。

血液生化学検査：血液学的検査に使用した血液から得られた血清 (13 週及び 103 週は採取した全ての試料、26、52 及び 78 週は 10 試料についてのみ) を用い、以下の項目を検査した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、γ-グルタミルトランスフェラーゼ (GGT)、アルカリホスファターゼ (AIP)、クレアチニンホスホキナーゼ (CPK)、尿素窒素、総ビリルビン、クレアチニン、総コレステロール、総蛋白、アルブミン、アルブミン/グロブリン比 (A/G)、グルコース、ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン

統計学的有意差がみられた項目を次表に示す。

検査項目	検査時期 (週)	投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		20	120	600	20	120	600
AST	13			85↓			72°
	26				49↓		40↓
	103	79↓	74↓				
ALT	13			78°			78↓
	26				63↓		63↓
	103	68↓	63↓				
GGT	13		83	100	114°	114↑	114↑
	78		225°	275↑			125
	103		117	233°			160
AIP	52		134↑				
CPK	52			41↓			
	78		53↓	52↓			
	103		46↓	34°			
尿素窒素	13			113°			
	52			108↑			125↑
	103			119°			136↑
総コレステロール	13			69°			67°
	26			76↓			59°
	52			76↓			63°
	78	120↑		87			76↓
	103		118↑	91			83↓
クレアチニン	26			88↓			100*
	52						100*
アルブミン	26			105↑			
A/G	103	88↓					
グルコース	13		126°	143°			
	52		133↑	154°			
	78		111	105	111	113	98
	103	126↑	124↑	146°	119↑	119↑	119↑
無機リン	103		104↑	133°	87↓		
カリウム	13					92↓	89↓
	103						85↓
塩素	52			102↑			

統計学的手法：Kruskal-Wallis 及び Wilcoxon 順位和検定

* ↑: $p \leq 0.05$, °: $p \leq 0.01$, °°: $p \leq 0.001$ 矢印のない数値は有意差なし

表中の数値は、実験の目安として対照群を 100 とした場合の値を表した。

600ppm 群雌雄及び 120ppm 群雄において、γ-グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) が増加 (雄) ないし増加傾向 (雌) にあった^{申請者注}。

申請者注：報告書にはこのように記載されているが、申請者は 600 及び 120ppm 群の雄は GGT が増加しているが、雌では増加はないと判断します。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Dithionon

判断の根拠: GGT の実数(単位 IU/L)及び対照群の最大値より高い値を示した例数を次表に示す。600ppm 群雄では 78 及び 103 週時とも対照群より有意に高く、多数例で対照群の最大値より高かった。また、雌では有意差がなく、1 例が 64 IU/L(対照群 6 IU/L)と異常に高く、肝臓を発症していた。この例を除く平均値は 5 IU/L で対照群と差がない。120ppm 群雄では 78 週時に有意に高く、3/10 例で対照群の最大値より高かった。

GGT の実数(単位 IU/L)及び対照群の最大値より高い値を示した例数〔()内に示す数値〕

検査 時期 (週)	投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	0	20	120	600	0	20	120	600
13	6	6	5	6	7	8 ^o (4/20)	8 [†] (3/20)	8 [†] (5/20)
78	4	5	9 [†] (3/10)	11 [†] (6/10)	4	5	5	5
103	6	7	7 (1/20)	14 ^o (8/20)	5	5	4 (2/20)	8 (5/20)

統計学的手法: Kruskal-Wallis 及び Wilcoxon 順位和検定

†: $p \leq 0.05$, ††: $p \leq 0.01$, †††: $p \leq 0.001$ 矢印のない数値は有意差なし

600ppm 群において、総コレステロールは雌雄とも最初の 1 年間は減少し、雌ではその後も減少が続いた。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 及びアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) が雌雄で試験の早い時期に減少する傾向がみられた。グルコースは試験期間中 600 及び 120ppm 群は、概ね対照群より高い傾向にあった。肝臓に退行性の変化がみられないことから、これらの変化は検体を排泄するために反応した肝臓の代謝活性の亢進を表すものと考えられた。しかし、AST 及び ALT の減少には毒性学的に意義がないと考えられる。

600ppm 群において、尿素窒素は雌雄で増加し、無機リンは雄で 103 週のみ増加した。これらは腎臓に対する検体投与の影響と考えられた。

その他にも表のように有意差のある変化がみられたが、投与に関連すると思われる変化はみられなかった。

甲状腺機能検査: 最終解剖時に各群雌雄 10 匹から採取した血液を用いて、以下の項目について測定した。

トリヨードチロニン (T_3)、チロキシン (T_4)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、

統計学的有意差のみられた項目を次表に示す。

検査 項目	検査 時期 (週)	投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		20	120	600	20	120	600
T_3	105			66 [↓]			84

統計学的手法: Kruskal-Wallis 及び Wilcoxon 順位和検定、↓: $p \leq 0.01$ 。矢印のない数値は有意差なし。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。

600ppm 群における T_3 は雄で有意な減少が、雌で減少傾向がみられ、検体投与に関連があと考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Dithiazon

尿検査：衛星群の雌雄各 10 匹を対象として、一晚絶水後、投与後 13、26、52、78 及び 103(本試験群の一部を含めた)週時に採取し、以下の項目を検査した。

尿量、比重、pH、蛋白、グルコース、ケトン体、総ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン、還元物質、沈渣

統計学的有意差のみられた半定量的検査項目を次頁の表に示す。

600ppm 群の雌の 26 及び 52 週時の尿に、多くの上皮細胞が含まれていた。

蛋白は概ね投与群の雄の 52 及び 78 週時、ならびに 120 及び 600ppm 群の雌の 52 週以降に増加した。20ppm 群の雄でみられた蛋白は、他に変化がみられなかったことから意義のあるものとは考えなかった。また、これは老齢ラットに好発する所見である。

潜血は雄において 120 及び 600ppm 群の雄の 52 週時に増加の傾向にあったが、103 週時には少なかった。雌では 13 週時に増加し、103 週時少なかった。

その他に表のように 600ppm 群でビリルビンの増加、グルコース、還元物質及び無機リンの減少がみられたが、いずれも一時的であり、投与に関連がないと考えられる。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Dithianol

統計学的有意差のみられた半定量的検査項目 (但し、還元物質を除き 10 例中の発生頻度)

検査項目	検査時期 (週)	程度	投与量 (ppm)							
			雄				雌			
			0	20	120	600	0	20	120	600
上皮細胞	26	-					8	7	7	4
		+					2	3	3	2
		++								4†
	52	-					10	8	6	6
		+					0	2	4	4†
蛋白	52	-	5	3	2	1				
		+	5	4	6	4				
		++		2	2	4				
		+++		1		1				
	78	-	1	1	2		2	4		
		+	7	2	2	1	5	2	3	1
		++	2	3	2	2	3	2	1	4
		+++		4†	4	7 †		2	6	5
	103	-	1				1	3		1
+		1	3	2		6	4	3		
++		3	1	3	1	3	2	5	3	
+++		5	6	5	9		1	2	6	
潜血	13	-					10	10	8	2
		+							2	8 ^o
	52	-	7	3	3	3	10	9	10	10
		+	2	5	5	3				
		++		1				1		
		+++	1	1	2	4				
103	-	3	2	7	8	5	6	9	9	
	+	4	5	1		2	2	1	1	
	++	3	1	2	2 †	2	2			
	+++		2			1				
ビリルビン	13	-	10	10	10	5				
	+				5†					
グルコース	26	-	2	4	3	10 ^o				
	+	8	6	7						
還元物質	26	%					0.18	0.10	0.13	0.00 †
無機リン	52	-				3				
		+	3	2	7	5				
		++	7	8	3	2†				
	78	-	2	2	2	8				
	+	7	8	6	2†					
	++	1		2						
細菌	78	-	10	6	6	5				
	+		4†	4†	5†					

太字は統計学的に有意であった群を示す。斜字体は減少を示す。

統計学的方法: Fisher 直接確立検定 ††: $p \leq 0.05$, † †: $p \leq 0.01$, ^{oo}: $p \leq 0.001$

定量的検査項目のうち、有意差が見られた項目を次頁の表に示す。

尿量、比重及び pH に次表のように有意差が見られたが、いずれも投与に関連性はないと考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

検査項目	検査時期(週)	投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		20	120	600	20	120	600
尿量	26			140†			
	78				71↓	65↓	
	103			200*			
pH	52						6.3† (5.4)
比重	103			1.034↓ (1.045)			

統計学的方法：Fisher 直接確立検定 ↓： $p \leq 0.05$ 、†↓： $p \leq 0.01$ 、*： $p \leq 0.001$
 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。
 pH 及び比重は実数を示し、() 内の数値は対照群の値を示す。

眼科学的検査：投与開始前及び 102 週時に全動物を対象として検査した。

いずれの群とも、検体投与に関連する変化はみられなかった。

臓器重量：試験終了時に各群の雌雄各 10 匹を対象として、下記の臓器の重量を測定し、対体重比も算出した。

副腎、脳、肝臓、腎臓、卵巣、精巣、甲状腺(衛星群の動物のみ)

対照群とに比し、統計学的有意差の認められた項目を次表に示した。

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		20	120	600	20	120	600
体重		97	108	88↓	100	92	71*
腎臓	右	対体重比			126*		
	左	対体重比			135*		
肝臓		対体重比			124†		
脳		対体重比			117↑		

統計学的手法：t 検定、† ↓： $p \leq 0.05$ 、† ↓： $p \leq 0.01$ 、**： $p \leq 0.001$
 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。

600ppm 群の雌雄でみられた腎臓及び肝臓の対体重比の増加は、検体投与による変化と考えられた。脳の対体重比の増加は低体重の結果であり、毒性的に重要ではない。

肉眼的病理検査：途中死亡、切迫屠殺及び試験終了時の全生存動物を対象として、肉眼的病理検査を行なった。

主要な肉眼的所見を次頁の表に示した。

600ppm 群の腎臓において、雄では表面不整、蒼白、腫大及び嚢胞の顕著な増加がみられた。雌では表面不整及び腫瘍が僅かに多くみられた。これらは検体投与に関連してみられた組織学的変化に対応する所見と考えられた。恐らく腎傷害の結果として、同群の雄では眼の蒼白、肺の膨張、精巣萎縮、心臓の蒼白/肥大、胃の暗色巣/隆起域の頻度増加がみられた。

その他の所見は概して、加齢に伴う好発所見が多かった。

主要な肉眼的所見(各群 70 例における発生数)

臓器	性 別 投与量(ppm)	雄				雌			
		0	20	120	600	0	20	120	600
副腎	腫大	2	1	4	2	12	8	7	8
腎臓	表面不整	0	1	1	18	2	0	0	5
	蒼白	3	4	8	7	9	5	4	4
	腫大	1	0	2	6	1	1	0	0
	嚢胞	3	1	1	10	2	0	0	1
	水腎症	3	2	2	2	1	1	5	1
	腫瘍	0	3	0	2	1	0	0	5
肝臓	腫大	5	4	4	7	2	1	0	0
	斑状	7	8	12	5	8	11	13	10
	蒼白	3	4	8	7	9	5	4	4
下垂体	腫瘍	23	18	32	15	44	37	27	32
	腫大	0	1	1	4	8	14	16	14
卵巢	嚢胞	-	-	-	-	11	14	8	13
皮下	腫瘍、複数	6	10	3	7	14	16	8	6
	腫瘍	9	18	13	18	27	14	29	16
	脱毛	8	11	12	4	14	30	9	21
脾臓	腫大	4	6	7	6	2	1	1	2
四肢	腫大	13	17	7	11	1	2	5	1
	潰瘍	12	18	12	14	8	3	8	4
眼	蒼白	4	4	4	10	6	4	3	1
肺	膨張	2	3	3	7	1	0	0	0
精巣	萎縮	3	2	0	1	-	-	-	-
心臓	肥大	1	1	2	5	0	0	0	0
	蒼白域	1	0	0	3	0	0	0	0
胃	肥厚	11	5	9	8	4	3	2	3
	暗色巢	0	0	1	4	0	0	0	1
	隆起域	1	0	0	4	1	0	0	1

病理組織学的検査：衛星群を含む対照群及び 600ppm 群の全動物、ならびに 20 及び 120ppm 群の死亡・切迫殺動物を対象として以下の組織、及び生存動物の肉眼的異常部位、腫瘍、肺、腎臓、肝臓および甲状腺について、病理標本を作成して検鏡した。

脳(脳幹を含む)、脊髄(腰部、頸部、胸部)、下垂体、甲状腺(上皮小体を含)、胸腺、気管、肺、心臓、大動脈、唾液腺(下顎腺、舌下腺)、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精巣/卵巢、子宮(体部、頸部)、精巣上体、前立腺、皮膚、乳腺、食道、胃(胃底部、幽門部)、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、リンパ節(下顎、腸間膜)、骨格筋(大腿四頭筋)、坐骨神経、眼球(視神経を含)、大腿骨(関節面を含む)、軟口蓋(鼻腔後部を含む)、胸(骨髄を含)、すべての肉眼的異常部位

なお、試験終了時の 20 及び 120ppm 群の全動物について、肺、肝臓、腎臓、甲状腺及び肉眼的異常部位のみを組織学的に検索した。

[非腫瘍性病変]

認められた主要な非腫瘍性病変を表 1 に示す。

検体投与に関連して、600ppm 群で種々の腎病変(尿細管ネフローゼ、糸球体腎症、終末腎、増殖性尿細管)の発生頻度が統計学的に有意に増加した。終末腎病変は尿細管ネフ

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Dithiazon

ローゼ及び糸球体腎症の合併によって生じ、増殖性尿細管は 600ppm 群の雌で増加がみられた腎腫瘍の前段階の病変の可能性が考えられた。また 600ppm 群の雄で発生頻度が増加した所見である上皮小体過形成、前立腺炎及び他臓器(特に、精巣及び膀胱)における動脈炎は、慢性腎疾患に続発した変化とみなされた。

[腫瘍性病変]

認められたすべての腫瘍性病変を表 2 に示す。

600ppm 群の雌において、腎腫瘍の発生頻度が対照群に比べて有意に増加し(対照群 0/70 匹、600ppm 群 11/69 匹)、検体投与によるものと考えられた。また同群の雌において、乳腺腫瘍の発生頻度が対照群よりも減少したが、これは体重増加の減少に関連したものと推察された。その他の腫瘍の発生頻度は、この種の老齢ラットの背景データに概ね一致するものであった。

腎臓病変に関する再評価

腎腫瘍の発生頻度が 600ppm 群雌において、対照群に比べて有意に増加が観察されたので、腎臓傷害あるいは過形成の確認をするために、雌についてのみ Toxicology Advisory Services で再評価した(1991 年)。その結果を以下に要約する。

老齢ラットに好発する慢性腎症に関連する病変が対照群を含め全群で高頻度に認められた。

好酸性封入体は非変異原性物質を投与した雄ラットで好発し、細胞傷害と、続く尿細管上皮の増殖に関連しているが、この雌における 600ppm 群における発生は検体の尿細管に対する毒作用の 1 つの証拠である可能性がある。

好塩基性尿細管は自然発生性の慢性進行性腎症の結果として、尿細管傷害に伴い発生した再生性過形成の一種とみなした。120 及び 600ppm 群におけるより高い発生頻度は投与による自然発生病変の増悪と考えられる。

異型尿細管過形成は浸潤性がなく、隣接組織の圧迫もせず、被膜形成がないので、腫瘍性ではない。120 及び 600ppm 群におけるより高い発生頻度は長期化した尿細管傷害と代償性の過形成の末期像と思われる。

増殖性尿細管は腺種に似た細胞から構成され、前腫瘍性病変で、腫瘍への一段階であることを示唆しており、異型過形成から発達すると考えられた。

移行性上皮癌は偶発性で、投与に関連はない。

結論として、600ppm 群雌で観察された腎尿細管の腺種及び腺癌は、長期化した細胞傷害が原因で、異型過形成から発達したと考えられる。

雌における腎臓病変の発生頻度(各群 70 例中の)を次表に示す。

所見		投与量 (ppm)			
		0	20	120	600
非増殖性病変	自己融解	3	4	5	5
	鉄質沈着	25	20	27	13
	好酸性封入体	0	2	3	9
	尿細管拡張	47	45	45	38
	硝子様円柱	32	32	46	43
	糸球体萎縮	30	15	9	17
	糸球体硬化	4	6	5	21
	繊維化	3	5	3	23
	色素沈着	12	5	8	12
	間質細胞浸潤	31	43	38	46
	糸球体腎症 ^a				
程度 1	42	42	41	24	
程度 2	16	10	15	20	
程度 3	7	9	7	10	
程度 4	0	1	0	9	
増殖性病変	好塩基性尿細管 ^b	24	24	34	39
	異型尿細管過形成	0	0	4	10
	増殖性尿細管	0	0	0	6
	腺腫	0	0	0	7
	腺癌	0	0	0	2
	白血病	0	1	0	0
	リンパ腫	1	0	0	0
	肉腫型	1	0	0	0
移行性上皮癌	0	0	0	1	

自己融解例は評価しなかった。

^a 1=極めて軽度 2=軽度 3=中等度 4=高度

^b 再生性過形成の一種とみなした

以上の結果から、本剤のラットに対する 2 年間反復経口投与による影響として、600ppm 群において、雌雄で摂取量の減少、体重増加の抑制、小球性貧血、尿素窒素の増加、肝臓の対体重比の増加、腎臓重量の増加及び種々の腎病変(尿細管ネフローゼ、終末腎の増加が雌雄で、増殖性尿細管及び糸球体腎症の増加が雌で)、雄で上皮小体過形成、大動脈の石灰沈着、精巣の動脈炎及び前立腺炎の増加みられた。さらに、600ppm 群の雄ではγ-グルタミルトランスフェラーゼが増加していた。

また、120ppm 群の雄でγ-グルタミルトランスフェラーゼの増加、雌で腎病変の増加(糸球体腎症、尿細管ネフローゼ)が認められた。本試験における無毒性量は雌雄とも 20ppm(雌雄約 1mg/kg/day)であると判断される。

また、600ppm 群の雌において、長期化した腎尿細管の細胞傷害による腎腫瘍の発生が増加した
申請書注(次頁)

申請者注： ラット雌の腎臓腫瘍に関する考察

600ppm 投与ラットにおいて、雌では体重増加の抑制が顕著であることから最大耐量を超えていたものと考えられるが、腎臓の増殖性の変化及び腺腫が雌においてのみ認められた。近位尿細管上皮細胞に対する細胞傷害が好塩基性尿細管の再生性反応の誘因となり、長期曝露によって腫瘍を含む増殖性病変を二次的に発生させたと考えられる。雄では雌と同じように投与初期に水腫性変性がみられ、細胞の再生がみられるものの、再生細胞に対する変性はなく、適応していた。これに対し、雌では再生細胞にも水腫性変化がみられ、持続的に感受性を示している。これが、雌のみで腫瘍を生じた理由と考えられる。この再生は BrdU による DNA 標識で、600ppm 投与雌で組織所見と一致する尿細管細胞の回転の増加が確認されている。

電顕では近位尿細管細胞のミトコンドリアが毒作用の標的で、小胞体が膨張していた。電顕所見の程度と発生頻度は光学顕微鏡の観察所見とほぼ同じであり、ジチアノンの毒作用に対する SD ラット雌雄の感受性における性差が確認されている。

腎臓において、変性に続く持続的尿細管の再生は非遺伝毒性物質による腫瘍発生の特徴である。したがって、ジチアノンの慢性曝露による持続的尿細管傷害とその後の細胞の再生は雌ラットにおける腎臓腫瘍の発生の誘因であり、非遺伝毒性物質による腫瘍発生の機序と類似の機序による催腫瘍性と判断される。

120ppm 以下の用量では腎臓腫瘍に結びつく変化は認められなかった。

ヒトが曝露される最大推定用量(ラットにおける慢性毒性試験に基づく提案の $ADI = 20\text{ppm}/100 = 0.2\text{ppm}$)ではこのような機序は起こらないことから、ヒトに対し発がん性は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 BASF ジャパン株式会社にある。

表 1-1 非腫瘍性病変

時期	性別	雄				雌				
		投与量 (ppm)				投与量 (ppm)				
		0	20	120	600	0	20	120	600	
死亡 / 切迫殺	腎臓	所見・検査例数	44	38	50	49	46	31	34	27
		糸球体腎症	8	5	11	16	13	9	10	14
		尿管管ネフローゼ	0	0	0	18 [†]	0	0	0	7 ^o
		終末腎	0	0	0	12 [†]	0	0	0	2
		増殖性尿管管	0	0	0	0	0	0	0	3
		嚢胞	1	0	1	7	2	0	0	2
	肝臓	所見・検査例数	44	40	50	50	46	33	34	28
		好塩基性小増殖巣	8	4	5	8	30	12	15	9
	上皮小体	所見・検査例数	42	37	45	47	46	31	31	25
		過形成	0	0	0	7 ^o	0	0	0	0
	大動脈	所見・検査例数	44	39	50	50	45	33	34	28
		石灰沈着	0	0	0	5	0	0	0	0
	膵臓	所見・検査例数	43	39	49	49	44	32	32	27
		動脈炎	1	0	0	6	0	0	0	0
	精巣	所見・検査例数	44	40	50	50				
		動脈炎	1	0	2	12 [†]				
	精嚢	所見・検査例数	42	36	45	49				
		精嚢腺炎	2	1	2	9				
	前立腺	所見・検査例数	44	39	48	49				
		前立腺炎	4	4	6	14 [†]				
最終屠殺	腎臓	所見・検査例数	26	30	20	20	24	37	36	42
		糸球体腎症	11	20	12	9	5	16	23	26 [†]
		尿管管ネフローゼ	0	0	0	13 ^o	0	0	3	22 ^o
		終末腎	0	0	0	4 [†]	0	0	0	0
		増殖性尿管管	0	0	0	0	0	0	0	6
		嚢胞	1	1	0	4	1	0	0	1
	肝臓	所見・検査例数	26	30	20	20	24	37	36	42
		好塩基性小増殖巣	17	19	10	6	19	30	29	23
	上皮小体	所見・検査例数	24	28	19	18	23	35	33	39
		過形成	0	0	0	1	0	0	0	0
	大動脈	所見・検査例数	26	0	0	20	24	0	0	42
		石灰沈着	1	0	0	1	0	0	0	0
	膵臓	所見・検査例数	26	0	1	20	23	1	0	42
		動脈炎	1	0	0	2	0	0	0	1
	精巣	所見・検査例数	26	7	4	20				
		動脈炎	1	1	1	5				
	精嚢	所見・検査例数	26	7	3	20				
		精嚢腺炎	1	1	0	2				
	前立腺	所見・検査例数	26	1	1	20				
		前立腺炎	2	1	0	0				

Fischer の直接確率計算法 † ; p ≤ 0.05, † † ; p ≤ 0.01, † † † ; p ≤ 0.001 (申請者実施)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

表 1-2 非腫瘍性病変(続き)

時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	20	120	600	0	20	120	600
全動物	腎臓	所見・検査例数	70	68	70	69	70	68	70	69
		糸球体腎症	19	25	23	25	18	25	33†	40*
		尿細管ネフローゼ	0	0	0	31*	0	0	3	29*
		終末腎	0	0	0	16*	0	0	0	2
		増殖性尿細管	0	0	0	0	0	0	0	9†
		嚢胞	2	1	1	11	3	0	0	3
	肝臓	所見・検査例数	70	70	70	70	70	70	70	70
		好塩基性小増殖巣	25	23	15	14	49	42	44	32
	上皮小体	所見・検査例数	66	65	64	65	69	66	64	64
		過形成	0	0	0	8†	0	0	0	0
	大動脈	所見・検査例数	70	39	50	70	69	33	34	70
		石灰沈着	1	0	0	6†	0	0	0	0
	脾臓	所見・検査例数	69	39	50	69	67	33	32	69
		動脈炎	2	0	0	8	0	0	1	1
	精巣	所見・検査例数	70	47	54	70	(中略)			
		動脈炎	2	1	3	17*				
	精嚢	所見・検査例数	68	43	48	69				
		精嚢腺炎	3	2	2	11				
	前立腺	所見・検査例数	70	40	49	69				
		前立腺炎	6	5	6	14				

Fischer の直接確率計算法 †: $p \leq 0.05$, ††: $p \leq 0.01$, †††: $p \leq 0.001$ (申請者実施)

表 2-1 腫瘍性病変

時期	性 別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	20	120	600	0	20	120	600
死亡 / 切迫 殺	唾液腺	所見・検査例数	43	40	49	48	46	33	34	27
		癌 (M)	0	0	1	0	0	0	0	0
	肝臓	所見・検査例数	44	40	50	50	46	33	34	28
		癌 (M)	0	0	0	1	0	0	0	0
		組織球性肉腫 (M)	0	1	0	0	0	0	0	0
	膵臓	所見・検査例数	43	39	49	49	44	32	32	27
		島細胞腺腫 (B)	0	2	3	0	0	0	2	0
	腸間膜 リンパ節	所見・検査例数	42	39	50	47	46	32	34	28
		血管腫 (B)	0	0	1	0	0	0	0	0
	腎臓	所見・検査例数	44	38	50	49	46	31	34	27
		腺腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	5†
		癌 (M)	0	1	0	0	0	0	0	1
		肉腫 (M)	0	0	0	0	1	0	0	0
	精巣	所見・検査例数	44	40	50	50	/			
		間細胞腫 (B)	0	3	1	4				
	卵巣	所見・検査例数	/				46	33	34	27
		顆粒膜・莖膜腫瘍 (B)					1	0	1	0
	子宮	所見・検査例数	/				46	32	33	28
		線維腫 (B)					1	0	1	0
		間質性ポリープ (B)					5	1	1	0
		間質性肉腫 (M)					0	0	1	0
	盲腸	所見・検査例数	39	33	44	45	45	29	29	25
		腺癌 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1
	直腸	所見・検査例数	44	39	50	49	46	33	32	28
		ポリープ (B)	0	0	1	0	0	0	0	0
	副腎皮質	所見・検査例数	44	40	50	49	46	33	33	28
		皮質腺腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	1
	副腎髄質	所見・検査例数	43	40	50	48	46	32	33	28
		髓質褐色細胞腫 (B)	7	2	6	2	2	1	1	1
		髓質褐色細胞腫 (M)	0	0	1	0	0	0	0	0
神経節神経腫 (B)		1	0	0	0	0	0	0	0	
下垂体	所見・検査例数	42	40	50	50	46	33	36	27	
	腺腫 (B)	23	20	33	24	37	27	23	21	
	癌 (M)	0	0	1	0	0	2	0	0	
脳	所見・検査例数	42	40	50	50	46	33	33	27	
	髄膜腫 (B)	1	0	1	0	0	0	0	1	
	神経膠腫 (M)	1	0	2	0	0	0	1	0	

(B) : 良性腫瘍、(M) : 悪性腫瘍

Fischer の直接確率計算法 1 p<0.05 (申請者実施)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

表 2-2 腫瘍性病変

時期	性 別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	20	120	600	0	20	120	600
死亡 / 切 迫 殺	皮膚皮下	所見・検査例数	44	40	49	50	46	33	34	28
		脂肪腫 (B)	0	0	0	0	3	0	0	0
		乳腺腫 (B)	2	4	2	7	0	1	0	0
		線維腫 (B)	1	4	4	2	0	1	1	2
		真皮線維腫 (B)	0	1	1	0	0	0	0	0
		基底細胞腫 (B)	0	0	0	1	0	0	0	0
		皮脂腺腫 (B)	0	0	0	0	1	0	0	0
		血管腫 (B)	0	0	1	0	0	0	0	0
		扁平上皮癌 (M)	0	0	0	1	0	0	1	0
		線維肉腫 (M)	1	1	0	0	0	1	0	0
	乳腺	所見・検査例数	23	20	22	32	44	66	32	28
		線維腺腫 (B)	0	0	0	0	21	13	14	9
		癌 (M)	0	0	0	1	7	2	1	4
	眼球	所見・検査例数	40	35	44	46	45	32	29	25
		黒色腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0
	甲状腺	所見・検査例数	41	37	45	44	45	30	30	26
		C細胞腺腫 (B)	7	6	4	4	6	0	1	5
		濾胞状腺腫 (B)	3	3	7	4	1	0	2	2
	上皮小体	所見・検査例数	42	37	45	47	46	31	31	25
		腺腫 (B)	0	0	1	1	0	0	0	0
	鼻腔	所見・検査例数	44	0	1	47	46	0	0	27
		扁平上皮癌 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0
	腹腔	所見・検査例数	2	1	2	8	1	0	0	1
		肉腫 (M)	0	0	1	0	0	0	0	0
	耳	所見・検査例数	4	0	6	1	5	1	0	2
		神経鞘腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0
		脂肪腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0
	血液リンパ 細胞系	所見・検査例数	2	2	3	4	2	1	0	0
		赤血球性白血病 (M)	0	0	1	1	0	0	0	0
		顆粒球性白血病 (M)	0	0	2	0	1	1	0	0
		リンパ性白血病 (M)	0	0	0	2	0	0	0	0
		未分化白血病 (M)	2	1	0	1	0	0	0	0
リンパ球リンパ腫 (M)		0	1	0	0	0	0	0	0	
骨	所見・検査例数	0	1	2	0	1	1	0	0	
	骨肉腫 (M)	0	1	0	0	0	0	0	0	
腔	所見・検査例数					7	2	4	0	
	扁平上皮癌 (M)					0	0	1	0	
結合組織	所見・検査例数	2	2	2	0	0	0	2	1	
	組織球性肉腫 (M)	1	1	1	0	0	0	1	1	
	肉腫 (M)	1	0	1	0	0	0	1	0	

(B) : 良性腫瘍、(M) : 悪性腫瘍

表 2-3 腫瘍性病変

時期	性 別		雄				雌			
			投与量 (ppm)				0	20	120	600
最 終 屠 殺	胸腺	所見・検査例数	22	0	0	17	22	0	1	38
		扁平上皮癌 (M)	0	0	0	1	0	0	0	0
	肝臓	所見・検査例数	26	30	20	20	24	37	36	42
		腫瘍 (B)	0	0	2	0	1	1	0	0
		癌 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1
	脾臓	所見・検査例数	26	4	2	20	24	1	2	42
		血管肉腫 (M)	0	1	0	0	0	0	0	0
	膵臓	所見・検査例数	26	0	1	20	23	1	0	42
		島細胞腫 (B)	6	0	0	1	1	1	0	2
	腎臓	所見・検査例数	26	30	20	20	24	37	36	42
		脂肪腫様腫瘍 (B)	0	2	0	1	0	0	0	0
		腫瘍 (B)	0	1	0	0	0	0	0	5
		癌 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1
	精巣	所見・検査例数	26	7	4	20				
		間細胞腫 (B)	7	2	2	3				
	卵巣	所見・検査例数					24	9	5	42
		顆粒膜・莖膜腫瘍 (B)					0	0	0	2
	膀胱	所見・検査例数	26	0	0	20	24	0	0	38
		線維腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	1
		乳頭腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	2
	子宮	所見・検査例数					24	0	4	42
		腺腫ポリープ (B)					0	0	1	0
		間質性ポリープ (B)					2	0	0	4
	胃	所見・検査例数	26	3	2	20	24	1	2	42
癌 (M)		0	0	1	0	0	0	0	0	
副腎	所見・検査例数	26	2	2	20	24	1	0	42	
	髓質褐色細胞腫 (B)	9	1	1	8	2	1	0	3	
	髓質褐色細胞腫 (M)	0	1	1	0	0	0	0	0	
下垂体	所見・検査例数	26	5	5	20	24	23	23	42	
	腫瘍 (B)	16	5	4	12	20	23	22	32	
	癌 (M)	0	0	0	0	1	0	0	0	
脳	所見・検査例数	26	1	0	20	24	0	0	42	
	髄膜腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	1	
	神経膠腫 (M)	0	0	0	1	0	0	0	0	
皮膚皮下	所見・検査例数	26	18	13	20	24	23	17	42	
	脂肪腫 (B)	4	3	0	0	1	2	3	1	
	乳腺腫 (B)	3	6	1	6	1	1	0	0	
	線維腫 (B)	1	5	0	1	0	1	0	1	
	真皮線維腫 (B)	1	4	1	1	0	0	0	0	
	基底細胞腫 (B)	2	0	0	0	0	0	0	0	
	平滑筋腫 (B)	0	0	0	1	0	0	0	0	
	線維肉腫 (M)	0	0	1	0	0	0	0	0	

(B) : 良性腫瘍、(M) : 悪性腫瘍

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

表 2-4 腫瘍性病変

時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	20	120	600	0	20	120	600
最終層殺	乳腺	所見・検査例数	10	0	2	13	24	17	22	40
		線維腺腫 (B)	0	0	1	0	12	11	18	9
		癌 (M)	0	0	0	0	0	0	1	1
	眼球	所見・検査例数	26	4	2	20	24	7	2	42
		黒色腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0
	甲状腺	所見・検査例数	26	30	20	20	24	37	36	42
		C細胞腺腫 (B)	7	8	2	1	2	9	5	2
		濾胞状腺腫 (B)	4	3	3	3	3	1	2	1
		C細胞癌 (M)	0	0	0	0	0	1	1	0
	上皮小体	濾胞状癌 (M)	1	0	0	0	0	0	1	0
		所見・検査例数	24	28	19	18	23	35	33	39
	腺腫 (B)	1	0	0	0	1	0	0	0	
		腹腔	所見・検査例数	1	0	0	0	1	1	0
	脂肪腫 (B)		0	0	0	0	0	1	0	0
	中皮腫 (M)		0	0	0	0	1	0	0	0
	口腔	所見・検査例数	1	0	0	5	11	0	0	6
		エナメル上皮腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0
	肢	所見・検査例数	8	16	6	2	4	3	4	3
		線維腫 (B)	0	0	0	0	1	0	0	0
	腫	所見・検査例数					3	0	0	4
乳頭腫 (B)		0					0	0	1	
結合組織	所見・検査例数	0	1	0	1	0	0	0	1	
	肉腫 (M)	0	1	0	0	0	0	0	0	

(B) : 良性腫瘍、(M) : 悪性腫瘍

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

表 2-5 腫瘍性病変

時期	性 別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	20	120	600	0	20	120	600
全動物	胸腺	所見・検査例数	59	33	39	62	66	32	29	61
		扁平上皮癌 (M)	0	0	0	1	0	0	0	0
	唾液腺	所見・検査例数	69	40	49	68	70	33	34	69
		癌 (M)	0	0	1	0	0	0	0	0
	肝臓	所見・検査例数	70	70	70	70	70	70	70	70
		腺腫 (B)	0	0	2	0	1	1	0	0
		癌 (M)	0	0	0	1	0	0	0	1
		組織球性肉腫 (M)	0	1	0	0	0	0	0	0
	脾臓	所見・検査例数	70	43	51	69	70	34	36	70
		血管肉腫	0	1	0	0	0	0	0	0
	膵臓	所見・検査例数	69	39	50	69	67	33	32	69
		島細胞腺腫 (B)	6	2	3	1	1	1	2	2
	腸間膜リンパ節	所見・検査例数	68	39	50	67	70	32	35	70
		血管腫 (B)	0	0	1	0	0	0	0	0
	腎臓	所見・検査例数	70	68	70	69	70	68	70	69
		脂肪腫様腫瘍 (B)	0	2	0	1	0	0	0	0
		腺腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	101
		癌 (M)	0	1	0	0	0	0	0	2
		肉腫 (M)	0	0	0	0	1	0	0	0
	精巣	所見・検査例数	70	47	54	70				
		間細胞腫 (B)	7	5	3	7				
	卵巣	所見・検査例数					70	42	39	69
		顆粒膜・莖膜腫瘍 (B)					1	0	1	2
	膀胱	所見・検査例数	70	38	49	69	70	31	31	66
		線維腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	1
		乳頭腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	2
	子宮	所見・検査例数					70	32	37	70
		線維腫 (B)					1	0	1	0
腺腫ポリープ (B)		0					0	1	0	
間質性ポリープ (B)		7					1	1	4	
間質性肉腫 (M)		0					0	1	0	
胃	所見・検査例数	70	40	49	68	70	32	34	69	
	癌 (M)	0	0	1	0	0	0	0	0	
盲腸	所見・検査例数	65	33	44	65	69	29	30	67	
	癌 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1	
直腸	所見・検査例数	70	39	50	69	70	33	32	70	
	ポリープ (B)	0	0	1	0	0	0	0	0	
副腎皮質	所見・検査例数	70	41	51	69	70	35	35	70	
	皮質腺腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	1	
副腎髄質	所見・検査例数	69	42	52	68	70	33	33	70	
	髓質褐色細胞腫 (B)	16	3	7	10	4	2	1	4	
	髓質褐色細胞腫 (M)	0	1	2	0	0	0	0	0	
	神経節神経腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0	

(B) : 良性腫瘍、(M) : 悪性腫瘍

Fischer の直接確率計算法 1 p<0.01 (申請者実施)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

11111

表 2-6 腫瘍性病変

時期	性 別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	20	120	600	0	20	120	600
全動物	下垂体	所見・検査例数	68	45	55	70	70	56	57	69
		腺腫 (B)	39	25	37	36	57	50	45	53
		癌 (M)	0	0	1	0	1	2	0	0
	脳	所見・検査例数	68	41	50	70	70	33	33	69
		髄膜腫 (B)	1	0	1	0	0	0	0	2
		神経膠腫 (M)	1	0	2	1	0	0	1	0
	皮膚皮下	所見・検査例数	70	58	62	70	70	56	51	70
		脂肪腫 (B)	4	3	0	0	4	2	3	1
		乳頭腫 (B)	5	10	3	13	1	2	0	0
		線維腫 (B)	2	9	4	3	0	2	1	3
		真皮線維腫 (B)	1	5	2	1	0	0	0	0
		基底細胞腫 (B)	2	0	0	1	0	0	0	0
		皮脂腺腫 (B)	0	0	0	0	1	0	0	0
		血管腫 (B)	0	0	1	0	0	0	0	0
		平滑筋腫 (B)	0	0	0	1	0	0	0	0
		扁平上皮癌 (M)	0	0	0	1	0	0	1	0
		線維肉腫 (M)	1	1	1	0	0	1	0	0
	乳腺	所見・検査例数	33	20	24	45	68	50	54	68
		線維腺腫 (B)	0	0	1	0	33	24	32	18
		癌 (M)	0	0	0	1	7	2	2	5
	眼球	所見・検査例数	66	39	46	66	69	39	31	67
		黒色腫 (B)	2	0	0	0	0	0	0	0
	甲状腺	所見・検査例数	69	67	65	64	69	67	66	68
		C細胞腺腫 (B)	14	14	6	5	8	9	6	7
		濾胞状腺腫 (B)	7	6	10	7	4	1	4	3
		C細胞癌 (M)	0	0	0	0	0	1	1	0
		濾胞状癌 (M)	1	0	0	0	0	0	1	0
上皮小体	所見・検査例数	66	65	64	65	69	66	64	64	
	腺腫 (B)	1	0	1	1	1	0	0	0	
鼻腔	所見・検査例数	70	0	1	67	70	0	0	69	
	扁平上皮癌 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0	
腹腔	所見・検査例数	3	1	2	8	2	1	0	1	
	脂肪腫 (B)	0	0	0	0	0	1	0	0	
	中皮腫 (M)	0	0	0	0	1	0	0	0	
	肉腫 (M)	0	0	1	0	0	0	0	0	
口腔	所見・検査例数	9	6	8	16	22	6	6	10	
	エナメル上皮腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0	
耳	所見・検査例数	6	0	6	1	6	1	0	4	
	神経鞘腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0	
	脂肪腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0	

(B) : 良性腫瘍、(M) : 悪性腫瘍

Fischer の直接確率計算法 ↓ p<0.01 (申請者実施)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

表 2-7 腫瘍性病変

時期	性 別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	20	120	600	0	20	120	600
全動物	血液リンパ 細網系	所見・検査例数	2	2	3	4	2	1	0	0
		赤血球性白血病(M)	0	0	1	1	0	0	0	0
		顆粒球性白血病(M)	0	0	2	0	1	1	0	0
		リンパ性白血病(M)	0	0	0	2	0	0	0	0
		未分化白血病(M)	2	1	0	1	0	0	0	0
		リンパ球性リンパ腫(M)	0	1	0	0	0	0	0	0
	肢	所見・検査例数	23	29	20	22	12	5	12	6
		線維腫(B)	0	0	0	0	1	0	0	0
	骨	所見・検査例数	0	1	2	0	1	1	0	0
		骨肉腫(M)	0	1	0	0	0	0	0	0
	腫	所見・検査例数	/				10	2	4	4
		乳頭腫(B)					0	0	0	1
		扁平上皮癌(M)					0	0	1	0
	結合組織	所見・検査例数	2	3	2	1	0	0	1	0
		組織球性肉腫(M)	1	1	1	0	0	0	1	1
		肉腫(M)	1	1	1	0	0	0	1	0
合計	検査動物数		70	70	70	70	70	70	70	70
	腫瘍数	良性	111	85	83	87	125	96	98	114
		悪性	8	10	14	9	11	7	10	10
	腫瘍総数		119	95	97	96	136	103	108	124
	担腫瘍動物数	良性	51	48	46	53	65	62	56	61
悪性		9	7	12	8	11	6	10	10	

(B) : 良性腫瘍、(M) : 悪性腫瘍

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Dithiuron

1-9-3 マウスを用いた 18 ヶ月経飼投与発がん性試験

(資料 15)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1990 年

検体の純度:

試験動物: CrI: CD-1 (ICR) BR 系マウス、1 群雌雄各 51 匹 (3 匹/ケージ)、6 週齢
開始時体重範囲 雄 20.8~34.0g、雌 19.5~26.8g

試験期間: 18 ヶ月 (1987 年 2 月 16 日~1988 年 9 月 9 日)

投与方法: 検体を 0、20、100 及び 500ppm の濃度で飼料に混入し、18 ヶ月間にわたって随時
摂食させた。検体を混入した飼料は毎週 1 回調製した。

用量設定根拠: 同試験機関で実施した 4 週間の予備試験 (100、500 及び 1000ppm) の結果、
1000ppm 群では、雌雄で体重増加抑制、ヘモグロビン値、赤血球数およびヘマトク
リット値の軽度の減少、雌で肝臓および腎臓の重量の増加傾向ならびに肝臓に鉄沈
着の軽度増加がみられた。500ppm 群では、雌でヘモグロビン値、赤血球数および
ヘマトクリット値の軽度の減少並びに肝臓に鉄沈着の軽度増加がみられた。標的臓
器は肝臓、腎臓及び末梢血であり、最大耐量は 500ppm と推測されたので、本発が
ん性試験の最高濃度は 500ppm とした。

試験項目及び結果:

一般状態及び死亡率: 一般状態及び生死を毎日観察した。詳細な一般状態の観察を週 1 回行
なった。

投与開始後 9 週以降、500ppm 群の雌雄で、対照群に比較して被毛の汚れの発現頻
度が高かった。特に、雌で高い傾向がみられた。

その他、対照群を含む全群で被毛の汚れ、腹臥位、脱毛、尾部の病変、尾端の傷害
または欠失、眼球突出及び混濁がみられたが、いずれも検体投与によるものとは考
えられなかった。

試験終了時の各群の生存率は次表の通りである。

投与群 (ppm)		0	20	100	500
生存率 (%)	雄	72.5	74.5	70.6	62.7
	雌	79.6	86.3	70.6	82.4

雄では用量の増加と生存率に統計学的有意な低下傾向 ($p < 0.05$) がみられたが、対照
群との対比較では有意差は見られなかった。しかし、この生存率の差は投与による
影響を示唆している。雌の生存率は対照群との差はみられなかった。

体重変化: 投与開始当日の投与前、その後 16 週間は週 1 回、以降は 4 週間に 1 回すべての
生存動物の体重を測定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Bithioner

試験期間中の体重増加に検体投与による影響はみられなかった。

摂餌量：投与開始から 16 週間は週 1 回、その後は 4 週間に 1 回各ケージ別の摂餌量を測定した。

対照群に比し、各投与群の摂餌量に差はみられず、検体投与による影響は認められなかった。

検体摂取量：摂餌量、体重及び投与濃度から算出した 1 日当たりの平均検体摂取量 (mg/kg/日) は次のとおりであった。

性別	20ppm	100ppm	500ppm
雄	2.20	13.52	67.13
雌	2.86	16.54	84.60

(注) 申請者算出

飲水量：各群雌雄のケージ番号の若い順に 10 ケージを対象として、投与開始後 23~26 週末の間毎日飲水量を測定し、週間の飲水量を算出した。

100 及び 500ppm 群の雄では、ケージ間でばらつきも大きかったが、群平均の飲水量が、対照群 (33~36g/ラット/週) に比較して多かった (200ppm 群 38~44 g/ラット/週、500ppm 群 37~44 g/ラット/週)。雌では対照群に比し差がみられなかった。

血液学的検査：投与開始後 52、78 及び 80 週時に、対照群及び 500ppm 群の雌雄各 10 匹を対象として、尾静脈から採血し、塗抹標本を作製して白血球百分比を測定した。

検体投与による影響を示唆する変化はみられなかった。

臓器重量：試験終了時に各群雌雄各 20 匹の生存動物を対象として、解剖の後、脳、肝臓、甲状腺、腎臓及び精巢の重量を測定した。また、対体重比も算出した。

以下に対照群に比し統計学的有意差がみられた項目を表記する。

性別	雄			雌			
	投与群 (ppm)	20	100	500	20	100	500
体重				92†			
脳重量 対体重比				108†			
腎臓重量 対体重比			111†	139 ^o 151 ^o		111†	136 ^o 141 ^o

統計学的手法：t-検定 †：p≤0.05、††：p≤0.01、^o：p≤0.001

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。

100ppm 群の雄で腎臓の対体重比の増加、また雌で腎臓重量の増加がみられ、500ppm 群では雌雄で腎臓の重量及び対体重比の増加がみられた。

病理組織学的検査：試験終了時の全生存動物及び試験途中死亡動物を対象として、以下の臓器/組織を固定した。対照群及び 500ppm 群は全動物を、20 及び 100ppm 群は全動物の肺、肝及び腎並びに死亡/切迫動物の肉眼的異常部位及び腫瘤について病理標本を作製し、検鏡した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

皮膚及び乳腺、リンパ節(下顎及び腸間膜)、大動脈、唾液腺(顎下腺)、胸骨(骨髄を含む)、胸腺、気管、肺(主気管支)、心、甲状腺(上皮小体を含む)、食道、胃(胃底、幽門)、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、肝、脾、腎、副腎、胆嚢、膀胱、精嚢、前立腺、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、脳(脳幹を含む)、下垂体、坐骨神経、骨格筋(大腿)、脊髄(腰椎、頸椎、胸椎)、眼(視神経を含む)、全ての肉眼的病変部

主要な非腫瘍性病変を表 I に、腫瘍性病変を表 II に示す。

非腫瘍性病変：投与に関連のある唯一の所見は、100ppm 群の雄及び 500ppm 群の雄で慢性腎症がみられ、皮髓境界部の皮質尿細管の拡張で、好酸性物質に富んでいた。

腫瘍性病変：本系統のマウスでは、対照群を含む全群の雄で肺に腺腫及び癌、雄で肝細胞腺腫及び肝細胞癌及びリンパ系網系のリンパ腫が頻繁に認められたが、検体投与に関連した発現頻度の上昇及び早期化は認められなかった。腫瘍動物数、腫瘍総数、悪性及び良性腫瘍数にも検体投与による影響は認められなかった。

以上の結果から、本剤の 18 ヶ月間混餌投与発癌性試験における影響として、100ppm 以上の投与群で腎の重量増加及び慢性腎症がみられたので、最大無作用量は 20ppm(雄 2.20 mg/kg/day、雌 2.86 mg/kg/day)であると判断される。また、催腫瘍性はないものと考えられる。

表 I 主要な非腫瘍性病変の発現頻度

性 別	雄				雌					
	0	20	100	500	0	20	100	500		
投与群 (ppm)										
検査動物数	14	13	15	19	12	7	15	9		
途中死亡・ 切迫殺動物	肝臓 アミロイド	1	1	3	2	1	0	0	1	
	肝臓 肝細胞壊死	1	1	2	1	1	2	0	0	
	肝臓 肝細胞空胞化	3	2	1	0	0	0	0	1	
	脾臓 アミロイド	2	1	2	2	1	0	0	1	
	脾臓 髓外造血亢進	3	3	1	0	1	1	4	1	
	胃 囊胞性過形成	4	2	5	3/18	1	1	4	1	
	結腸 寄生虫	6	6	5	5	1	3	3	0	
	副腎 皮質紡錘細胞過形成	1	2	2	1	4	6	7	2	
	腎臓	アミロイド	0	0	2	0	1	0	0	1
		皮質囊胞	1	1	1	5	1	0	1	3
		慢性腎症	9	0	9	16	4	2	5	5
		尿細管拡張(線状物質を含む)	0	1	2	15	0	0	5	6
	卵巣 囊胞	—	—	—	—	7	4	7	7	
	精嚢 拡張	2	4	4	3	—	—	—	—	
	子宮 囊胞性過形成	—	—	—	—	6	5	9	6	
	心臓 心房血栓	1	0	0	1	0	0	0	0	

表中の数字は検査動物数あたりの所見数、分数で記載の数値の分母は実際に検査臓器数を表す。

—: 該当なし

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

表 I 主要な非腫瘍性病変の発現頻度 (つづき)

	性 別	雄				雌				
		0	20	100	500	0	20	100	500	
	投与群 (ppm)	0	20	100	500	0	20	100	500	
最終層殺動物	検査動物数	37	38	36	32	39	44	36	42	
	肝臓	アミロイド	2	3	3	4	0	1	2	1
		肝細胞壊死	7	3	1	6	1	1	0	3
		肝細胞空胞化	13	12	10	8	4	1	1	2
	脾臓	アミロイド	2	1/4	0/3	4	3	1/10	1/5	3
		髓外造血亢進	1	1/4	3/3	0	0	1/10	1/5	0
	胃	囊胞性過形成	7	6/7	9/10	8	5	6/14	2/3	3
	結腸	寄生虫	18	6/13	5/15	10	11	3/6	3/15	4
	副腎	皮質紡錘細胞過形成	9	0/0	1/1	6	33	0/0	0/0	26
	腎臓	アミロイド	2	1	2	4	1	2	2	0
		皮質囊胞	4	5	4	7	2	2	2/	7
		慢性腎症	22	17	21	29	16	19	21	32
		尿細管拡張(綿状物質を含む)	1	0	0	27	3	4	9	34
	卵巣	囊胞	—	—	—	—	29	27/31	26/27	33
	精囊	拡張	10	15/18	18/22	13	—	—	—	—
	子宮	囊胞性過形成	—	—	—	—	26	28/36	22/27	34
心臓	心房血栓	0	0/2	0/0	3	0	0/1	0/0	0	
全動物	検査動物数	51	51	51	51	51	51	51	51	
	肝臓	アミロイド	3	4	6	6	1	1	2	2
		肝細胞壊死	8	4	3	7	2	3	0	3
		肝細胞空胞化	16	14	11	8	4	1	1	3
	脾臓	アミロイド	4	2/17	2/18	6	4	1/17	1/20	4
		髓外造血亢進	4	4/17	4/18	0	1	2/17	5/20	1
	胃	囊胞性過形成	11	8/20	14/25	11/50	6	9/21	6/18	4
	結腸	寄生虫	18	6/13	5/15	10	11	3/6	3/15	4
	副腎	皮質紡錘細胞過形成	10	2/13	3/16	7	37	6/7	7/15	28
	腎臓	アミロイド	2	1	4	4	2	2	2	1
		皮質囊胞	5	6	5	12	3	2	3	10
		慢性腎症	31	17	30	45	20	21	26	37
		尿細管拡張(綿状物質を含む)	0	1	2	42	3	4	14	40
	卵巣	囊胞	—	—	—	—	36	31/38	33/42	40
	精囊	拡張	12	19/31	22/37	16	—	—	—	—
	子宮	囊胞性過形成	—	—	—	—	32	33/43	31/42	40
心臓	心房血栓	0	0/15	0/15	4	0	0/8	0/15	0	

表中の数値は検査動物数あたりの所見数、分数で記載の数値の分母は実際の検査臓器数を表す。

— : 該当なし

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

表 II 腫瘍性病変の発現頻度

性 別	雄				雌				
	0	20	100	500	0	20	100	500	
投与群 (ppm)									
途中死亡・切迫殺動物									
	検査動物数	14	13	15	19	12	7	15	9
全身	リンパ腫 (M)	1	3	1	3	6	2	7	3
皮下	線維肉腫 (M)	1		1					
	扁平上皮細胞癌 (M)							1	
筋肉	血管肉腫 (M)			1					
肝臓	肝細胞腺腫	1	1	3					
	肝細胞癌 (M)	2	4	3	1	1			
子宮	内膜間質性*リーフ	—	—	—	—	1		2	
	平滑筋肉腫 (M)	—	—	—	—		1	1	
肺	肺胞/気管支腺腫	2	1	1		2			
	肺胞/気管支癌 (M)	2			3	1		3	
最終屠殺動物									
	検査動物数	37	38	36	32	39	44	36	42
全身	リンパ腫 (M)		1			5	6	2	4
	白血病 (M)		1						
皮下	線維腫			1/4					
	血管腫			1/4					
	線維肉腫 (M)				1				
乳腺	腺腫					1/36	1/1	1/1	
肝臓	血管腫					1	1		
	肝細胞腺腫	4	3	9	6	1			
	肝細胞癌 (M)	7	5	6	7				
脾臓	血管腫	1							
膵臓	島細胞腺腫					1			
腎臓	腺腫			1					
精巣	間質細胞腫	2				—	—	—	—
卵巣	顆粒膜卵胞膜細胞腫	—	—	—	—			1/27	
	乳頭状腺腫	—	—	—	—	1			
	管状腺腫	—	—	—	—				1
子宮	内膜間質性*リーフ	—	—	—	—	3	4/36	3/27	5
	平滑筋腫	—	—	—	—	2			1
	内膜間質性肉腫 (M)	—	—	—	—		1/36		
	平滑筋肉腫 (M)	—	—	—	—			1/27	1
肺	肺胞/気管支腺腫	3	6/37	3/35	4	1	6	3	4
	肺胞/気管支癌 (M)	5	4/37	6/35	5		3	4	3
下垂体	腺腫					2			2/40
腫	平滑筋腫	—	—	—	—	1/1			
	線維肉腫 (M)	—	—	—	—		1/1		
ハダ	腺腫		1/1						

空欄は腫瘍の発生なし。(M)は悪性腫瘍、無印は良性腫瘍を表す。

表中の数値は検査動物数あたりの所見数、分数で記載の数値の分母は実際の検査臓器数を表す。

—：該当なし

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

表Ⅱ 腫瘍性病変の発現頻度 (つづき)

性 別		雄				雌				
		0	20	100	500	0	20	100	500	
全動物										
検査動物数		51	51	51	51	51	51	51	51	
全身	リンパ腫 (M)	1	4	1	3	11	8	9	5	
	白血病 (M)		1							
皮下	線維腫			1						
	血管腫			1						
	扁平上皮細胞癌 (M)							1		
	線維肉腫 (M)	1		1	1					
乳腺	腺腫					1	1	1		
筋肉	血管肉腫 (M)			1						
肝臓	血管腫					1	1			
	肝細胞腺腫	5	4	12	6	1				
	肝細胞癌 (M)	9	9	9	8	1				
脾臓	血管腫	1								
脾臓	島細胞腺腫					1				
腎臓	腺腫			1						
精巣	間質細胞腫	2				-	-	-	-	
卵巣	顆粒膜卵胞膜細胞腫	-	-	-	-			1		
	乳頭状腺腫	-	-	-	-	1				
	管状腺腫	-	-	-	-				1	
子宮	内膜間質性*リーフ	-	-	-	-	4	4	5	5	
	平滑筋腫	-	-	-	-	2			1	
	内膜間質性肉腫 (M)	-	-	-	-		1			
	平滑筋肉腫 (M)	-	-	-	-		1	2	1	
肺	肺胞/気管支腺腫	5	7	4	4	3	6	3	4	
	肺胞/気管支癌 (M)	7	4	6	7	1	3	7	3	
下垂体	腺腫					2			2	
腫	平滑筋腫	-	-	-	-	1				
	線維肉腫 (M)	-	-	-	-		1			
ハダゲ-腺	腺腫		1							
全試験動物	検査動物数		51	51	51	51	51	51	51	
	腫瘍数	良性	13	12	19	10	17	12	10	13
		悪性	18	18	18	19	13	14	19	9
		合計	31	30	37	29	30	26	29	22
	腫瘍動物数	良性	11	12	18	9	15	11	10	12
		悪性	17	17	17	19	12	14	18	9
合計		25	25	30	25	24	21	26	19	

空欄は腫瘍の発生なし。(M)は悪性腫瘍、無印は良性腫瘍を表す。

表中の数値は検査動物数あたりの所見数、分数で記載の数値の分母は実際の検査臓器数を表す。

- : 該当なし

1-10 繁殖毒性及び催奇形性

1-10-1 繁殖毒性試験

評価対象試験からの除外依頼(資料 16)

ラットに対する 3 世代繁殖毒性試験は、最初の試験がハンティンドン リサーチ センター(1969)で実施され、その結果の抄録(1-9-1-1 ; 資料 16)を次頁以降に記載したが、以下の理由で評価の対照から除外していただきたい。1991 年に 2 世代繁殖毒性試験を GLP 対応試験としてヘーゼルトンラボラトリーズ(ドイツ)(1-9-1-2 ; 資料 17)で再実施しているため、繁殖毒性試験は資料 17 で評価していただきたい。

評価対象から除外する理由

- 1) 動物数:当初雌動物数を 20 匹で開始しているが、概して対照群の妊娠率が低く、評価に耐えられる妊娠雌数を確保できていない(妊娠雌数は全世代を含め群当り 11~19 匹の間でばらついている)。したがって、総出生児数にばらつきが大きく、児の評価も適切に行えない。
- 2) 体重の測定:各親世代の交配前期間のみの測定で、母動物については妊娠、哺育期間中の測定がない。児動物の体重も出生児及び生後 21 日のみの測定である。
- 3) 摂餌量の測定:P 世代は交配前期間(14 週間)のみ測定し、哺育、妊娠期間中の測定がない。F1 及び F2 世代は全く測定されていない。

1-10-1-1 ラットを用いた3世代繁殖毒性試験(評価対象から除外する成績)

(資料 16)

試験機関:

報告書作成年: 1969年

検体の純度:

試験動物: CD系ラット(投与開始時40日齢) 1群雄10匹、雌20匹

投与開始時体重範囲 雄179~180g、雌153~156g

なお、各世代で、群あたり雌4匹、雄2匹を死亡時の補充用として、試験群と同じ投与を行った。

投与期間: P世代: 投与開始からF₁b児離乳までの33週間

F₁世代: 離乳からF₂b児離乳までの31週間

F₂世代: 離乳からF₃b児離乳までの31週間

投与方法: 検体を0、20、200及び500ppmの濃度で混合した飼料を自由摂取させた。検体を混入した飼料は1週に1回調製した。なお、対照群には無処理の飼料のみを投与した。

投与量設定根拠: は、果実中における最大残留量3ppm、フードファクターを250gと仮定して求めた1日当りの検体摂取量の約100倍を最低用量として設定した。

方法及び試験項目: 試験の概要を次頁の表にまとめた。

親動物

一般状態及び死亡率: 全動物について、一般状態及び生死を毎日観察した。死亡親動物の剖検を行ない死因を調べた。

体重: 投与開始前に測定し、その後は第1回交配時まで週1回測定した。

摂餌量: P世代について、投与開始後から12週間にわたり週1回測定した。

交配方法及び交尾の確認: 交配は雌雄2対1で同居させて行った。

妊娠率または妊娠期間に検体の影響が推察されるような結果が認められた場合、次の交配期間中に膣垢を検査し、発情サイクル及び交尾を確認した。

繁殖性に関する指標: 出産時に、各雌親動物について妊娠期間、出産及び哺育時の観察に基づき、次の指標を算出した。

妊娠率(%): 出産した雌動物数/交配に用いた雌動物数 x 100

妊娠期間(日): 交配初日から出産日までの日数

肉眼的病理検査: 死亡あるいは切迫殺動物は可能な限り死因を検査した。死亡動物は同様の処置を行なった予備動物と交換した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

世代	期間(週間)	作業手順	試験項目		
P	生育 (14週) 第1回交配 (3週) 妊娠 (3週) F _{1a} 出産	雌雄 2 : 1 で交配	体重、摂餌量を週1回測定。 交配状況の観察。 出産状況の観察。 出産児数、生存児数、死産児数、外表異常、同腹生存児体重測定。 児動物の生死、哺乳状況の観察。		
	哺乳 (3週)			生存児体重測定、性別、肉眼的病理検査。異常が疑われる児動物について骨格検査。	
	休息 (1.5週) 第2回交配 (3週) 妊娠 (3週) F _{1b} 出産	(第1回交配に準ずる)	(第1回交配に準ずる)	(F _{1a} に準ずる) (F _{1a} に準ずる) 親動物を屠殺破棄。 児動物の体重測定。継代用以外の児動物を屠殺し、性別、肉眼的病理検査。異常が疑われる児動物について骨格検査。 死亡親動物の剖検	
	哺乳 (3週) 離乳				継代用の雄12匹、雌24匹を選抜
	F ₁	生育 (11週) 第1回交配 (3週) 妊娠 (3週) F _{2a} 出産	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる) (P世代に準ずる)	
		哺乳 (3週) 離乳			(F _{1a} に準ずる) (F _{1a} に準ずる) (F _{1a} に準ずる)
		休息 (1.5週) 第2回交配 (3週) 妊娠 (3週) F _{2b} 出産	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)	(F _{1a} に準ずる) (F _{1a} に準ずる) (F _{1a} に準ずる)
		哺乳 (3週) 離乳			
		F ₂	生育 (11週) 第1回交配 (3週) 妊娠 (3週) F _{3a} 出産	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる) (P世代に準ずる)
			哺乳 (3週) 離乳		
休息 (1.5週) 第2回交配 (3週) 妊娠 (3週) F _{3b} 出産			(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)	(F _{1a} に準ずる) (F _{1a} に準ずる)
哺乳 (3週) 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 BASF ジャパン株式会社にある。

児動物

一般状態の観察：出生時の外表異常の検査、離乳まで生死及び異常について毎日観察した。

産児数：生後 0 日における生存児と死亡児数を調査した。

腹あたり産児数 = 総産児数 (生存児数 + 死亡児数) / 生存児を出産した腹数

性比 (%)：雄生存児数 / 離乳時 (生後 21 日) の総生存児 (雄 + 雌)

離乳時生存児数 A：離乳時生存児数 / 離乳腹数

離乳時生存児数 B：離乳時生存児数 / 生存児を出産した腹数

死亡率 (%)：(総産児数 - 離乳児数) / 総産児数

児体重：出生時及び生後 21 日に測定した。

発生異常：F_{3b} 世代の全児動物を生後 21 日に屠殺し、内臓及び外表の詳細な検査を行った。

動物を離乳時に屠殺し、性別の判定及び肉眼的病理検査を行い、異常が認められた児動物については、さらに詳細な内臓検査及び骨格検査を行った。

臓器重量：生後 21 日に F_{3b} 世代の児動物から各群雌雄それぞれ約 12 匹をできるだけ多くの腹から選定して剖検後、以下の臓器重量を測定して対体重比を算出した。

脳、下垂体、甲状腺、胸腺、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、生殖腺

病理組織学的検査：上記の臓器重量を測定した F_{3b} 世代の対照群及び 500ppm 群の児動物を対象として、重量測定臓器を含め、脾臓、膀胱、骨、骨髓、胃 (腸胃を含む)、小腸及び大腸について病理組織標本作製してヘマトキシリン・エオジン染色して検鏡した。又、肝及び腎はオイル赤 O 染色も行なった。

結果：

表1 親動物の繁殖性

世代		親：P 児：F ₁				親：F ₁ 児：F ₂				親：F ₂ 児：F ₃			
投与量 (ppm)		0	20	200	500	0	20	200	500	0	20	200	500
供試動物数	雄	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	雌	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	24
一般状態													
死亡雌数	a								2 ⁽¹⁾				
	b						1 ⁽¹⁾		1			1	
死亡率 (a+b) (%)	雄												
	雌						6		15			5	
妊娠雌数	a	12	16	19	19	15	18	17	19	15	15	18	17
	b	11	14	16	17	14	12	14	10	15	14	12	12
妊娠率 (%)	a	60	80	95	95	75	90	85	95	75	75	90	71
	b	55	70	80	85	70	60	70	50	75	70	60	50
全児損失腹数	a				2			1	5 ⁽²⁾		1		
	b		1	1	1		1	1	3 ⁽³⁾	1	3	1 ⁽³⁾	
離乳時生存児 のいる腹数	a	12	16	19	17	15	18	16	14	15	14	18	17
	b	11	13	15	16	14	11	13	7	14	11	11	12
体重変化 (g) (生育期間)	雄	307	309	306	281	460	464	456	447	484	470	442	436
	雌	129	140	130	116	266	264	268	249	254	263	247	266
摂餌量 (g/77t/日) (生育期間)	雄	150	151	155	153	—	—	—	—	—	—	—	—
	雌	113	117	111	108	—	—	—	—	—	—	—	—
妊娠期間 (日) (4)	a	27.6	24.8	26.1	26.0	26.3	24.6	23.2	24.8	26.0	25.0	25.7	25.9
	b	29.4	23.4	26.3	25.8	27.1	26.0	25.6	29.9	24.7	25.4	24.8	24.5
肉眼的病理検査													

空欄は影響なし、又は発生なし。 — は調査せず。

(1) 死亡、あるいは切迫殺(難産)のため、予備動物に換えた。

(2) 分娩時死亡2例を含む。

(3) 分娩時死亡1例を含む。

(4) 同居開始から分娩までの期間

親動物 (表1)

一般症状：投与に起因する顕著な反応は見られなかったが、500ppm 群では3世代を通じて、また200ppm 群ではF_{2b}世代の間、毛繕い不良の一定した印象を受けた。

死亡率：F_{1b}及びF_{2b}世代で死亡、難産あるいは乳腺腫瘍のため切迫殺が散見されたが投与による影響はなかった。

体重の変化：交配前期間中の体重増加は、雄では500ppm 群のF₀及びF_{2b}世代、200ppm 群のF_{2b}世代で対照群に比し抑制された(それぞれ対照群に比し92、90、91%)。雌では500ppm 群のF₀世代でのみ対照群に比し低体重であった(対照群に比し90%)。

摂餌量：F₀世代の交配前期間中の摂餌量に投与に起因する影響はなかったため、他の世代については測定しなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

妊娠率/妊娠期間：各試験群の妊娠率/妊娠期間は全般的に対照群と比較して差がみられなかった。

全同腹児損失腹数：試験期間中、時々試験動物の全同腹児が離乳前に死亡する腹が散見されたが、各交配において、一定の傾向もなく、統計学的有意差もなかった。しかし、全世代にわたる合計で見ると次表のとおり 500ppm 群で統計学的に有意に高かった。

投与量 (ppm)	0	20	200	500
全児損失腹数	1	6	4	11
損失割合%	1.2	6.7	4.2	11.7↑

統計学的手法： χ^2 検定 1: $p \leq 0.05$ 。

児動物(表 2 及び 3)

出産児数：出産時の総児数及び生存児数に投与関連性のある一定の変化はなかった。

児体重：3 世代を通じ出生時平均体重及び離乳時平均体重ともに統計学的有意差は認められなかったが、500ppm 群における離乳時平均体重は F_0 世代の 1 回目交配を除き、一貫して対照群より低い傾向にあった。

児死亡率： F_0 及び F_{16} 世代では、児死亡は生後 0~4 日に主にみられ、特に全同腹児が死亡した場合に多かった。 F_{26} 世代では死亡が主として生後 5~21 日の間に生じた。 F_0 世代の対照群で異常に高い死亡率を示した 2 回目交配を除いて、20 及び 200ppm 群の離乳までの総死亡率は多くの交配で概して高かった。500ppm 群でも同様な傾向が F_0 及び F_{16} 世代で明らかで、高い有意性があり、 F_{16} 世代の 2 回目交配で明らかに用量関連性のある増加がみられた。しかし F_{26} 世代では 20 ppm 群が最も高く、500ppm 群では対照群と差がなく、用量相関性がなかった。従って、世代を通して明確な一定の傾向もなく、用量関連性もないことから検体投与による影響とは考えられなかった。

発生異常：投与に関連のある異常はみられなかった。

肉眼的及び顕微鏡的検査：最終世代 (F_{26}) の離乳児の検査で投与関連性のある形態学的変化は何ら認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

表 2 児動物(腹あたり)

世代		親: P 児: F ₁				親: F ₁ 児: F ₂				親: F ₂ 児: F ₃				
検査量 (ppm)		0	20	200	500	0	20	200	500	0	20	200	500	
出生児総数	a	156	208	236	242	174	223	207	194	202	190	217	221	
	b	134	183	191	201	167	127	173	95	185	178	146	150	
産児数	a	13.0	13.0	12.4	13.4	11.6	12.4	12.2	11.4	13.4	12.6	12.0	13.0	
	b	12.2	14.1	11.9	12.6	11.9	10.6	12.4	11.9	12.3	12.7	12.2	12.5	
出生時生存児数	a	12.8	12.8	12.4	13.2	11.5	12.3	11.9	10.8	13.3	12.3	11.8	12.9	
	b	12.0	14.0	11.9	12.1	11.9	10.5	12.1	11.6	12.2	12.6	10.9	12.1	
離乳時生存児数 A	a	12.3	10.9	11.3	11.1	10.7	9.9	9.9	10.6	10.3	8.3	8.5	10.0	
	b	8.6	11.1	10.7	9.9	9.6	9.6	9.1	8.1	9.1	4.4 [†]	6.6	8.7	
離乳時生存児数 B	a	12.3	10.9	11.3	10.4	10.7	9.9	9.3	8.7	10.3	7.7 [†]	8.5	10.0	
	b	8.6	11.1	10.0	9.9	9.8	8.8	8.4	7.1	8.5	3.4 [†]	6.1	8.7	
離乳児性比 (%)	a	55	53	50	43	53	49	41	52	49	54	48	49	
	b	44	44	50	54	51	47	52	58	53	57	56	49	
児死亡率 (%) (e)	a	生後 0-4 日	3.2	13.0 ^{††}	7.2	12.4 ^{††}	1.1	7.2 ^{††}	8.8 ^{††}	7.2 ^{††}	5.0	3.9	7.8	8.8
		生後 5-21 日	1.3	2.4	1.7	4.0	5.9	12.6	9.8	4.2	18.3	31.3 ^{††}	21.7	14.5
		生後 0-21 日	5.0	16.3 ^{††}	8.9	16.4 ^{††}	8.0	19.7 ^{††}	18.6 ^{††}	11.4	23.3	36.2 ^{††}	29.5	23.1
	b	生後 0-4 日	13.4	8.2	9.1	11.4	9.6	7.0	20.0 ^{††}	16.7	2.7	2.9	3.8	4.7
		生後 5-21 日	15.7	1.1	5.3	9.0	9.6	0.9	5.3	10.3	27.7	61.8 ^{††}	41.4 ^{††}	26.0
		生後 0-21 日	29.1	21.3	14.4	20.4	19.2	7.8	26.3	26.9	30.4	64.7 ^{††}	45.1 ^{††}	30.7
体重 (g) (d)	出生時	a	6.2	5.8	5.8	5.6	5.0	6.1	5.8	5.7	5.1	5.8	5.8	5.8
		b	5.9	5.7	5.9	5.7	6.1	5.5	6.2	6.1	5.8	5.8	6.1	5.9
	離乳時	a	50.7	55.3	55.3	51.3	53.0	49.7	50.7	47.2	60.2	57.0	60.1	55.6
		b	54.5	59.0	56.3	52.6	53.0	53.7	53.5	52.5	59.7	58.5	61.6	55.9

(e) 児死亡率は離乳時に生存児がいる腹について示し、全例が死亡した腹は含まれていない。

統計学的手法: 児死亡率は χ^2 検定、離乳時生存児数は分散分析:

†: $p \leq 0.05$, ††: $p \leq 0.01$, †††: $p \leq 0.001$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

臓器重量：相対臓器重量における差は主として体重差に起因すると考えられた。500ppm 群の腎臓、肝臓及び副腎(雄のみ)重量の増加、並びに 200ppm 群の腎臓(雄のみ)重量の増加は投与に起因していると考えられた。その他の変化は用量関連性もないので投与関連性はないと考えられた。

表 3 F_{3b} 世代雌乳児の臓器重量

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		20	200	500	20	200	500
体重		98	112†	95	111	113	91
肺	重量	115			124		
	対体重比	117†			113†		
肝	重量		105	103	102	105	98
	対体重比		94↓	108†	93↓	94↓	107†
腎	重量		119	106			99
	対体重比		105†	112†			108†
副腎	重量			105			
	対体重比			115†			
脳	重量		104				
	対体重比		93↓				
脾臓	重量		136				
	対体重比		122†				

(e) 臓器重量は対照群に対するものとして統計学的に有意な場合のみ示した。空欄は「有意差なし」を意味する。
統計学的手法：分散分析 †；p ≤ 0.05

以上の結果から、ジチアノンをラットの 3 世代に互り混餌投与した影響として、親動物に対して 200ppm 群で F₂ 世代及び 500ppm 群で各世代に互り体重増加抑制、又 500ppm 群で全児が死亡した腹(全児損失腹)の割合が多かったことから、親動物に対する無毒性量は 20ppm と判断される。

児動物に対して 500ppm 群における離乳時平均体重は F₀ 世代の 1 回目交配を除き、一貫して対照群より低い傾向にあり、又 F₃ 世代雌乳児の腎臓、肝臓及び副腎(雄のみ)重量の増加、並びに 200ppm 群の腎臓(雄のみ)重量の増加がみられたことから無毒性量は 20ppm と判断される。

また、20ppm 以上の投与群で児動物の死亡率の増加が認められたが、世代を通して明確な一定の傾向もなく、用量関連性もないことから検体投与による影響とは考えられなかった。従って、繁殖性に対する無毒性量は 20ppm 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 BASF ジャパン株式会社にある。

1-10-1-2 ラットを用いた 2 世代繁殖毒性試験 (資料 17)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1991 年

検体純度:

試験動物: SPF Sprague Dawley Cr1: CD(SD)BR 系ラット

P 世代: 1 群雄 28 匹、雌 28 匹、投与開始時 6 週齢、

体重範囲 雄 163~207g、雌 121~166g

F1 世代: 1 群雄 25 匹、雌 25 匹、投与開始時 3 週齢

投与期間: P 世代: 投与開始から F1 児離乳時まで(生育期間 約 100 日)の約 24 週間

F1 世代: 離乳時から F2 児離乳時まで(生育期間 約 100 日)の約 24 週間

F2 世代: 離乳時までの 3 週間

(1989 年 1 月 11 日~1990 年 1 月 9 日)

投与方法: 検体を 0(対照)、35、200 または 600ppm の濃度で混合した飼料を自由に摂取させた。

なお、対照群の動物には、基礎飼料のみを同様に摂取させた。

投与量設定根拠: 投与用量は、ラットの 3 世代繁殖試験、90 日間混餌投与試験の結果及び 104 週間混餌投与慢性毒性・発癌性試験のデータに基づいて決定した。

(1) 3 世代繁殖試験 (資料 16)

0、20、200 または 500ppm の混餌を CD 系ラットに投与し、各世代 2 回交配を行い F3 児動物離乳時まで飼育した。親動物に対する検体投与の影響は、200ppm 投与群の F2 雄と 500ppm 投与群の F0 雄、F1b 雌及び F2b 雄に体重増加の抑制が認められた。また、500ppm 投与群では、雌雄の肝臓及び腎臓と雄の副腎に相対重量の増加が認められた。児動物に対する検体投与の影響は、500ppm 投与群でいずれの世代でも離乳前に全同腹児損失腹数の増加傾向がみられた。

(2) 90 日間混餌投与試験(資料 8)

0、30、180 または 1080ppm の混餌を Sprague Dawley 系ラットに投与した。その結果、1080ppm 投与群で体重増加の抑制が認められた。30 及び 180ppm 投与群では、検体投与の影響はみられなかった。

(3) 104 週間混餌投与慢性毒性・発癌性試験(資料 14)

0、20、120 または 600ppm の混餌を Cr1:CD(SD)BR 系ラットに投与した結果、600ppm 群雌雄で体重が抑制された。

これらの結果から、2 世代繁殖試験の用量をそれぞれ 600、200 及び 35ppm 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 BASF ジャパン株式会社にある。

交配・調整・選抜及び観察・検査項目：概要を以下にまとめた。

世代	期間	作業手順	観察/検査項目
P	生育 (100日間)		生死：毎日2回観察。 一般状態：毎日1回観察。 体重：週1回測定。 摂餌量：2~3日に1回測定。
	交配(3週間)	雌雄1:1で交配。2週間経過しても交尾の認められない雌は別の交尾能確認雄と交配。交配は膣垢検査で精子又は膣栓の有無で確認(妊娠0日)。	体重を週1回測定。 交配状況の観察
	妊娠(3週間)		体重：妊娠0, 7, 14, 20日に測定 摂餌量：週1回測定。
	出産	(哺育1日)	出産状況の観察 出産児数、生存児数、死亡児数、外表異常、性別。
	哺育(3週間)	哺育4日に1腹の同腹児数を雄4匹、雌4匹に調整(不可能なとき、合計8匹)。	母動物： 体重：哺育1, 4, 7, 14, 21日に測定。 摂餌量：哺育1週は2回、以降週1回測定。 児動物： 生存児数・体重測定：哺育1, 4, 7, 14, 21日 外表/内臓異常検査：死亡児及び哺育4日の淘汰児について。 機能検査：生後8日—平面立ち直り反応、 生後18日—自由落下反応、 生後21日—瞳孔反射/聴覚反応。
F1	離乳	總代用の各群雌雄各25匹を各腹からできる限り1匹ずつ無作為に選抜。	親動物： 肉眼的病理検査：全群の雌雄について。 病理組織学的検査：対照群と高用量群について。 臓器重量の測定：雌の精巣と精巣上体。 雌の子宮の検査。 児動物：總代用に選抜しなかった離乳児の肉眼的病理検査。
	生育(100日間)		(P世代に準ずる)
	交配(3週間)	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
	妊娠(3週間)		(P世代に準ずる)
	出産		(P世代に準ずる)
	哺育(3週間)	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
	離乳		(P世代に準ずる)
F2			全児動物を離乳直後に屠殺して肉眼的病理検査。

親動物

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について毎日観察した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

体重： 交配前投与期間(投与 1~99 日)中及び交配期間中、毎週体重を測定した。交配雌は妊娠 0、7、14、20 及び哺育 1、4、7、14、21 日に体重を測定した。

摂餌量： 交配前投与期間中は 2~3 日に 1 回の割合で摂餌量を測定した。交配雌は妊娠 0-7、7-14 及び 14-20 日ならびに哺育 1-4、4-7、7-14 及び 14-21 日に測定した。

検体摂取量： 生育期間、妊娠期間及び哺育期間中の体重、摂餌量及び飼料中の設定検体濃度から検体摂取量(mg/kg/day)を算出した。

交配及び妊娠の確認： 雌雄 1:1 で同居させ、翌日、膣栓及び膣垢中の精子により交尾を確認し、確認日を妊娠 0 日とした。妊娠は出産及び子宮内の着床痕の有無によって確認した。同居 2 週間が経過しても交配を確認できない雌は交尾能の確認されている同じ群の別の雄と 1 週間交配した。

繁殖性に関する指標： 交配、妊娠及び哺育期間と剖検時の観察に基づき、以下の指標を算出した。

交尾までの日数 = 交尾までに要した日数の合計 / 交尾した動物数 × 100

交尾率(%) = 交尾した動物数 / 交配に用いた動物数 × 100

妊娠率(%) = 妊娠した動物数 / 交尾した動物数 × 100

受精率(%) = 妊娠した動物数 / 交配に用いた動物数 × 100

出産率(%) = 生存児を有する動物数 / 妊娠した動物数 × 100

妊娠期間： 交配日(妊娠 0 日)から出産日(哺育 1 日)までの期間を日数で表した。

着床数： 剖検時に子宮内の着床痕の数を数えた。

臓器重量： 雄について精巣及び精巣上体の重量を測定した。

肉眼的病理検査： すべての F0 及び F1 親動物について児の離乳後に剖検を行なった。

病理組織学的検査： 対照群と高用量群の P 及び F1 親動物について、生殖器官(雄の精巣、精巣上体、精囊、凝固腺及び前立腺、雌の卵巣、頸部を含む子宮及び膣)及び下垂体並びに肉眼的異常部位の病理標本を作製し、鏡検した。

見動物：

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について毎日観察した。

出産時に出産児数、生存児数、死亡児数を調べた。

生存児に関し以下の指標を算出した。

出生時生存児率(%) = 生存児数 / 総出産児数 × 100

哺育 4 日生存率(%) = 哺育 4 日の生存児数 / 出産時の生存児数 × 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 BASF ジャパン株式会社にある。

哺育 7 日生存率(%) = 哺育 7 日の生存児数/哺育 4 日の調整後児数 x100
哺育 14 日生存率(%) = 哺育 14 日の生存児数/哺育 7 日の生存児数 x100
哺育 21 日生存率(%) = 哺育 21 日の生存児数/哺育 14 日の生存児数 x100
離乳率(%) = 哺育 21 日の生存児数/哺育 4 日の調整後児数 x100
性比 = 雄又は雌の児数/総児数 x100

体重： 哺育 1、4、7、14 及び 21 日に雌雄別に 1 腹分まとめて重量を測定し、腹及び児当たりの平均体重を求めた。

機能検査：以下の指標について陽性反応率(%)を調べた。

平面立ち直り反応(哺育 8 日)
自由落下反応(哺育 18 日)
瞳孔反射(哺育 21 日)
聴覚反応(哺育 21 日)

病理学的検査：死亡及び屠殺したすべての児動物について剖検を行なった。

試験結果：

親動物：

一般状態：いずれの世代においても検体投与に起因する死亡及び異常所見は認められなかった。

体重： 600ppm 群において、P 世代では投与期間中、抑制がみられ、雄では交配前の 43～99 日まで統計学的に有意に低かったが、雌では統計学的有意差はないが一貫して低かった。F1 世代では、600ppm 群の雌雄とも一貫して体重は低く、一時的に有意な低下が認められたのみであった。

35 及び 200ppm 群の体重は、P 及び F1 両世代雌雄とも対照群の値とほぼ同じであった。なお、200ppm 群雌の P 世代でのみ生育期間から哺育時までほぼ一貫して有意な増加が見られたが、用量関連性がなく、又妊娠及び哺育時の体重増加に対照群との差もないことから検体投与に関連がないと考えられた。

摂餌量：600ppm 群において、両世代の雌雄とも生育期間中ほぼ一貫して対照群より少なく、P 世代雄はほぼ全生育期間にわたり有意に少なく、F1 世代雄及び両世代の雌は時々有意に少なかった。雌の妊娠期間中、両世代ともほぼ一貫して対照群に比し少なく、時々有意に少なかった。哺育期間中は対照群とほぼ同じであった。

35 及び 200ppm 群では、両世代とも散発的に有意な高低がみられたが、総摂餌量は対照群の値とほぼ同じであった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

臓器重量：200ppm 群で P 世代の左精巣上体重量の低値がみとめられたが、左右合計で有意差もなく、F1 世代で対照群との差もないことから検体投与の影響とは考えられない。

肉眼的病理検査：いずれの世代においても検体投与に起因する異常は認められなかった。雄親動物の精巣及び精巣上体の重量は、P と F1 の両世代とも投与群と対照群でほぼ同じであった。

病理組織学的検査：下垂体及び生殖器官に対し、いずれの世代においても検体投与に起因する異常は認められなかった。

雌繁殖能：いずれの群においても、両世代における検査したすべての指標に検体投与の影響は認められなかった。

児動物：

いずれの群においても、両世代における検査したすべての指標に検体投与の影響は認められなかった。

以上の結果から、2 世代にわたって 600ppm までの混餌を投与した結果、600ppm 群で P 及び F1 雌雄親動物の体重と摂餌量の低下が認められた。繁殖能及び児動物に対する影響は、いずれの群においても認められなかった。200ppm 以下の用量では特に毒性影響は認められなかったの
で、無毒性量は親動物に対し 200ppm (P : 雄 13.1mg/kg、雌 15.8mg/kg、F1 : 雄 14.6mg/kg、雌 15.7mg/kg)、児動物に対して 600ppm (F1 : 雄 38.1mg/kg、雌 46.1mg/kg、F2 : 雄 44.2mg/kg、雌 46.8mg/kg) であると判断する。繁殖については 600ppm (F1 : 雄 38.1mg/kg、雌 46.1mg/kg、F2 : 雄 44.2mg/kg、雌 46.8mg/kg) でも影響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 BASF ジャパン株式会社にある。

01100101

親動物

世代		親 : P				親 : F1				
投与量 (ppm)		対照群	35	200	600	対照群	35	200	600	
動物数	雄	28	28	28	28	25	25	25	25	
	雌	28	28	28	28	25	25	25	25	
死亡/切迫殺数	雄	0	0	1	0	0	1	0	0	
	雌	0	0	0	0	1	0	0	0	
交尾雌数		28	28	28	28	24	24	25	25	
妊娠雌数		27	27	26	26	22	22	23	25	
出産雌数		27	27	26	26	22	22	23	25	
出産1日に生存児を有する雌数		27	27	26	25	22	21	23	25	
離乳時に生存児を有する雌数		22	25	25	24	17	18	17	21	
一般状態	雄 雌	いずれの世代においても検体投与に起因する異常は認められなかった。								
体重(g)	雄生育期	試験 99日	518.6	521.9	518.3	490.3↓	504.5	526.9	518.1	484.6
	雌生育期	試験 99日	258.7	266.8	281.0↑	252.5	266.4	271.5	274.0	253.7
	雌妊娠時	妊娠 0日	255.7	262.6	276.3↑	247.2	261.6	266.0	273.6	250.3
		妊娠 20日	361.6	368.0	378.6	353.6	361.6	366.3	372.9	354.0
	雌哺乳時	哺乳 1日	265.7	270.7	286.4↑	264.5	264.2	264.3	280.4	257.1
		哺乳 21日	305.4	311.6	320.3	298.0	299.8	304.2	308.2	297.9
体重増加(g)	雄生育期	試験 1-99日	335.8	338.2	336.4	307.8↓	390.6	409.0	404.0	373.6
	雌生育期	試験 1-99日	119.5	126.2	140.8↑	114.3	165.1	164.5	173.4	158.6
	雌妊娠時	妊娠 0-20日	105.91	105.36	103.32	106.42	99.99	100.25	99.26	103.78
	雌哺乳時	哺乳 1-21日	39.73	40.90	33.91	33.56	35.57	39.89	27.75	40.75
摂餌量(g/ラット)	雄生育期	試験 1-99日	27.1	26.4	26.1	24.6	25.8	26.5	25.6	24.5
	雌生育期	試験 1-99日	17.9	17.9	18.6	16.6	17.8	17.4	17.4	16.2
	雌妊娠時	妊娠 0-20日	21.57	21.21	20.97	19.52↓	20.44	20.29	20.48	19.86
	雌哺乳時	哺乳 1-21日	38.3	45.96↑	41.43	38.45	32.8	42.2	35.3	38.3
検体採取量(mg/kg)	雄生育期	試験 1-99日	-	2.3	13.1	38.1	-	2.6	14.6	44.2
	雌生育期	試験 1-99日	-	2.8	15.8	46.1	-	2.8	15.7	46.8
	雌妊娠時	妊娠 0-20日	-	2.2	11.6	35.3	-	2.1	11.8	36.1
	雌哺乳時	哺乳 1-21日	-	4.6	24.0	73.5	-	4.3	21.1	71.8
臓器重量(%) ¹⁾	左精巣上体			92↓						
肉眼的病理所見	雌雄	いずれの世代においても検体投与に起因する異常は認められなかった。								
病理組織学的所見	雌雄	いずれの世代においても検体投与に起因する異常は認められなかった。								
繁殖能	平均交尾までの日数		2.4	2.4	2.9	2.5	2.5	3.1	2.2	3.3
	交尾率(%)		100	100	100	100	100	96.0	100	100
	妊娠率(%)		96.4	96.4	92.9	92.9	91.7	91.7	92.0	100
	受精率(%)		96.4	96.4	92.9	92.9	91.7	88.0	92.0	100
	出産率(%)		100	100	100	100	100	95.5	100	100
	妊娠期間(日)		22.0	22.0	22.0	21.9	22.0	22.0	22.0	22.0
	着床数		12.3	13.0	13.1	13.5	12.0	13.5	12.4	13.3

¹⁾ 臓器重量は統計学的有意差の見られたもののみ対照群に対する比率%を示す。

統計学的方法：体重、体重変化及び摂餌量：Dunnettの多重比較検定、

臓器重量、交尾までの日数、妊娠期間、着床数：Student-Newman-Keulsの多重比較検定

↑：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 BASF ジャパン株式会社にある。

児動物

世代		親 : P 児 : F1a				親 : F1 児 : F2a				
投与量 (ppm)		対照群	35	200	600	対照群	35	200	600	
動物数	雄	28	28	28	28	25	25	25	25	
	雌	28	28	28	28	25	25	25	25	
出産日に生存時を有する雌数		27	27	26	25	22	22	23	25	
出産 児数	合計	11.4	11.7	11.9	12.1	11.2	12.2	10.8	12.0	
	生存児数	10.9	11.3	11.6	11.8	10.8	11.1	10.6	11.6	
	死亡児数	0.4	0.4	0.3	0.3	0.4	0.8	0.2	0.3	
生存 率 (%)	出生時	96.7	97.2	97.0	97.2	97.8	94.3	98.1	98.6	
	生後 4 日	83.5	92.9	87.8	94.3	74.9	82.2	74.7	79.6	
	生後 7 日	87.3	96.4	97.8	95.3	93.3	95.8	97.8	99.4	
	生後 14 日	84.2	91.5	88.0	89.6	85.1	92.9	96.6	89.3	
	生後 21 日	98.8	97.7	95.9	98.9	100.0	100.0	98.8	98.0	
	離乳率 (%)	72.6	88.6	83.1	84.3	83.6	89.6	94.1	86.3	
性比 (雄 : 雌)	出生時	50:50	55:45	51:49	52:48	48:52	52:48	49:51	50:50	
	離乳時	46:54	53:47	50:50	51:49	51:49	52:48	52:48	50:50	
体重 (g)	生後 1 日	腹	56.9	65	62.1	65.6	55.9	59.8	56.1	60.1
		児	5.8	5.9	5.8	5.9	5.6	5.6	5.8	5.5
	生後 4 日	腹	68.4	84.7	78.6	82.8	69.7	82.8	72.3	83.6
		児	7.4	8.0	7.8	7.8	7.8	7.9	8.2	7.5
	生後 21 日	腹	249.4	299.8	268.6	273.9	284.9	297.7	288.1	271.2
		児	39.3	43.1	42.0	39.9	41.1	41.8	43.7	39.9
機能 検査	平面正向 反応	検査児数	156	184	183	182	122	135	117	163
		陽性率%	93.8	94.1	95.4	100	89.0	95.7	96.3	95.8
	自由落下 反応	検査児数	136	173	158	165	116	126	112	142
		陽性率%	96.1	90.3	92.1	95.5	97.5	96.0	95.4	93.9
	瞳孔反射	検査児数	136	173	158	163	116	126	114	142
		陽性率%	99.4	100	100	100	100	100	99.3	100
	聴覚反応	検査児数	135	173	158	164	116	126	114	142
		陽性率%	100	99.4	100	100	100	100	100	100
肉眼的病理検査		いずれの世代においても検体投与に起因する異常は認められなかった。								

統計学的方法：同腹児重量、産児数、児動物数、児体重、生存児率、離乳率及び機能検査結果：Student-Newman-Keuls の多重比較検定—有意差なし。

1-10-2 催奇形性試験

1-10-2-1 ラットにおける催奇形性試験

(資料 18)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1991 年

検体純度:

供試動物: CrI: CD(SD)BR 系妊娠ラット(8~12 週齢; 妊娠 0 日体重 170~254g)、1 群 25 又は 32 匹。

投与期間: 器官形成期間、妊娠 6~15 日までの 10 日間

投与方法: 検体を溶媒 (1%カルボキシメチルセルロース)に懸濁し、0、20、50、70 及び 100mg/kg の投与量を容量 10mL/kg で妊娠 6~15 日まで 10 日間毎日 1 回強制経口投与した。対照群には溶媒を同様に投与した。投与容量は妊娠 6、9 及び 12 日の体重に基づき算出した。

なお、0(対照)及び 70mg/kg 群については未妊娠雌が多く認められたので、妊娠動物 20 匹/群を確保するために 7 匹ずつ妊娠動物を追加し、同様に投与した。さらに、同時に対照群及び 50 mg/kg 群を追加設定し同様に投与した。

膣栓あるいは精子の確認された日を妊娠 0 日とした。

投与量設定根拠: 同機関で本試験と同系の妊娠ラット 8 匹/群を用いて本試験と同様の方法で試験を実施した。その結果、

- ・ 100mg/kg 群: 母毒性として飲水量の増加に関連した尿量の増加、平均体重の投与初期の減少及びその後の顕著な抑制がみられた。胎児毒性として着床前後の胚死亡の増加、胎児体重の軽度低下がみられた。
- ・ 70mg/kg 群: 母毒性として体重増加の中等度抑制がみられた。胎児毒性はみられなかった。
- ・ 20 及び 40mg/kg 群: 母毒性及び胎児毒性はみられなかった。

これらの結果から、本試験では予備試験と同じ用量を選定した。

観察・検査項目:

親動物: 一般状態及び生死を毎日観察した。体重は妊娠 0、6、9、12、16 及び 20 日に測定した。摂餌量は妊娠 0~3、3~6、6~9、9~12、12~16 及び 16~20 日に測定した。妊娠 20 日に帝王切開し、黄体数、着床数、吸収胚数、生存及び死亡胎児数を検査した。又、腹部の肉眼的検査も実施した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

生存胎児：性別の判定、体重の測定及び外表異常の観察(可能な限り死亡胎児も)を行った。各同腹児の約半数の胎児について骨格標本を作製し、骨格異常の有無を検査し、残りの胎児についてはブアン液に固定後、内臓異常の有無について検査した。

試験結果：概要を表 1～3 に示す。

親動物(表 1 及び 2)：

100mg/kg 群の 5 例が死亡発見され、70mg/kg 群の 1 例は一般状態の悪化のため切迫殺された。

50mg/kg 以上の群で投与期間中の摂餌量の有意な低下を伴い体重増加の有意な抑制、又 70 及び 100mg/kg 群では一時的な体重の減少が投与初期にみられ、一般状態の悪化もみられた。

剖検(表 2)では 70 mg/kg 及び 100mg/kg 群で胃及び腸管に投与の影響と考えられる肉眼的変化(胃腸管の液体充満、赤色/暗色化、噴門の緑色層等)が認められた。また、70 及び 100 mg/kg 群の死亡例及び切迫屠殺例では肝臓、脾臓、腸間膜リンパ節、腎臓、副腎、胃、腸管及び子宮に赤色/暗色化、腫大、液体充満等の所見が認められた。

着床所見において、全胚吸収雌数の増加が 50mg/kg 以上の群で認められ、これに伴い、着床後損失率、子宮内死亡の増加、着床数に対する生存胎児数の割合の低下が認められた。20mg/kg 群は対照群と同等であった。

胎児動物(表 3)：

100mg/kg 群の平均胎児体重は対照群より有意に低かったが、平均生存胎児数及び性比には検体投与の影響がみられなかった。

検体投与に関連する奇形及び変異の発現はいずれの群にも認められなかった。

以上の結果から、本剤を妊娠ラットに経口投与したとき、母動物に対して 70mg/kg 以上で一般状態の悪化に伴う死亡が認められ、50mg/kg 以上で投与期間に摂餌量の減少がみられ、これに伴い体重及び体重増加の抑制が見られた。又、全胚吸収雌数の増加、これに伴い、着床後損失率、子宮内死亡の増加、着床数に対する生存胎児数の割合の低下が認められた。又、胎児に対して、顕著な母毒性のある 100mg/kg 用量で体重の減少のみがみられた。

従って、無毒性量は親動物に対して 20 mg/kg/day、胎児に対して 20mg/kg であると判断される。また、催奇形性は最高投与量の 100 mg/kg/day でも認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

表 1. 親動物の一般状態、体重、摂餌量及び着床所見

群 (mg/kg/日)		0	20	70	100	0	50
1 群当り動物数 ^a		25+7 ^a	25	25+7 ^a	25	25 ^a	25 ^a
妊娠雌数 (%)		23 (72)	25 (100)	25 (81)	19 (79)	20 (80)	20 (80)
未妊娠雌数		9		6	5	5	5
妊娠状態未確認雌数				1	1		
死亡/切迫殺雌数				1	5		
全胚吸収雌数				5	8		6
生存胎児を有する腹数		23	25	20	7	20	14
一般状態	痩せ			4	18		2
	摂餌の減少			4	6		
	脱糞の減少/なし				3		1
	赤/黒色腫分泌物				5		
体重 (g)	妊娠 0 日	206	217	205	208	211	205
	妊娠 6 日	230	243†	231	238	241	235
	妊娠 9 日	242	253†	228	222	254	239†
	妊娠 12 日	255	268†	236‡	208‡	264	241‡
	妊娠 16 日	281	293	260‡	240‡	290	263‡
	妊娠 20 日	331	340	310	298	335	311‡
体重増加 (g)	妊娠 0~6 日	25	26	26	32	29	30
	妊娠 6~16 日	51	50	29‡	3‡	49	28‡
	妊娠 16~20 日	50	47	50	58	45	48
	妊娠 0~20 日	126	123	105‡	94‡	124	106‡
摂餌量 (g/日)	妊娠 0~3 日	19	20	20	21	21	21
	妊娠 3~6 日	20	21	21	22	21	22
	妊娠 6~16 日	23	23	17‡	12‡	24	17‡
	妊娠 16~18 日	28	28	28	25	27	27
	妊娠 18~20 日	27	27	27	28	26	27
	妊娠 0~20 日	23	23	20‡	16‡	24	20‡
親動物	検査動物数	23	25	20 (25)	7 (15)	20	14 (20)
	黄体数	15.4	14.7	14.4	17.1	13.9	14.4
	着床数	12.6	11.7	12.4 (12.0)	14.7 (12.1)	11.7	11.5 (11.1)
	着床前損失率 (%)	18.7	19.0	14.1	13.0	15.8	19.9
	早期吸収胚数	0.5	0.4	0.7 (2.6)	2.7 (6.5)	1.0	0.9 (3.6)
	後期吸収胚数	0.0	0.0	0.1 (0.0)	0.0 (0.0)	0.1	0.0 (0.0)
	死亡胎児数	0.0	0.0	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0	0.0 (0.0)
	子宮内死亡胚数	0.5	0.4	0.7 (2.7)	2.7 (6.5†)	1.0	0.9 (3.6)
	着床後損失率 (%)	3.7	2.9	5.8 (24.6†)	16.5 (61.0†)	8.2	6.6 (34.6)
	生存胎児数	12.1	11.3	11.7 (9.4)	12.0 (5.6)	10.7	10.6 (7.5)
	生存胎児数/着床数 (%)	96.3	97.1	94.2 (75.4)	83.5 (39.0‡)	91.8	93.4 (65.4)

^a: 試験途中で追加した動物数 (+7)、又は 0 及び 50mg/kg 群を追加した。

^b: 腹当り着床所見は生存胎児を有する腹数の平均値。但し () 内の数値は全胚損失を含めた腹数に対する平均値。

統計学的方法: Student-Newman-Keuls 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 BASF ジャパン株式会社にある。

表 2. 親動物の剖検所見

群 (mg/kg/日)	0	20	70	100	0	50
1 群当り動物数*	25+7*	25	25+7*	25	25*	25*
胃内腔				3		
物質						
液体			1			
胃壁						
赤色化			3	2		
暗赤色/黒色域				1		
粘膜層剥離			1	4		
噴門付近に緑色層			4	5		
十二指腸/空腸/ 回腸/結腸/盲腸				1		
暗色化						
十二指腸～盲腸				1		
液体充満						
空腸/回腸			1			
粘膜赤色化						
大腸				1		
粘液充満						
盲腸				1		
腫大/液体充満						
肝臓				1		
顆粒状/小窩状/粗造						
暗色化				1		
腸間膜リンパ節				1		
腫大						
暗色化				1		
脾臓				2	1	
腫大						
副腎				1		
赤色化						
子宮角				1		
液体充満						

*: 試験途中で追加した動物数(+7)、又は 0 及び 50mg/kg 群を追加した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

表 3. 胎児の成績

群 (mg/kg/日)		0	20	70	100	0	50	
胎児動物	検査胎児数/腹数	278/23	283/25	234/20	84/7	213/20	149/14	
	同腹児重量 (g)	40.1	38.3	37.7	35.1	36.4	36.3	
	胎児体重 (雌雄)	3.3	3.4	3.2	2.91	3.5	3.5	
	胎児体重 (雄)	3.4	3.6	3.3	2.91	3.5	3.5	
	胎児体重 (雌)	3.2	3.3	3.2	2.8	3.4	3.4	
	性比 (雄/総数)	50.3	47.1	49.6	47	51.4	52.9	
	奇形胎児数/腹数			1/1			3/1	
	外表・内臓検査	検査胎児数/腹数	141/23	145/25	120/20	44/7	109/20	76/14
		外表奇形胎児数			1			3
		無脳症						1
		小眼症						2
		閉眼症						1
		無水晶体症						1
		浮腫			1			
		膈疝ヘルニア			1			
内臓変異胎児数			1	1			1	
胆管拡張 腎盂拡張			1				1	
骨格検査	検査胎児数/腹数	137/23	138/25	114/20	40/7	104/20	72/14	
	骨格奇形胎児数							
	骨格変異胎児数/腹数	136/22	138/25	114/20	14/93	101/20	71/14	
	鼻骨不完全骨化	8/5	7/4	11/6	5/2	2/2	2/2	
	前頭骨不完全骨化	23/11	16/9	16/10	11/3	10/8	8/5	
	頭頂骨不完全骨化	29/12	26/14	20/10	10/3	8/7	22/8	
	頭頂間骨不完全骨化	86/22	95/23	81/20	29/6	58/18	52/13	
	後頭骨不完全骨化	79/20	85/21	79/20	32/6	51/17	49/12	
	頬骨弓不完全骨化	19/8	18/11	20/8	2/2	11/8	11/5	
	第1～第4胸骨不完全骨化	35/16	30/15	27/13	17/4	18/11	16/7	
	第5・6胸骨未骨化	75/21	64/19	59/16	31/7	48/17	41/12	
	第5・6胸骨不完全骨化	91/21	100/25	75/18	17/4	72/20	48/13	
	肋骨不完全骨化	7/6	16/9	15/9	5/3	10/8	11/8	
	胸椎椎体不完全骨化	19/12	33/14	30/14	10/3	7/5	11/7	
	中手骨未骨化	70/18	82/22	70/17	30/6	54/17	42/11	

統計学的方法: Student-Newman-Keuls の検定 †↓: $p \leq 0.05$, †↑: $p \leq 0.01$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はBASF ジャパン株式会社にある。

1-10-2-2 ウサギにおける催奇形性試験

1-10-2-2-1 ウサギにおける催奇形性試験

(資料 19)

試験機関:

報告書作成年: 1976年

検体の純度:

供試動物: ニュージーランド白色種妊娠ウサギ(8~9ヵ月齢)、1群12匹、体重範囲3.3~3.8kg

投与期間: 器官形成期(妊娠6~18日)の13日間(1976年3月~1976年8月)

投与方法: 検体を1%メチルヒドロキシエチルセルロースゲル水溶液に懸濁し、その1mL/kgを3.3、10.0、30.0及び90.0mg/kgの投与量で妊娠6~18日までの13日間、毎日1回強制経口投与した。なお、対照群には同様に賦形剤のみ投与した。

交配成立日は観察により確認し、その日を妊娠0日とした。

観察・検査項目:

親動物: 一般状態、妊娠状態及び生死を毎日観察し、摂餌量、飲水量及び体重を毎日測定した。妊娠29日目に帝王切開し、黄体数、着床数、生存及び死亡・吸収胎児数を検査した。

生存胎児: 性別の判定、体重測定、胎児の生活能力(自発呼吸、自発運動)及び外表異常の観察を行った。

骨格標本を作製し、骨格異常の有無を検査し、残りの胎児については、内臓異常の有無を検査した。

試験結果: 結果の概要を次頁の表に示した。

親動物:

90.0mg/kg 群では投与初日から全ての母動物は中程度の鎮静、失調性歩行、流動ないし液状便がみられ、頻りに排泄した。摂餌量及び体重は急激に減少した。全例とも妊娠8~12日の間に軽度の死戦期痙攣の後死亡した。剖検では実質臓器の蒼白、腸の液体充満がみられた。

30.0mg/kg 群では、全投与期間中、摂餌量の減少及び体重増加の抑制がみられた。投与中止後、摂餌量及び体重とも試験終了時までには回復した。しかし、着床胚の50%が吸収され、その多くは早期吸収であった。着床後損失率は死亡胎児を含め57.8%で対照群に比し有意に高かった。胎盤重量は対照群に比し有意に低かった。

3.3及び10.0mg/kgの両群では着床所見を含め親動物に異常は観察されなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

胎児動物：

30mg/kg 群では吸収胚数の有意な増加に伴い、胎児数の有意な低下がみられた。生存胎児に対して検体投与による影響は催奇形性を含め全く認められなかった。

3.3 及び 10.0mg/kg の両群では影響は全く認められなかった。

以上の結果より、本剤を妊娠ウサギに投与したとき、30.0mg/kg 群では、摂餌量の減少及び体重増加の抑制がみられた。投与中止後、摂餌量及び体重とも回復したが、着床胚の多くは早期に吸収され、着床後損失率も高かった。吸収胚数の増加に伴い、胎児数の減少がみられた。胎盤重量に低かった。生存胎児に対して検体投与による影響は催奇形性を含め全く認められなかった。したがって、母体に対する無毒性量は 10mg/kg/日であった。また、親動物に対して顕著な影響のみられた 30mg/kg でも胎児に対して無毒性量であり、又、催奇形性も認められなかった。

群 (mg/kg/日)		対照	3.3	10	30	90		
親動物	供試動物数 ^a	14	15	13	14	15		
	妊娠動物数	12	12	12	12	12		
	死亡動物数	0	0	0	0	12 ^b		
	検査動物数	12	12	12	12	0		
	一般状態	異常なし				沈静、運動失調、流動-液状便		
	体重増加 (kg)	妊娠 6-18 日	0.2	0.2	0.2	0.0		
		妊娠 18-29 日	0.3	0.2	0.3	0.4		
	摂餌量%	妊娠 6-18 日	100	101	89	65		
		妊娠 19-29 日	100	101	114	109		
	着床所見	黄体数/腹	10.4	10.4	11.5	10.8	10.8	
		着床数/腹	9.7	9.8	10.8	9.7	9.7	
		着床前胚損失率%	7.2	6.4	5.8	10.8		
		着床後胚損失率%	10.3	15.4	16.9	57.8		
		吸収胚数/腹	0.8	1.0	1.0	4.8*		
		吸収率%	7.8	10.3	9.2	50.0		
		吸収胚数/群	早期	8	9	8	40	
			後期	1	3	4	18	
	合計		9	12	12	58		
	死亡胎児数/群	3	6	10	9			
	胎盤重量 (g)	5.54	5.53	5.40	5.12*			
胎児動物	生存胎児数	107	105	118	58			
	体重 (g)	35.1	35.4	35	35			
	性比% (雄/雌雄計)	52	51	48	53			
	外表/内臓異常	異常なし						
	骨格異常	化骨遅延	7	8	7	6		
		変異	24	28	29	36		
		奇形	0	0	0	0		

a: 12 匹の妊娠動物が得られるまで、未交尾動物は他の動物と交換して交配させた。

b: 妊娠 8~12 日の間に全例が死亡した。

*: 統計学的方法: Student-t; 有意な限界を $p \leq 0.01$ 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 BASF ジャパン株式会社にある。

1-10-2-2-2 ウサギにおける催奇形性試験

(資料 20)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1990 年

検体純度:

供試動物: ニュージーランド白色種妊娠ウサギ(14~17 週齢)、1 群 20 匹

投与期間: 器官形成期(妊娠 6~18 日までの 13 日間)

投与方法: 検体を 1%カルボキシメチルセルロースに懸濁し、0、10、25 及び 40mg/kg の投与量を妊娠 6~18 日までの 13 日間毎日 1 回強制経口投与した。対照群には溶媒を同様に投与した。交尾確認雌には黄体ホルモンを静注投与し、この日を妊娠 0 日とした。

[投与量設定根拠] 1 群 8 匹の妊娠雌ウサギを用い、本試験と同様の方法で用量 10、20 及び 40mg/kg を器官形成期に投与した予備試験の結果、

・ 40mg/kg 群: 母毒性として摂餌量及び摂水量が減少し、平均体重の減少及び流産率が増加した。胎児毒性として早期吸収胚数及び着床後胚損失率が増加し、胎児数が減少した。

・ 20 及び 10mg/kg 群: 母毒性及び胎児毒性は認められなかった。

この結果から 40mg/kg を高用量とし、以下 25 及び 10mg/kg を選定した。

観察・検査項目:

親動物: 一般状態、妊娠状態及び生死を毎日観察し、体重及び摂餌量を週 2~3 回測定した。妊娠 28 日に帝王切開し、黄体数、着床数、生存及び死亡・吸収胎児数を検査した。

生存胎児: 性別、体重及び外表異常の観察を行った。各胎児の内臓観察を行った後、骨格標本を作製し、骨格異常の有無を検査した。又、約半数の胎児については頭部を切断してブアン液に固定し、頭部の形態観察を行った。

試験結果: 概要を次頁の表に示した。

親動物:

死亡率: 次表のように合計 11 例の死亡が投与群でみられた。うち、5 例については剖検時の所見より、誤投与のためと判断された。他の 6 例については、検体投与に関連した臨床症状や剖検所見、又用量関連性もみられず、同系ウサギで同様な頻度で死亡がみられることから、偶発的な死亡と考えられる。

投与群(mg/kg/日)	0	10	25	40
死亡動物数	0	4*	3	4
内、誤投与による死亡		1	2	2

* 内 1 例は投与開始前(妊娠 4 日)に死亡した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

摂餌量、体重及び流産：40mg/kg 群では摂餌量の減少を伴い顕著な体重の減少が特に投与初期に認められた。この一般状態の悪化のためと考えられる 3 例の流産がみられた。25mg/kg 群でも摂餌量の減少を伴い体重増加の抑制が認められた。10mg/kg 群は投与前から摂餌量及び体重増加も対照群より僅かに少なく、投与期間及びその後も同様に経過したが、検体投与に関連はないと考えられる。又、1 例の流産がみられたが、偶発的なものと考えられる。

着床所見：40mg/kg群は対照群に比し、黄体数は多かったが、着床数は少なく、着床前胚損失率は他の群より多かった。これは検体投与前の事象であるので投与に関連はないと考えられる。しかし、早期吸収胚数の有意な増加に起因する着床後胚損失率が有意に増加し、結果として生存胎児数の減少となった。

胎児動物：40mg/kg 群では顕著な母動物への影響が認められ、生存胎児数が減少したが、他の用量群を含め生存胎児への影響は全く認められなかった。

以上の結果から、本剤を妊娠ウサギの器官形成期に経口投与したとき、40mg/kg では顕著な母毒性(摂餌量の減少を伴う顕著な体重の減少、流産)及び胚毒性(早期吸収胚数の増加に起因する着床後胚損失率の増加、結果として生存胎児数の減少)がみられた。25mg/kg 群では母毒性(摂餌量の減少、体重増加の抑制)のみで、胚毒性も、胎児への影響も認められなかった。従って、無毒性量は、母動物に対して 10 mg/kg/day、胎児動物に対して 25 mg/kg であった。また、最高投与量の 40 mg/kg でも胎児動物に対して催奇形性がないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

結果の概要(1) - 親動物

投与群 (mg/kg/日)		0	10	25	40	
1 群当り動物数		20	20	20	20	
妊娠雌数 (%)		16 (80)	19 (95)	20 (100)	19 (95)	
死亡妊娠雌数		0	3	3	4	
流産雌数		1	1	0	3	
子宮内全胚損失雌数		1	0	0	2	
切開時に生存胎児を有する雌数		14	15	17	10	
親動物	体重 (g)	妊娠 0 日	3658	3603	3711	3636
		妊娠 6 日	3962	3868	3945	3969
		妊娠 9 日	4082	3964	4027	3860
		妊娠 12 日	4120	4044	4085	3883
		妊娠 15 日	4258	4135	4119	3911
		妊娠 19 日	4329	4218	4219	4106
		妊娠 24 日	4471	4328	4373	4252
		妊娠 28 日	4641	4372	4475	4348
	体重増加 (g)	妊娠 0~6 日	303	265	234	282
		妊娠 6~9 日	100	96	42	-108
		妊娠 9~12 日	58	80	58	35
		妊娠 12~15 日	139	93	34	12
		妊娠 15~19 日	70	83	23	122
		妊娠 19~24 日	142	65	154	136
		妊娠 24~28 日	139	53	103	96
		妊娠 0~28 日	968	787	676	676
	摂餌量 (g/動物/日)	妊娠 0~6 日	205	196	166	187
		妊娠 6~9 日	217	208	156	116
		妊娠 9~12 日	215	205	166	106
		妊娠 12~14 日	215	183	124	110
		妊娠 14~16 日	207	175	127	109
		妊娠 16~19 日	213	177	146	156
		妊娠 0~28 日	207	186	164	168
		妊娠 6~19 日	211	191	151	132
	着床所見 ^{a)}	黄体数	13.6	12.5	12.8	15.2
		着床数	7.6	7.4	8.5	6.4
				7.1	7.4	8.5
		着床前胚損失率 (%)	43.7	37.9	32.1	57.6
早期吸収胚数		0.5	1.4	1.1	2.2	
		0.5	1.4	1.1	2.6	
後期吸収胚数		0.2	0.2	0.0	0.0	
		0.2	0.2	0.0	0.0	
死亡胎児数		0.0	0.1	0.1	0.5	
		0.0	0.1	0.1	0.4	
子宮内死亡胚数合計	0.7	1.7	1.1	2.7†		
	0.7	1.7	1.1	3.0†		
着床後胚損失率 (%)	7.7	26.9	15.2	41.5†		
	13.9	26.9	15.2	51.2†		
生存胎児数 (%)	6.9 (92.3)	5.7 (73.1)	7.4 (84.8)	3.7 (58.6)		
	6.4 (86.1)	5.7 (73.1)	7.4 (84.8)	3.1 (48.8)		

^{a)} : 着床所見は腹当り。上段左側の数値は生存児を有する腹の数、下段右側の数値は子宮内全胚死亡動物を含めた全動物の平均値。

統計学的方法: Student-Newman-Keuls の検定 11; p ≤ 0.05

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

結果の概要(2) - 胎児動物

投与群 (mg/kg/日)		0	10	25	40
検査腹数		14	15	17	10
検査胎児総数		96	86	126	37
同腹児重量 (g)		256	226	272	151
平均胎児 体重 (g)	雌雄	39.5	41.8	38.3	39.6
	雄	38.7	41.2	38.4	39.9
	雌	39.3	39.5	38.4	39.9
性比% (雄/総数)		45.1	54.0	55.4	65.9
奇形胎児数		2(1)	2(2)	3(3)	
外表・ 内臓異常	検査胎児数	96	86	126	37
	奇形胎児数		1(1)		
	短尾		1(1)		
	変異胎児数	5(4)	1(1)	6(6)	3(3)
	脳室拡張	4(4)	1(1)	5(5)	3(3)
	髄膜出血			1(1)	
	頭部皮下出血	2(1)		1(1)	
骨格異常	検査胎児数	96	86	126	37
	奇形胎児数	2(1)	2(2)	3(3)	
	脊椎側湾症	2(1)	1(1)	3(3)	
	肋骨分岐		1(1)		
	肋骨基部癒合		1(1)		
	胸椎癒合		1(1)		
	骨格変異胎児数	95(14)	85(15)	126(17)	37(10)
	第5・6胸骨分節未骨化	57(12)	49(13)	50(13)	8(5)
	第5・6胸骨分節不完全骨化	32(14)	36(13)	66(16)	21(9)
	胸腰部過剰肋骨	79(14)	75(15)	108(17)	34(10)
	棍棒状肋骨	26(10)	23(9)	40(13)	14(7)
	肋骨不完全骨化	14(9)	11(5)	21(8)	1(1)
	前肢指骨不完全骨化	4(3)	5(4)	9(6)	7(5)
	前肢指骨未骨化	14(9)	18(11)	49(13)	14(7)
	中手骨不完全骨化	8(4)	10(5)	10(6)	3(3)
	中手骨未骨化	4(3)	8(6)	18(6)	4(3)
	後肢指骨未骨化	1(1)	5(4)	16(7)	7(5)
	距骨不完全骨化	11(7)	11(5)	19(9)	6(5)
	前肢指骨不完全骨化	4(3)	5(4)	9(6)	7(5)
	前肢指骨未骨化	14(9)	18(11)	49(13)	14(7)
	中手骨不完全骨化	8(4)	10(5)	10(6)	3(3)
	中手骨未骨化	4(3)	8(6)	18(6)	4(3)
	後肢指骨未骨化	1(1)	5(4)	16(7)	7(5)
	距骨不完全骨化	11(7)	11(5)	19(9)	6(5)

* 胎児動物の()内の数値は当該異常を有する腹数。

1-10-2-3 マウスにおける催奇形性試験

(資料 21)

試験機関:

報告書作成年: 1976 年

検体の純度:

供試動物: NMR1 系妊娠マウス(10 週齢)、1 群 24 匹 体重範囲 26~28g

投与期間: 器官形成期(妊娠 6~15 日)の 10 日間(1976 年 3 月~1976 年 8 月)

投与方法: 検体を 1%メチルヒドロキシエチルセルロースゲル水溶液に懸濁し、その 1 mL/kg を 3.3、10.0、30.0 及び 90.0 mg/kg の投与量で妊娠 6~15 日までの 10 日間、毎日 1 回強制経口投与した。なお、対照群には同様に賦形剤のみ投与した。

妊娠 0 日は腫塗抹の観察で精子の存在を認めたときとした。

観察・検査項目:

親動物: 一般状態、妊娠状態及び生死を毎日観察し、摂餌量、飲水量及び体重を毎日測定した。妊娠 19 日目に帝王切開し、黄体数、着床数、生存及び死亡・吸収胎児数を検査した。

生存胎児: 性別の判定、体重測定、胎児の生存性の判定及び外表異常の観察を行った。

骨格標本を作製し、骨格異常の有無を検査し、残りの胎児については、内臓異常の有無を検査した。

試験結果: 結果の概要を次表に示した。

親動物:

90.0mg/kg 群では投与後まもなく鎮静がみられ、又、立毛及び流動便もみられた。投与 2 日目から鎮静はさらに顕著になり、運動失調及び下痢が観察された。摂餌量及び体重は急激に減少し、衰弱し、一部は死戦期痙攣の後、妊娠 7~15 日の間に全例が死亡した。剖検では実質臓器の蒼白、腸の出血性液体充満がみられた。

30.0mg/kg 群では、全投与期間中、摂餌量の軽度減少を伴い体重増加の有意な抑制がみられた。投与中止後、摂餌量は回復したが、体重は試験終了時でも有意差はないが低かった。着床所見に対照群との差はみられなかった。

10.0 及び 3.3mg/kg 群では全投与期間中、有意差はないが体重増加の抑制がみられ、試験終了時でも低かった。

3.3mg/kg 群では着床所見を含め親動物に全く異常は観察されなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

胎児動物：

30mg/kg 群では対照群に比し有意差はないが体重及び胎盤重量が低く、骨化遅延の発生率が高かった。又、10mg/kg 群でも僅かに骨化遅延の発生率が高かった。これらは母体重の抑制を反映していると思われる。

小型胎児及び口蓋裂が、対照群を含め 1 例ずつ群にも散見されたが、用量関連性もなく、投与に関連性はないと考えられた。

以上の結果より、本剤を妊娠マウスの器官形成期に強制経口投与したとき、90mg/kg では顕著な全身毒性のために全例が投与期間中に死亡した。30mg/kg では母動物の体重の抑制に伴う二次的影響として胎盤重量の低下、胎児体重の低下がみられ、これによると考えられる骨化遅延の発生が多かった。10mg/kg では母動物の体重が僅かに抑制されたのみであった。従って、無毒性量は母動物に対して 3.3mg/kg、胎児に対して 10mg/kg であった。又、母動物の死亡が認められなかった最高投与量の 30mg/kg でも胎児に対して催奇形性は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

群(mg/kg/日)		対照	3.3	10	30	90	
親動物	供試動物数 ^a	28	26	27	25	28	
	妊娠動物数	24	24	24	24	24	
	死亡動物数	0	0	0	0	24 ^b	
	検査動物数	24	24	24	24	0	
	一般状態	異常なし				沈静、立毛流動便	
	体重(g)	妊娠 6 日	30.6	30.8	31.1	31.0	30.9
		妊娠 15 日	37.8	37.8	36.3	35.8*	27.3 ^c
		妊娠 18 日	46.9	47.0	45.0	44.9	
	摂餌量	異常なし			軽度減少	著減	
	着床所見	黄体数/腹	10.9	11	10.9	10.6	10.2
		着床数/腹	10.7	10.6	10.6	10.1	9.8
		着床前胚損失率%	2.7	3.4	3.1	4.3	
		着床後胚損失率%	9.8	7.8	9.1	8.2	
		吸収胚数/腹	1.0	0.8	1.0	0.8	
		吸収率%	9.8	7.8	9.1	8.2	
吸収胚数/群		早期	10	10	15	13	
		後期	15	10	8	7	
合計	25	20	23	20			
死亡胎児数/群	0	0	0	0			
胎盤重量(g)	0.107	0.108	0.112	0.096			
胎児動物	生存胎児数	231	235	231	223		
	体重(g)	1.23	1.24	1.21	1.14		
	性比%(雄/雌雄計)	53	51	47	53		
	内臓異常	異常なし					
	外表異常	小型	1	0	0	1	
		口蓋裂	1	1	0	0	
	骨格異常	骨化遅延	頭蓋骨	2	4	10	16
			胸骨分節	1	0	3	15
		四肢	肋骨/堆体	28	34	46	76
			四肢	4	3	8	10
変異	32	36	51	78			
奇形	0	0	0	0			

a: 24 匹の妊娠動物が得られるまで、未交尾動物は他の動物と交換して交配させた。

b: 妊娠 7~15 日の間に全例が死亡した。

c: 死亡時体重

*: 統計学的方法: Student-t: 有意な限界を $p \leq 0.01$ とした。

1-11 変異原性試験

1-11-1 遺伝子突然変異試験

1-11-1-1 細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 22)

試験機関:

報告書作成年: 1976 年

検体の純度:

方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA100、TA1537、TA1538、TA98 株) 及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 hcr 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9) の存在下及び非存在下で、Ames らの方法で変異原性を検定した。

検体は DMSO に溶解し、0.1~5.0 μ g/プレートの範囲の 5 濃度で実施した。試験は 2 連で行った。

結果: 結果を次表に示す。

検体は代謝活性化系の有無に係わらず、菌株の生育阻害を起こさない最高用量 (5 μ g/プレート) においても、いずれの菌株にも復帰変異コロニー数の増加させなかった。

一方、陽性対照として用いた AF-2[2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド]、 β -PL(β -プロピオラクトン)、9-AA(9-アミノアクリジン)、2-NF(2-ニトロフルオレン)及び 2-AA(2-アミノアントラセン)では、全ての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、検体は代謝活性化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 BASF ジャパン株式会社にある。

薬物	濃度 (μ g/ プレート)	S-9Mix	復帰変異 コロニー数/プレート						
			塩基置換型			フレームシフト型			
			WP2 her-	TA 1535	TA 100	TA 1537	TA 1538	TA 98	
陰性 DMSO		-	18 16	10 4	174 164	7 7	13 11	30 29	
検体	0.1	-	18 18	11 4	188 160	8 10	9 15	28 25	
			0.5	-	20 21	12 10	185 206	8 13	13 11
	1	-			17 7	11 11	170 181	6 5	17 13
			2.5	-	24 17	6 7	171 155	2 3	11 11
	5	-			11 x	9 6	74 73	* *	12 6
陽性	2-AA	10	-	-	8 12	162 165	18 18	23 22	70 68
	AF-2	0.25	-	1826 1546					
				0.1	-				
		0.05	-			1184 1324			
	β -PL	50	-		1488 1500				
	9-AA	200	-				>10000 >10000		
	2-NF	0.05	-					>5000 >5000	
陰性 DMSO		+	20 12	8 12	141 177	5 9	11 16	19 18	
検体	0.1	+	15 23	9 6	151 129	6 8	17 23	40 22	
			0.5	+	10 14	6 9	149 183	6 8	20 14
	1	+			13 10	11 5	177 161	7 10	6 14
			2.5	+	10 19	6 6	153 153	10 5	12 11
	5	+			10 13	3 4	171 169	5 9	9 13
陽性 2-AA	10	-		247 253	>5000 >5000	579 591	>3000 >3000	>5000 >5000	

*: 菌株の生育阻止を認めた。 陽性対照の空欄は試験せず。 x: 報告書に記載がなく不明

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

β -PL: β -プロピオラクトン

9-AA: 9-アミノアクリジン

2-NF: 2-ニトロフルオレン

2-AA: 2-アミノアントラセン

1-11-1-2 宿主経由法による復帰突然変異試験

(資料 22)

試験機関:

報告書作成年: 1976 年

検体の純度:

方法: 検体を 5%アラビアゴムに懸濁し、ICR 系雄マウス(7 週齢)1 群 6 匹に 50 及び 200mg/kg の用量で、24 時間間隔で 2 回経口投与した。

2 回目の投与直後に、対数期の *S. typhimurium* のヒスチジン要求性株 G46 (4×10^8 個/mL) 2mL を腹腔内に注入し、3 時間後に各動物を屠殺した後、1/15 M リン酸緩衝液 (pH7.0) 2mL を腹腔内に注入し、注射筒を用いて腹腔内細菌を回収した。細菌を最少寒天培地に接種し、37°C で 2 日間培養した後、復帰変異菌数及び生存菌数を計測した。

陽性対照群には、ジメチルニトロソアミン (DMS) を 50mg/kg の用量で 1 回経口投与した。陰性対照群には 5%アラビアゴム溶液を投与した。

また、G46 株を用いて *in vitro* における復帰突然変異試験を行った。

用量設定根拠: LD_{50} 値を基準として数段階の用量を経口投与し、臨床症状を観察した結果に基づいて設定した。

結果:

(1) *in vitro* における復帰突然変異原性: 結果を下表に示す。

ジチアノン μg/プレート	0	0.1	0.5	1.0	2.5	5.0	β-PL 1000
復帰変異 コロニー数/プレート	5	8	5	1	5	4	122
	5	4	5	1	2	2	131

β-PL: β-プロピオラクトン

G46 株を用いた *in vitro* における検体の復帰突然変異原性は陰性であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

(2) 宿主経由法における復帰変異原性：結果を次表に示す。

群	総投与量 mg/kg	復帰変異 菌数/mL	生存菌数 ×10 ⁸ /mL	復帰変異/10 ⁸ 菌数/生存菌数	平均値±S. D.
対照		24.2	48.3	0.50	0.51±0.25
5% 77C73L		8.3	34.2	0.24	
		14.2	54.4	0.26	
		15.8	33.8	0.47	
		26.7	36.2	0.74	
		25.0	28.5	0.88	
ジ777	50×2	20.8	42.7	0.49	0.43±0.10
	50×2	21.7	40.3	0.54	
	50×2	30.0	56.3	0.53	
	50×2	15.8	51.7	0.31	
	50×2	18.3	52.6	0.35	
	50×2	17.5	49.1	0.36	
ジ777	200×2	24.2	29.6	0.82	0.58±0.17
	200×2	17.5	47.9	0.37	
	200×2	21.7	40.2	0.54	
	200×2	20.0	37.3	0.54	
	200×2	22.5	34.1	0.66	
陽性対照	50	3463	37.1	92.6	103.6±23.7***
	50	2977	41.9	71.0	
	50	4977	44.7	111.3	
	50	5127	54.9	93.4	
	DMN	50	4660	33.1	
50		5507	48.9	112.6	

***: p<0.001

DMN: ジメチルニトロソアミン

宿主経由試験においても検体投与群は、陰性対照群と比較して復帰変異菌数の有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照として用いた DMN 投与群では陰性対照群と比較して著明な復帰変異菌数の増加が認められた。

結論：以上の結果より、検体は本実験条件下における宿主経由試験による突然変異誘発性は陰性であると判断する。

1-11-1-3 細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 23)

試験機関：

報告書作成年：1986 年

検体の純度：

方 法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* TA1537、TA98、TA1538、TA1535 及び TA100 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素 (S-9) 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。

検体は DMSO に溶解した。本試験に先立って、TA98 及び TA100 株を用い、5000 μ g/プレート を最高濃度として、代謝活性化系の存在下及び非存在下で細菌に対する毒性試験を行ったところ、代謝活性化系の存在下では 5000 μ g/プレート で TA98 株に対して生育抑制が認められ、非存在下では 333.3 μ g/プレート 以上の濃度で TA98 株に対し、また 1000 μ g/プレート 以上の濃度で TA100 株に対して生育抑制が認められた。

上記の予備試験結果から、本試験における濃度は、代謝活性化系の存在下では 33.3~3333.3 μ g/プレートの範囲の 5 濃度とし、非存在下では 1.0~333.3 μ g/プレートの範囲の 6 濃度とした。試験は各群 3 枚のシャーレを用い、2 回行った。

結 果：次頁の表に 2 回行った各試験のシャーレ 3 枚の平均値を左側と右側に示した。

検体は代謝活性化を含め細菌に対して生育抑制を示す濃度においても、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 NaN_3 (アジ化ナトリウム)、4-NOPD (4-ニトロ-o-フェニレンジアミン) 及び 2-AA (2-アミノアントラセン) では各試験菌株で明瞭な復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性を有しないものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

2005.03.01

薬物	濃度 (μ g/ プレート)	S-9Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型		フレームシフト型		
			TA 1535	TA 100	TA 1537	TA 1538	TA 98
対照 (DMSO)		—	38 37	161 149	15 12	35 24	55 48
検体	1.0	—	53 34	160 144	23 11	44 24	53 36
	3.3	—	48 26	159 139	21 13	32 23	49 38
	10.0	—	44 19	151 151	17 10	36 26	50 24
	33.3	—	0 0	116 111	13 3	24 24	39 24
	100.0	—	0 0	117 74	0 4	0 5	0 0
	333.3	—	0 0	72 56	0 0	0 0	0 0
陽性対照 (NaN_3)	10.0	—	1857 1617	1853 1732			
陽性対照 (4-NOPD)	50.0	—			237 391	2410 2167	2799 2300
溶媒対照 (DMSO)		+	40 28	171 162	42 23	50 37	64 47
検体	33.3	+	44 29	180 108	38 23	56 33	78 45
	100.0	+	50 22	147 147	42 27	45 27	68 39
	333.3	+	44 9	183 180	38 11	55 28	89 32
	1000.0	+	48 7	205 164	15 0	14 18	71 20
	3333.3	+	0 0	151 0	0 0	0 0	0 0
陽性対照 (2-AA)	10	+	941 661	2283 2440	392 330	2286 2039	1703 2490

陽性対照の空欄は試験せず。

NaN_3 : アジ化ナトリウム

4-NOPD: 4-ニトロ-o-フェニレンジアミン

2-AA: 2-アミノアントラセン

1-11-1-4 細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 24)

試験機関：

報告書作成年：1987 年

検体の純度：

方 法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurim* TA1537、TA98、TA1538、TA1535 及び TA100 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素 (S-9) 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。

検体は DMSO に溶解し、本試験の投与量は、先に行った試験(資料 25)の結果に基づいて設定した。S-9Mix の非存在下では 0.1~333.3 μg /プレート、S-9Mix の存在下では 10.0~3333.3 μg /プレートの範囲で各 6 濃度で行った。試験は各群 3 枚のシャーレを用い、2 回行った。

結 果：次頁の表に 2 回行った各試験のシャーレ 3 枚の平均値を左側と右側に示した。

2 回の試験において、検体は S-9 Mix の有無にかかわらず、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 NaN_3 (アジ化ナトリウム)、4-NOPD (4-ニトロ-*o*-フェニレンジアミン) 及び 2-AA (2-アミノアントラセン) では各試験菌株で明瞭な復帰変異コロニー数の増加を認めた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性を有しないものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S-9Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型		フレームシフト型		
			TA 1535	TA 100	TA 1537	TA 1538	TA 98
対照 (DMSO)		—	23 28	142 149	10 14	21 30	31 25
検体	0.1	—	26 28				
	0.3	—	23 24		10 13	24 29	27 29
	1.0	—	19 27	146 142			
	3.3	—	19 24	146 138	12 15	23 28	26 30
	10.0	—	21 28	139 123	13 15	19 27	27 24
	20.0	—	21 0		13 17	18 24	28 26
	33.3	—		122 117	13 15	22 32	27 24
	66.6	—			0 0	19 33	27 28
	100.0	—		136 134			
333.3	—		120 127				
陽性対照 (NaN_3)	10.0	—	1245 1450	1404 1067			
陽性対照 (4-NOPD)	50.0	—			400 858	2152 2285	2718 2389
溶媒対照 (DMSO)		+	20 24	157 168	25 20	38 45	44 49
検体	10.0	+	17 21	145 157	27 22	32 44	29 49
	100.0	+	18 18	153 158	28 26	29 38	50 44
	333.3	+	17 18	152 154	20 20	35 35	40 40
	666.6	+	18 23		28 24	30 38	36 41
	1000.0	+	15 23	163 127	19 21	43 39	44 37
	2000.0	+	27 12	126 192	21 0	41 38	40 26
	3333.3	+		130 147			
陽性対照 (2-AA)	10.0	+	530 723	988 727	308 935	598 1588	1205 1428

陽性対照の空欄は試験せず。

NaN_3 : アジ化ナトリウム

4-NOPD: 4-ニトロ-*o*-フェニレンジアミン

2-AA: 2-アミノアントラセン

1-11-1-5 細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 25)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1991 年

検体の純度:

方法: ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium*(TA100、TA98、TA1535、TA1537 株)、トリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli*(WP2 *uvrA*) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9) の存在下及び非存在下で Ames らの方法で変異原性を検定した。

検体は DMSO に溶解し、予備試験の結果から、抗菌作用を示す用量を最高投与量とし、S-9 Mix の非存在下では 0.05~25.6 μg /プレート、S-9 Mix の存在下では 3.75~240 μg /プレートの範囲で各 6 濃度で行った。試験は 2 連とした。

なお、TA98 株の S9 Mix 存在下で陽性反応がみられたので、再確認のために、S9 Mix 存在下で 25~125 μg /プレートの範囲の 5 濃度で同様に試験した。

結果:

検体が各試験菌株の生育を阻害する用量まで検討した結果、S9 Mix 存在下において、TA98 及び TA1537 株では復帰突然変異コロニー数の用量関連性のある増加傾向が認められた。TA98 株を用いた確認試験においても陽性反応が認められた。

S9 Mix 非存在下ではいずれの菌株にも復帰突然変異コロニー数の増加はみられなかった。

一方、陽性対照とした AF-2、ENNG、ACR、2-AA は明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、検体は代謝活性化の本試験条件下においてフレームシフト型の遺伝子突然変異を誘発するものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

2013.11.15

細菌を用いた復帰突然変異試験結果

薬物	濃度 (μg /プレート)	S-9Mix の有無	復帰突然変異コロニー数/プレート*				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537
対照 (DMSO)		-	123	10	22	23	10
検体	0.05	-	141	9	-	-	-
	0.10	-	108	13	-	21	15
	0.20	-	92	8	-	23	13
	0.40	-	102	11	-	18	9
	0.80	-	100	12*	17	25	10
	1.60	-	70*	7*	21	32*	6*
	3.20	-	-	-	18	24*	4*
	6.40	-	-	-	13	-	-
	12.8	-	-	-	15*	-	-
	25.6	-	-	-	13*	-	-
陽性対照 AF-2	0.01	-	523		214		
	0.1	-				427	
ENNG	5			179			
ACR	80						424
対照 (DMSO)		+	102	9	21	27	9
検体	3.75	+	130	13	-	33	17
	7.50	+	129	16	27	35	15
	15.0	+	105	9	20	32	10
	30.0	+	102	13	27	65	18
	60.0	+	111*	16	21	56	20
	120	+	48*	9*	22	68*	25*
	240	+	-	-	20*	-	-
陽性対照 2-AA	0.5	+				328	
	1	+	578				
	2	+		329			216
	10	+			556		

* 抗菌作用が認められたもの

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

ENNG : 1-エチル-3-(3-ジメチル-1-ヒドロキシイソイミダゾリル)カルボジイミド

* 2回の平均値

ACR : 9-7ミ/アクリジン

2-AA : 2-7ミ/アントラセン

S-9 Mix 存在下における確認試験結果 (試験菌株 TA98)

薬物	濃度(μg /プレート)	S-9Mixの有無	TA98
MDSO		+	28
検体	25	+	35
	50	+	70
	75	+	93
	100	+	72
	125	+	50
2-AA	0.5	+	342

1-11-1-6 チャイニーズハムスターの V79 細胞を用いた変異原性試験

(資料 26)

試験機関：

報告書作成年：1984 年

検体の純度：

試験方法：チャイニーズハムスター-V79 細胞のヒポキサンチン-グアニン ホスホリボシル トランスフェラーゼ (HPRT) 遺伝子座における *in vitro* 突然変異誘発性試験を代謝活性化系 (S-9 mix) の存在下及び非存在下で、2 回行った。溶媒として DMSO を用いた。

用量設定根拠：試験前に濃度設定のために、コロニー形成率について実験を行い、その用量反応曲線から低濃度は陰性対照溶媒区の範囲及び最高濃度区はコロニー形成率 20~30% の範囲の濃度を選定した。

処理濃度：検体処理区 (S-9 mix 非存在下) 20、50、100、200 ng/mL

検体処理区 (S-9 mix 存在下) 60、150、300 及び 600 ng/mL

陽性対照 [S-9 mix の非存在下ではエチルメタンサルホネート (EMS) 1.0 mg/mL=8mM、S-9 mix の存在下では 9,10-ジメチル-1,2-ベンズアントラセン (DMBA) 15.4 μ g/mL=61.6 μ M] 及び陰性 (溶媒) 対照も同様に試験した。

自然 HPRT 欠損突然変異体を除いた細胞を播種し (6×10^6 個/フラスコ)、代謝活性化系の非存在下及び存在下で、血清を含む培地中で 4 時間、検体処理を行った。細胞を生理食塩液で洗浄後、細胞を完全培地に再懸濁して培養した。突然変異発現時間の間に 2 回継代培養した。2 回目の継代培養時に、選択培地を含むシャーレに約 6×10^6 細胞/シャーレを播種した。培養 7 日後、固定・染色して変異コロニー数を計測した。

試験結果：結果を次表に示した。

細胞毒性は最高濃度で 20~70% (S-9 Mix 非存在下)、50% (S-9 Mix 存在下) であった。細胞毒性及び S-9 mix の有無に係らず、本検体は突然変異コロニー数の増加を誘発しなかった。

一方、陽性対照として用いた EMS 及び DMBA では顕著な突然変異コロニー数の増加がみられた。

以上の結果より、本検体はチャイニーズハムスター-V79 細胞を用いた *in vitro* HPRT 前進突然変異試験において、代謝活性化系の有無に係らず突然変異誘発性を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 BASF ジャパン株式会社にある。

	薬物	用量 (mL 当り)	S-9 mix の有無	培養 7 日後コロニー 形成率 (%)		平均突然変異体数 /プレート ^b	変異頻度 x 10 ⁶
				絶対値 ^a	対陰性対照比		
実験 1	無処理	0	-	47.5		1.4	3.6
	陰性対照 (DMSO)	0	-	55.5	100.0	1.6	4.4
	検体	20 ng	-	52.9	95.2	2.2	6.4
		50 ng	-	55.0	99.1	2.8	7.3
		100 ng	-	41.8	74.9	4.0	9.9
		200 ng	-	16.7	30.1	2.4	5.9
	陽性対照 (EMS)	1.0 mg	-	42.1	88.6	150.4	494.1
	無処理	0	+	51.5		1.0	3.7
	陰性対照 (DMSO)	0	+	59.5	100.0	2.2	7.8
	検体	60 ng	+	53.8	90.4	1.8	8.4
		150 ng	+	48.1	80.8	2.2	7.7
300 ng		+	44.9	75.5	3.2	9.6	
600 ng		+	29.9	50.3	0.4	2.0	
陽性対照 (DMBA)	15.4 μg	+	15.7	26.4	55.4	120.6	
実験 2	無処理	0	-	97.0		13.6	25.6
	陰性対照 (DMSO)	0	-	95.3	100.0	15.6	40.5
	検体	20 ng	-	95.9	100.6	3.8	11.6
		50 ng	-	95.4	100.1	6.9	19.3
		100 ng	-	71.0	74.5	5.2	16.0
		200 ng	-	17.2	18.1	2.6	9.5
	陽性対照 (EMS)	1.0 mg	-	75.8	78.2	249.6	750.3
	無処理	0	+	96.0		3.0	7.7
	陰性対照 (DMSO)	0	+	96.8	100.0	4.6	10.0
	検体	60 ng	+	86.1	89.0	1.8	5.3
		150 ng	+	74.6	77.1	3.4	10.4
300 ng		+	71.4	73.8	5.0	21.2	
600 ng		+	51.6	53.3	3.8	14.5	
陽性対照 (DMBA)	15.4 μg	+	23.4	24.2	50.6	135.5	

^a: 培養 7 日後 50 細胞以上を有するコロニー数 / 播種細胞数 x 100。2 フラスコの平均値。

^b: テオグアニン選択培地で 7 日間培養後 50 細胞以上を有する突然変異体コロニー数。4 シャーレの平均値。

DMSO: ジメチルスルホキシド

EMS: エチルメタンサルホネート

DMBA: 9, 10-ジメチル-1, 2-ベンズアントラセン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

1-11-1-7 チャイニーズ・ハムスターの肺培養細胞 (V79) を用いた前導突然変異誘発性試験

(資料 追 10)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1993 年

検体の純度 :

方 法 : 継代培養したチャイニーズ・ハムスター由来の肺細胞 (V79) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で、6-チオグアニン (6-GT) 耐性前導突然変異誘発性を検定した。

検体処理時間は2時間とし、処理後7日間正常培地でインキュベートし、突然変異コロニー数を調べた。その後6-GT培地で7~10日培養し、変異体コロニー数及びコロニー形成率を調べた。

処理群の生存細胞 10^6 個あたりの突然変異コロニー数が対照群の3倍以上及び試験に再現生がある場合、陽性と判定した。溶媒にはジメチルスルホキシド (DMSO) を用い、陽性対照として、S9 mix(-)にはメタンスルホン酸エチル (EMS) を、S9 mix(+)にはジメチルニトロソアミン (DMN) を用いた。

試験前に濃度設定のために、0.01~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度範囲でコロニー形成率について細胞毒性試験を行った。その結果、S9 mix の存在下及び非存在下において、コロニー形成率は検体 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度で著しい抑制が認められ、3.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上ではコロニーはまったく形成しなかった (表 1)。変異原性試験濃度はこれらの結果より、S9 mix 非存在下では 0.03~1.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を S9 mix 存在下では 0.10~1.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を選択した。

突然変異試験は S9 mix(+) で 4 回 S9 mix(-) で 3 回独立した試験を行った。

結 果 : 結果を次頁以降の表 1~3 に示した。

表 1. 細胞毒性試験結果

用量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S9 mix (-)		S9 mix (+)	
	細胞数	コロニー形成率	細胞数	コロニー形成率
溶媒対照 (DMSO)	100	100	100	100
0.01	111	91	105	76
0.03	98	66	102	91
0.1	98	88	107	89
0.3	111	84	90	107
1.0	172	3	154	15
3.3	200	0	130	< 1
10	183	0	145	0
33	192	0	146	< 1
100	175	0	159	0

表中の数値は溶媒対照群を 100 とした場合の割合 (%)

表 2. S9 mix(-)の結果

試験	用量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0日目の コロニー形成率 (%)	7日目の コロニー形成率 (%)*	プレート当りの 平均変異コロニー数	10^6 個当りの 突然変異率
1	溶媒対照 (DMSO)	100	55	0.8	1.4
	0.03	101	64	1.0	1.6
	0.10	-	-	-	-
	0.33	-	-	-	-
	0.56	48	60	0.8	1.3
	1.00	25	70	1.4	2.1
	1.33	< 1	72	2.3	3.2
	陽性対照 (EMS)	41	62	21.8	35.1
2	溶媒対照 (DMSO)	100	98	0.6	0.6
	0.03	-	-	-	-
	0.10	-	-	-	-
	0.33	80	89	3.1	3.5
	0.56	47	95	1.0	1.1
	1.00	7	103	0.4	0.4
	1.33	1	91	12.4	13.6
	陽性対照 (EMS)	134	86	33.6	39.1
3	溶媒対照 (DMSO)	100	124	0.6	0.5
	0.03	84	128	0.8	0.6
	0.10	81	113	0.7	0.6
	0.33	94	147	1.0	0.7
	0.56	107	155	2.4	1.6
	1.00	15	128	1.1	0.9
	1.33	-	-	-	-
	陽性対照 (EMS)	126	151	38.4	25.4

DMSO: ジメチルスルホキシド

EMS: エチルメタンサルホネート (6mM)

-: コロニーにより検出なし。

*: 0日目のコロニー形成率を 100 とした場合の割合 (%)

表 3. S9 mix(+)の結果

試験	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	0日目の コロニー形成率(%)	7日目の コロニー形成率(%)*	プレート当りの 平均変異コロニー数	10^5 個当りの 突然変異率
1	溶媒対照 (DMSO)	100	74	1.4	2.0
	0.03	-	-	-	-
	0.10	-	-	-	-
	0.33	85	78	1.3	1.6
	0.56	78	71	1.5	2.1
	1.00	27	62	2.8	4.5
	1.33	10	75	2.6	3.5
	陽性対照 (DME)	79	76	11.6	15.4
2	溶媒対照 (DMSO)	100	97	1.3	1.3
	0.03	-	-	-	-
	0.10	-	-	-	-
	0.33	93	73	1.6	2.2
	0.56	-	-	-	-
	1.00	13	78	3.7	4.7
	1.33	7	77	2.1	2.8
	陽性対照 (DME)	101	93	12.7	13.7
3	溶媒対照 (DMSO)	100	67	0.5	0.8
	0.03	-	-	-	-
	0.10	84	76	0.3	0.4
	0.33	88	73	0.6	0.8
	0.56	84	61	1.0	1.7
	1.00	65	68	4.6	6.8
	1.33	42	52	4.5	8.7
	陽性対照 (DME)	81	82	15.2	18.5
4	溶媒対照 (DMSO)	100	157	0.9	0.6
	0.03	-	-	-	-
	0.10	111	149	1.8	1.2
	0.33	121	137	1.5	1.1
	0.56	137	157	3.5	2.2
	1.00	55	164	5.6	3.4
	1.33	12	143	9.0	6.3
	陽性対照 (DME)	158	150	30.3	20.2

DMSO: ジメチルスルホキシド

DME: ジメチルトロツミン (8mM)

-: コンタミによりデータなし。

*: 0日目のコロニー形成率を 100 とした場合の割合(%)

検体処理により、S9 mix 存在下において 3 試験で生存細胞 10^5 個あたりの平均突然変異コロニー数が溶媒対照の 3 倍以上に増加した。このうち試験 3 の突然変異率は蓄積対照データの範囲を超えていたが、他の試験 1 及び 2 は範囲内であった。試験 4 を追加実施したところ試験 3 と同様に蓄積対照を上回りかつ溶媒対照の 3 倍を超える突然変異率が検出された。S9 mix 存在下において用量関連性があり、かつ再現性のある突然変異率の増加が確認された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

S9 mix 非存在下において試験 2 の $1.33 \mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度で陽性と判断される突然変異率 (13.6) がみられたが、この濃度は溶媒対照に比してコロニー形成率が 1% と大変毒性が高い濃度であることから、生物学的な関連はないと思われた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

1-11-2 染色体異常誘発性

1-11-2-1 チャイニーズハムスター由来の V79 細胞を用いた *in vitro* 細胞遺伝学的試験

(資料 27)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1988 年

検体の純度:

方法: 継代培養したチャイニーズハムスター由来 V79 細胞を用い、代謝活性化系の存在下及び非存在下で染色体異常誘発性を検定した。

検体は DMSO に溶解して、以下の濃度で試験した。

S9 Mix 非存在下: 7 時間後採取区: 50、100、300、600ng/mL
18 時間後採取区: 5、25、50、100、300、600ng/mL
28 時間後採取区: 50、100、300、600ng/mL

S9 Mix 存在下: 7 時間後採取区: 1000、2000、3500、5000ng/mL
18 時間後採取区: 100、500、1000、2000、3500、5000ng/mL
28 時間後採取区: 1000、2000、3500、5000ng/mL

なお、溶媒対照 (DMSO) 及び陽性対照 [S9 Mix 非存在下: エチルメタンサルホネート (EMS)、S9 Mix 存在下: シクロホスファミド (CPA)] を加えた。

細胞を 4 時間処理後、生理食塩液で洗浄後、通常の培地と交換し、処理開始 5、15.5 又は 25.5 時間後にコルセミドを添加して、細胞分裂を停止させた。処理濃度当り、2 枚のスライドを作成して固定、アセトオルセインで染色した。

染色体異常の評価に当り、最高濃度はコロニー形成率を約 20~50% まで低下させ、さらに、可能なら分裂活性 (有糸分裂中の細胞の百分率) を約 50% 抑制する濃度として以下を選定して評価した。

S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
7 時間: 600ng/mL	7 時間: 5000ng/mL
18 時間: 25、50、600ng/mL	18 時間: 500、1000、5000ng/mL
28 時間: 300ng/mL	28 時間: 3500ng/mL

観察は各濃度で少なくともスライド当り 100 個の分裂中期像を観察し、染色体異常は切断、断片、欠失、交換、細粉化及びギャップに分類した。

濃度設定根拠: S9 Mix 非存在下で 1~1000ng/mL の範囲及び S9 Mix 存在下で 100~5000ng/mL の範囲の 8 濃度で細胞毒性について検討した結果、溶媒対照に比し 600ng/mL (S9 Mix 非存在下) でコロニー形成率が 13%、又 5000ng/mL (S9 Mix 存在下)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

で 40%であったことから、本試験の最高濃度は、S9 Mix 非存在下で 600 $\mu\text{g/ml}$ 、S9 Mix 存在下で 5000 $\mu\text{g/ml}$ とした。

結 果：

細胞毒性：染色体異常について評価した処理区の分裂細胞数を表 1 に示す。

表 1 分裂細胞数 (分裂細胞数は各群スライド 2 枚のそれぞれから 1000 細胞を観察して求めた。)

試料採取 時期	薬物	濃度 (ng/mL)	S-9 mix の有無	実験 1		実験 2	
				分裂細胞数	対対照比	分裂細胞数	対対照比
処理開始 7 時間後	溶媒対照(DMSO)	1%	-	8.0	100.0	9.5	100.0
	検体	600	-	8.0	100.0	5.2	54.5
	溶媒対照(DMSO)	1%	+	9.7	100.0	8.5	100.0
	検体	5000	+	2.8	28.9	3.9	59.2
処理開始 18 時間後	陰性対照	0	-	10.2	100.0	22.7	100.0
	溶媒対照(DMSO)	1%	-	11.9	100.0	18.7	100.0
	検体	25	-	8.9	75.1	14.8	79.1
		50	-	8.9	75.1	16.8	89.8
		600	-	15.4	130.0	13.7	73.5
	陽性対照 (EMS)	0.72 mg/mL	-	16.9	165.7	14.8	65.0
	陰性対照	0	-	11.8	100.0	12.7	100.0
	溶媒対照(DMSO)	1%	+	10	100.0	12.7	100.0
	検体	500	+	12.6	126.6	13.1	103.2
		1000		15.4	154.3	14.7	116.2
		5000	+	2.6	26.1	6.5	51.0
	陽性対照 (CPA)	1.4 $\mu\text{g/mL}$	+	12.9	109.8	10.5	82.6
	処理開始 28 時間後	溶媒対照(DMSO)	1%	-	12.1	100.0	10.4
検体		300	-	9.8	80.6	9.0	87.0
溶媒対照(DMSO)		1%	+	11.2	100.0	4.7	100.0
検体		3500	+	12.4	110.8	2.6	54.4

S9 mix 存在下において、7 時間及び 18 時間の固定時期では最高用量で処理後、分裂指数が再現性のある減少を示し、検体は細胞毒性を有することを示唆していた。

S9 mix 非存在下において、28 時間の固定時期では軽度であるが、再現性のある分裂指数の減少が 300ng/mL の処理後に観察された。7 時間及び 18 時間の固定時期では、分裂指数の減少は実験 II においてのみ認められた。この処理区 (600.0ng/mL) について、さらに 2000 細胞を用いて分裂指数の再評価を行ったが、この差を明白にすることはできなかった (表 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 BASF ジャパン株式会社にある。

表 2 分裂指数の再評価結果 (分裂細胞数は各群スライド 2 枚のそれぞれから 2000 細胞を観察して求めた。)

試料採取 時期	薬物	濃度 (ng/mL)	S-9 mix の有無	実験 1		実験 2	
				分裂細胞数	対対照比	分裂細胞数	対対照比
処理開始 7 時間後	溶媒対照(DMSO)	1%	-	9.5	100.0	10.5	100.0
	検体	600	-	9.8	102.6	5.0	47.6
処理開始 18 時間後	溶媒対照(DMSO)	1%	-	26.8	100.0	29.6	100.0
	検体	600	-	29.3	109.3	23.3	78.5
処理開始 28 時間後	溶媒対照(DMSO)	1%	+	31.6	100.0	8.1	100.0
	検体	3500	+	29.8	94.1	6.6	80.9

染色体異常誘発性：染色体の観察結果を表 3 に示す。

S9 Mix 非存在下では、7 時間の群 (600ng/mL) では再現性のある構造的染色体異常の増加が認められた。18 時間の群では、細胞毒性を誘発する濃度で構造的染色体異常の増加が認められた。28 時間の群では構造的染色体異常の増加は認められなかった。

S9 Mix 存在下では 5000ng/mL (7 時間および 18 時間) および 3500ng/mL (28 時間) の処理後、再現性のある構造的染色体異常の増加が認められた。

一方、陽性対照として用いた EMS ならびに CPA では、すべての処理群で明確な構造的染色体異常を有する細胞が増加した。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で、チャイニーズハムスター由来 V79 細胞株に構造的染色体異常を誘発すると判断する。

表3 染色体異常の出現頻度（上段は実験1、下段は実験2の結果である。空欄は該当の異常なし。）

S-9 Mixの有無	薬剤	試料採取時期 (処理開始後時間)	濃度 (ng/mL)	異常を有する細胞数(分裂中期細胞 200 個当り)									異常細胞出現率(%)		評価	
				染色体型異常						染色分体型異常			Gapを含む	Gapを除く		
				Gap	切断	断片	欠失	MA	交換	細粉化	Gap	切断				断片
無	溶媒対照	7	-	1	1	1							0	1.50	1.00	
	検体			6	0	0								2	4.00	
	陰性対照	18	-	2	1	1				0				1.50	0.50	
	溶媒対照			4	1	0				1				3.00	1.00	
	検体	25	6	0	3				1				0	5.00	2.00	
			6	1	0				0			1	4.00	1.00		
		50	2	1	1	1		2		0	0	0	3.50	2.50	-	
			6	1	0	0		1		1	1	1	3.00	1.50		
	600	3	1	3		1	1		0	0	0	3.50	2.50	+		
		12	3	3		6	30		1	1	0	22.00	16.50			
	陽性対照	0.72	9	3	1			13		1	2	1	13.00	8.00	+	
	溶媒対照		15	2	1			12		1	0	3	12.50	8.00		
	溶媒対照	28	-	2	0				1					1.50	0.50	
	検体			1	2				0					1.50	1.00	
有	溶媒対照	7	-	3	1	1			1		0	0	1	2.50	1.00	
				3	0	0			1		0	1	0	2.50	1.00	
	検体	5000	20	13	7						1	1	1	14.50	8.00	+
	15		9	12					0	0	1	14.00	10.50			
	陰性対照	18	-	4	0	0						0	3	2.50	0.50	
	溶媒対照			1	1	2						2	0	2.00	1.50	
	検体	500	6	2	2	0							4.00	2.00		
			2	3	1	1							3.50	2.50		
		1000	3		1	1		1					1	3.50	2.00	-
			0		0	0		0					0	0.00	0.00	
5000	9		0			1		0	1	0	4.50	0.50	+			
	4		2			4		2	0	1	4.50	2.00				
陽性対照	1.4	13	9	7	2	1	48	0	1	3	4	29.50	26.50	+		
		22	7	3	0	2	29	2	1	3	0	24.00	16.50			
溶媒対照	28	-	5		1			1					3.50	1.00		
検体			0		0			0					0.00	0.00		
3500	8	6	5		18	63	1	1	1	2	17.50	15.50	+			
	9	2	2		4	18	0	0	0	0	9.00	6.50				

注：陽性対照：EMS 0.72mg/mL (S9 Mix 非存在下)、CPA 1.4µg/mL (S9 Mix 存在下)。 溶媒対照：DMSO
 Gap：ギャップ MA：多発異常(ギャップを除く5以上の異常、交換のみで、その他の異常はみられなかった)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

1-11-2-2 ラットの骨髄細胞を用いた染色体異常試験

(資料 28)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1990 年

検体の純度:

供試動物: Wistar 系ラット(5週齢)1群雌雄各 18 匹、ただし陽性対照群は雌雄各 6 匹、

開始時平均体重約 140~180g

方法: 検体をポリエチレングリコール 400 に懸濁して、容量 10mL/kg で 22.3、106.0 及び 393.5mg/kg(分析により求めた用量)を単回強制経口投与した。なお、陽性対照群にはシクロホスファミド 20mg/kg を、陰性対照群には溶媒を同様に投与した。

投与後 6、24 及び 48 時間後に各群雌雄各 5 匹(ただし、陽性対照群は投与後 24 時間のみ)を屠殺した。屠殺 2.5 時間前にコルセミド 2.0mg/kg を腹腔内投与して、細胞分裂を停止させた。各動物から大腿骨の骨髄を採取してスライドガラス上に塗抹固定後、ギムザ染色し、骨髄標本を作製した。

陽性対照群は 24 時間後に、陰性対照群は 6、24 及び 48 時間後に屠殺した。

各標本について、細胞毒性を検査するため、1000 個の細胞について有糸分裂細胞を数えて、細胞分裂指数(%)を算出した。

各動物当り 50 個の分裂中期像について染色体のギャップ、切断、細片、欠失、交換及び細粉について検査した。異常細胞率の算出にはギャップを除いた。

用量設定根拠: 予備試験で 1 群雌雄各 3 匹に約 400mg/kg を経口投与し、48 時間観察したところ、自発運動の減少、眼瞼閉鎖及び無関心等の症状がみられたが、死亡例はみられなかったので、400mg/kg を最大用量とした。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

結果： 393.5mg/kg 投与群では、全動物が自発運動の減少、眼瞼閉鎖及び無関心を示した。

染色体異常試験結果を下表に示す。

投与後 時間	群 (mg/kg)	検査 細胞 数	染色体異常数										異常 細胞 (%)	細胞分 裂指数		
			染色体型							染色分体型						
			g	b	f	d	ma	ex	cd	g	b	f				
6	陰性 対照	500	1	2	7	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.0	3.18
	22.3	500	6	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0	3.02
	106.0	500	5	2	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.8	3.29
	393.5	500	2	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0	2.01
24	陰性 対照	500	4	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.8	1.91
	22.3	500	1	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.2	2.51
	106.0	500	4	2	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1.8	2.39
	393.5	500	5	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.8	2.94
	陽性 対照	500	10	5	21	1	75	270	8	0	1	5	25.4	2.66		
48	陰性 対照	450	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0.4	4.43	
	22.3	500	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	2	0.8	3.08	
	106.0	500	2	1	6	0	0	0	0	1	1	3	1.8	3.59		
	393.5	500	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	2.52	

g: ギャップ b: 切断 f: 断片 d: 欠失、
 ma: 多発異常(ギャップを除く5以上の異常、交換のみで、その他の異常はみられなかった)
 ex: 交換 cd: 染色体細粉

検体投与群では、陰性対照群と比較して染色体異常を有する細胞数の統計学的有意な増加はみられなかった。

一方、陽性対照のシクロホスファミドでは染色体異常を有する細胞数の明瞭な増加がみられた。

以上の結果から、検体は本試験条件下で、ラットの骨髄細胞に対して染色体異常誘発性を有しないと判断する。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

1-11-3-1 マウスの骨髓細胞を用いた小核試験

(資料 29)

試験機関:

報告書作成年: 1984 年

検体の純度:

試験動物: Emd: NMRI 系マウス (8~10 週齢、体重: 雄 41~49g、雌 28~36g)、1 群雌雄各 5 匹

方法: 検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC) に懸濁して、その 10mL/kg を 1、10 及び 100mg/kg の用量で単回強制経口投与した。なお、対照群には 0.5%CMC (陰性) 及びエンドキサン 20mg/kg (陽性) を同様に投与した。

100mg/kg 群は投与後 24、48 及び 72 時間に、その他の群は投与 24 時間後に屠殺して、各動物の大腿骨の骨髓を採取して塗抹標本を作製し、ギムザ液で染色した。

各標本について、細胞毒性を調べるために、1000 個の赤血球を観察し、多染性赤血球数と正染性赤血球数を計数した。又、2000 個の多染性赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球数を計数した。同時に小核を有する正染性赤血球数も計数した。

正染性赤血球数と多染性赤血球数の比を求め、2000 個の正染性赤血球当りの小核を有する正染性赤血球数の外挿値も求めた。

結果:

採取時間	薬物	投与量 (mg/kg)	性	観察動物数	0	MNPCE 数 / 2000PCE	MNNCE 数 / 2000NCE
24 時間	陰性対照 (0.5%CMC)	-	雄	5	1.3	2.4	2.4
			雌	5	1.1	3.4	1.4
			雄+雌	10	1.2	2.9±1.37	1.9±1.10
	エンドキサン	20	雄	5	0.9	14.8	2.4
			雌	5	0.8	19.4	1.4
			雄+雌	10	0.8	17.1±4.98†	1.9±1.20
	検体	1	雄	5	1.3	2.0	1.6
			雌	5	1.0	4.2	2.2
			雄+雌	10	1.1	3.1±2.51	1.9±1.10
		10	雄	5	1.0	3.8	2.8
			雌	5	1.0	2.2	2.2
			雄+雌	10	1.0	3.0±2.26	2.5±1.18
100	雄	5	1.1	4.0	3.6		
	雌	5	1.1	4.8	1.4		
	雄+雌	10	1.1	4.4±2.46	2.5±2.17		
48 時間	100	雄	5	1.2	2.6	3.0	
		雌	5	1.0	3.0	2.2	
		雄+雌	10	1.1	2.8±2.10	2.6±1.51	
72 時間	100	雄	5	1.1	5.2	3.0	
		雌	5	0.9	3.8	4.2	
		雄+雌	10	1.0	4.5±3.72	3.6±2.68†	

0: 正染性赤血球数と多染性赤血球数との比

MNPCE: 小核を有する多染性赤血球

MNNCE: 小核を有する正染性赤血球 (外挿値)

統計学的方法: Mann-Whitney-Wilcoxon 検定の Krauth 変法

PCE: 多染性赤血球

NCE: 正染性赤血球

††: 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 BASF ジャパン株式会社にある。

小核を有する多染性赤血球数の有意な増加は認められなかった。

100mg/kg 群の投与 72 時間後の小核を有する正染性赤血球数の外挿値は有意(棄却域)であったが、他の試験の陰性対照群における値(小核を有する正染性赤血球数 0~8 個/正染性赤血球数 2000 個；陰性対照動物数 n=40)と同様であること、及び明確な増加が認められた場合のみ生物学的に関連があると考えられることから、この値は偶発的であると判断される。

結論： 以上の結果から、検体は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る。

1-11-3-2 ラットの骨髓細胞を用いた *in vivo* 小核試験

(資料 追19)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2009 年

検体の純度：

供試動物： Wistar Han 系ラット (CrI:WI (Han), 1 群雌雄各 5 匹

開始時週齢：7-9 週齢、開始時平均体重：199g

方法： 検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC) に懸濁して、その 10mL/kg を 50、100、150mg/kg (雄) および 25、50、75mg/kg (雌) の用量で単回強制経口投与した。なお、陰性対照として溶媒 (0.5%CMC) および無処置を、陽性対照としてシクロホスファミド 20mg/kg を同様に投与した。

雌雄の高用量群は投与後 6、24 及び 48 時間に、その他の群は投与 24 時間後に屠殺して、各動物の大腿骨の骨髓を採取して塗抹標本を作製し、メイグルンワルド-ギムザ液で染色した。

各標本について、2000 個の多染性赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球数を計数した。同時に正染性赤血球数も計数し、以下の項目を記録した。

- ・ 多染性赤血球数
- ・ 小核を有する多染性赤血球
- ・ 正染性赤血球
- ・ 小核を有する正染性赤血球
- ・ 多染性赤血球と正染性赤血球の比

用量設定： ラットの急性経口毒性試験において、50mg/kg 用量を投与した雌動物に死亡のない明瞭な毒性がみられ、*in vivo* 遺伝毒性試験において 75mg/kg 用量を投与した雌ラットに重篤な臨床症状が観察された。本試験の予備として 150mg/kg 用量を雄ラットに投与したところ 24 時間後の時点で重篤な毒性徴候を示した。ラットを用いた代謝試験において血中 T_{max} が 6 時間後、尿中排泄が最も多いのが 24 時間後であることから、以下の用量と採取時間を選定した。

雄：50、100、150mg/kg

雌：25、50、75mg/kg

採取時間：6、24、48 時間

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

結 果： 結果を表1に示す。

採取時間	薬物	投与量 (mg/kg)	性	動物数	PCE2000 個当りの NCE 数	PCE/NCE 比	MNPCE 数 /2000PCE	MNNCE 数 /2000NCE	
6	陰性対照 (無処置)	-	雄	5	828.2	2.4	1.7	0.5	
			雌	5	1303.2	1.5	1.2	0.2	
	陰性対照 (0.5%CMC)		雄	5	730.2	2.7	1.0	0.3	
			雌	5	1763.8	1.1	0.7	0.6	
	ジチリン		150	雄	5	997.0	2.0	2.1	1.2
			75	雌	5	2102.0	1.0	0.9	0.3
24	陰性対照 (無処置)	-	雄	5	873.4	2.3	2.2	0.2	
			雌	5	1716.2	1.2	1.0	0.5	
	陰性対照 (0.5%CMC)		雄	5	858.4	2.3	1.2	0.5	
			雌	5	1412.4	1.4	1.6	0.0	
	ジチリン		50	雄	5	1094.2	1.8	1.8	0.2
			100		5	1034.8	1.9	1.2	0.4
			150		5	1132.8	1.8	2.4	0.2
			25	雌	5	1797.0	1.1	1.3	0.3
			50		5	1813.2	1.1	1.2	0.0
			75		5	2426.6	0.8	2.1	0.6
	陽性対照 (OPP)		20	雄	5	2905.0	0.7	[†] 15.1	1.9
			雌	5	3789.6	0.5	[†] 12.0	1.4	
48	陰性対照 (無処置)	-	雄	5	911.2	2.2	2.0	1.5	
			雌	5	1176.0	1.7	1.1	0.3	
	陰性対照 (0.5%CMC)		雄	5	1019.2	2.0	1.2	0.6	
			雌	5	1558.0	1.3	1.8	0.4	
	ジチリン		150	雄	5	1118.2	1.8	2.5	0.0
			75	雌	5	1181.0	1.7	2.0	0.2

表中の数値は群平均値を示す。

MNPCE：小核を有する多染性赤血球

PCE：多染性赤血球

MNNCE：小核を有する正染性赤血球

NCE：正染性赤血球

統計学的方法：Wilcoxon 検定(片側) ††：p≤0.05 †‡：p≤0.01

陰性対照群と比較して検体投与群は小核を有する多染性赤血球数の有意な増加は認められなかった。一方陽性対照は雌雄とも有意な増加を示した。

雌の 75mg/kg 群の 24 時間後屠殺動物の PCE/NCE の低下が見られており、被験物質は骨髓に達し毒性を示していると思われた。

結 論： 以上の結果から、検体は本試験条件下で骨髓多染性赤血球に小核を誘発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 BASF ジャパン株式会社にある。

1-11-4 DNA 損傷誘発性

1-11-4-1 細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 22)

試験機関:

報告書作成年: 1976 年

検体の純度:

方法: 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の組換修復機構保持株 (H17) と欠損株 (M45) を用い、賀田らの Rec-assay 法で DNA 損傷の誘発性を検定した。

溶媒として DMSO を用いた。検体の DMSO に対する溶解限度を最高用量として、6 用量 (10~2000 $\mu\text{g}/\text{disk}$) で試験を実施した。陰性対照としてカナマイシンを 10 $\mu\text{g}/\text{disk}$ の用量で、陽性対照としてマイトマイシン C を 0.1 $\mu\text{g}/\text{disk}$ の用量で用いた。試験は各用量 2 枚のプレートで実施した。

結果:

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	阻止域 (mm)		差 (mm)
		M-45	H-17	
対照 (DMSO)	—	0	0	0
ジチアノン	10	<1	0	<1
	20	<1	0	<1
	100	1	0	1
	200	1	0	1
	500	1	0	1
	1000	1.5	0.5	1
	2000	2.5	1	1.5
陰性対照 (カナマイシン)	10	6.5	5.5	1
陽性対照 (マイトマイシン C)	0.1	11.5	1.5	10

検体処理群では、最高用量でも両株に生育阻止を認めなかった。

一方、陽性対照のマイトマイシン C では、両株間に明らかな生育阻止の差が生じた。

以上の結果より、本剤は DNA 損傷の誘発性がないものと判断される。

1-11-4-2 細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 30)

試験機関:

[GLP]

報告書作成年: 1991 年

検体の純度:

方法: 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の組換え修復機構保持株 (H-17) と欠損株 (M-45) を用い、代謝活性化及び S9 Mix 非存在下によって DNA の損傷の誘発性を検定した。

被験物質を溶解させるため、DMSO を用いた。予備試験の結果から、S9 Mix 非存在下は 1000 $\mu\text{g}/\text{disk}$ を最高用量とし 6 用量 (10.2~1000 $\mu\text{g}/\text{disk}$)、S9 Mix 存在下 21000 $\mu\text{g}/\text{disk}$ を最高用量とし 6 用量 (20.5~2000 $\mu\text{g}/\text{disk}$) で試験を実施した。

陰性対照として S9 Mix 非存在下ではカナマイシンを 0.3 $\mu\text{g}/\text{disk}$ の用量で、陽性対照としてマイトマイシン C を 0.02 $\mu\text{g}/\text{disk}$ 、S9 Mix 存在下では陽性対照として Trp-P-1 を 20 $\mu\text{g}/\text{disk}$ の用量で用いた。試験は各用量 3 枚のプレートで実施した。

結果:

代謝活性化の有無	薬物	濃度 (μ/disk)	阻止帯の径 (mm)*		差 (mm)
			M-45	H-17	
無	対照 (DMSO)	0	0.0	0.0	0.0
	検体	10.2	6.7	7.0	<0.0
		25.6	11.0	12.3	<0.0
		64.0	16.2	16.8	<0.0
		160	22.3	23.4	<0.0
		400	25.6	26.4	<0.0
		1000	28.6	29.1	<0.0
	陰性対照 (カナマイシン)	0.3	6.6	5.5	1.1
陽性対照 (マイトマイシン C)	0.02	15.7	0.7	15.0	
有	対照 (DMSO)	0	0.0	0.0	0.0
	検体	20.5	1.0	1.5	<0.0
		51.2	4.2	4.2	0.0
		128	6.6	6.7	<0.0
		320	9.1	8.7	0.4
		800	12.2	11.6	0.6
		2000	13.1	13.6	<0.0
	陽性対照 (Trp-P-1)	20	10.4	0.0	10.4

* 阻止帯の径は 3 回の平均値

検体処理群では S9 Mix 非存在下の最高用量である 1000 $\mu\text{g}/\text{disk}$ 及び S9 Mix 存在下の最高用量である 2000 $\mu\text{g}/\text{disk}$ においても両株に生育阻止の有意な差は認められなかった。

一方、陽性対照のマイトマイシン C 及び Trp-P-1 では明らかな生育阻止の差が生じた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

以上の結果より本検体は DNA 損傷の誘発性が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 BASF ジャパン株式会社にある。

1-11-5-1 ラット肝細胞を用いた in vitro 不定期 DNA 合成試験

(資料 31)

試験機関：

報告書作成年：1986 年

検体の純度：

試験方法：

供試細胞：Wistar CF HB 系ラット雄(8~12 週齢)から分離した初代培養肝細胞を用いた。

処理：検体は DMSO に溶解し、最高最終濃度を 20.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とし、0.10~20.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 培地の範囲で 6 濃度を用いた。陰性対照として DMSO 1%、陽性対照は DMBA (7,12-ジメチルベンズ(a)アントラセン) 25.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 培地を用いた。各濃度 6 反復で行った。

3.5~4 x 10⁶ 個の初代培養肝細胞を含むヒドロキシ尿素添加培地(最終濃度 15 mM)を 1 時間振とう培養した。ついで、検体溶液及び (³H)-チミジン(1.0 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$) を添加し、さらに 3 時間培養を継続した。培養は 37°C、95% O₂/5% CO₂ 気中で行った。

核の分離：4 時間培養後、細胞を燐酸緩衝生理食塩液で洗浄し、チミジン(0.5 mg/mL)を各試料に添加した。細胞に融解液(10 mM Tris-HCl; 15 mM NaCl; 1.5 mM MgCl₂; Nonidet P40 0.5%, pH 8.5)を添加して室温で 10 分間融解し、細胞核を遠沈し、ペレットを Nonidet P40 を含まない融解液で洗浄した。

DNA の分離：この細胞核を融解液(2.5 mM EDTA; 2% SDS; 0.1M ; 1 mg/mL プロテイナーゼ K, pH 10)を用いて、37°C で 30 分間融解した。DNA は 10%トリクロロ酢酸(TCA)を添加して沈殿させ、4°C で 30 分間冷却後遠沈して、ペレットを 5% TCA に再溶解した(90°C で 20 分間)。

DNA 含量の測定：Burton 法に従い、比色法で測定した。

放射能の測定：放射能は LSC で測定した。結果は (³H)-チミジン取り込み量を dpm/ μg DNA として示した。

結果の判定：(³H)-チミジン取り込み量が細胞毒性を認めるまでの濃度、あるいは溶解限度で陰性対照の範囲内にあるとき、検体は陰性と判定する。陰性対照の 2 倍以上の (³H)-チミジン取り込み量の増加が検体の 1 濃度以上で見られるとき、陽性と判定する。

用量設定根拠：検体濃度が 1~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で 4 濃度を用い、処理 3 時間後の細胞の生存率を測定した結果、10 及び 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 区の生存率が陰性対照区に比し、79%及び 0%であったことから、本実験の最高濃度を 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ として、6 濃度を設定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

結果：³H-チミジン取り込み量を次表に示す。

薬物	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	³ H-チミジン取込量 (dpm/ μg DNA)
溶媒対照 (DMSO)		187.4
検体	0.10	190.5
	1.00	197.2
	5.00	155.9
	10.00	168.7
	15.00	175.0
	20.00	113.8
陽性対照 (DMBA)	25.64	454.1

DMBA : 7,12-ジメチルベンズ(a)アンスラセン

検体はいずれの濃度においても、³H-チミジンの取込量の増加が認められなかった。

一方、陽性対照として用いた DMBA では ³H-チミジンの取込量に顕著な増加(溶媒対照の 2.4 倍)が認められた。

以上の結果から、本検体は不定期 DNA 合成を誘発しないと判断される。

1-11-5-2 ラット肝細胞を用いた *in vivo* 不定期 DNA 合成試験

(資料 追16)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：2009年

検体の純度：

供試動物： Wistar Han 系ラット (CrI:WI (Han), 1群雌5匹
開始時週齢；8-10週齢、開始時平均体重；206g

試験方法： 検体を0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁し、25および50mg/kgの用量を単回強制経口投与した。投与容量は10mL/kgとした。陽性対照として2-アセチルアミノフルオレン(2-AAF)50mg/kgおよび陰性対照(溶媒対照)を同時に設けた。投与3及び14時間後に動物を麻酔下で肝臓を遠流し、初代肝細胞を採取した。肝細胞はWilliams E不完全培地(WMEI)で洗浄し、滅菌ガーゼで濾過した懸濁液を遠心分離して上清を捨て、ペレットをWMEIに懸濁して単離細胞の懸濁液を調製した。

肝細胞の生存性はトリパンブルー染色で確認して細胞数を計測し、生存率を計算した。また顕微鏡下で形態学的変化を確認し、細胞毒性を調べた。

単離した肝細胞のWilliam E完全培地(WMEC)2mL(生存細胞 $4-8 \times 10^5$ 個)をプレートに播種し、37°C、5%CO₂及び90%以上の湿度条件で約2時間培養した。その後培地を取り除いて³H-チミジン含有の標識溶液を添加し、37°C、5%CO₂、90%以上の湿度条件で4時間培養して付着させた。標識後、洗浄し、2mLの非標識チミジン溶液を添加して5%CO₂、90%以上の湿度条件下で約12時間培養した。その後、細胞をエタノール/酢酸(3:1,v/v)で約30分固定、洗浄し、カバースリップをマウントして一晩乾燥させてオートラジオグラフィにかけた。

用量設定根拠： ラットにおける急性経口投与試験のLD₅₀値が約300mg/kgで50mg/kgで死亡を伴わない毒性徴候が認められた。雄に50mg/kgを投与した別の試験では毒性徴候がなかった。雌の方が感受性が強いことから本試験には雌を用い、50及び25mg/kgを選択した。

試験の成立： 以下の条件を満たす場合試験は成立する。

- ・ 溶媒対照の動物から得た細胞の生存率>70%
- ・ スライドの品質として群あたり分析可能な細胞が300個以上である。
- ・ 陰性対照の正味の核グレイン数(NNGC)<0

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

- ・ 陽性対照の正味の核グレイン数 (NNGC) > 0 および群あたりの修復細胞の割合が 30%以上である。

評価の基準：

以下の 2 つの基準を満たす場合陽性と判断する。

- ・ 正味の核グレイン数 (NNGC) が 1 つの試験ポイントで > 0
- ・ 修復されている細胞 (NNGC \geq 5) の割合が 20%以上である。

修復細胞 (NNGC \geq 5) の割合の用量関連性のある増加、明らかに溶媒対照群の値を超えている、修復細胞の割合 (%) が 5-19.9%、および NNGC の平均値が用量関連性があり、0 を超えないが近い値である場合はマージナルを示唆しており、追加の試験が必要である。

さらに統計学的有意差は陽性判定に証拠となる。

以下の基準を満たす場合は陰性と判断する。

- ・ 全投与群の正味の核グレイン数および修復細胞の割合 (%) が同時に実施した溶媒対照の値に近い場合。

試験結果： 結果を表 1 に示す。

表 1.

時間 (hr)	群	動物数	総細胞数	NGC (平均 \pm SD)	CGC (平均 \pm SD)	NNGC (平均 \pm SD)	修復細胞 (%)	生存率 (%)
3	溶媒対照 (0.5%CMC)	3	300	1.01 \pm 0.59	3.12 \pm 1.21	-2.10 \pm 0.67	0.0	100.0
	ジフェリン (25mg/kg) ¹	3	300	2.06 \pm 0.92	4.70 \pm 1.00	-2.63 \pm 0.21	0.0	100.6
	ジフェリン (50mg/kg) ²	3	300	1.79 \pm 0.81	4.47 \pm 1.81	-2.67 \pm 0.99	0.0	95.4
	ジフェリン (50mg/kg) ³	3	300	3.76 \pm 0.57	6.19 \pm 0.77	-2.43 \pm 0.20	1.0	90.8
	陽性対照 (2-AAF50mg/kg)	3	300	6.46 \pm 1.29	3.14 \pm 0.82	3.32 \pm 1.95	36.0	99.1
14	溶媒対照 (0.5%CMC)	3	300	3.63 \pm 1.64	6.77 \pm 2.37	-3.14 \pm 0.73	0.0	100.0
	ジフェリン (25mg/kg) ¹	3	300	3.57 \pm 1.26	7.75 \pm 2.81	-4.18 \pm 1.64	1.0	95.8
	ジフェリン (50mg/kg) ²	3	300	2.91 \pm 1.35	6.03 \pm 1.54	-3.13 \pm 0.42	1.0	91.8
	ジフェリン (50mg/kg) ³	3	300	5.82 \pm 1.93	9.42 \pm 2.88	-3.90 \pm 0.97	2.0	88.5
	陽性対照 (2-AAF50mg/kg)	3	300	10.17 \pm 3.69	5.76 \pm 0.57	4.41 \pm 4.07	47.0	99.5

NGC：核グレイン数、CGC：細胞質グレイン数、NNGC：正味のグレイン数、SD：標準偏差値

¹：低用量（実測：17.4mg/kg）、²：高用量 1（実測：35.7mg/kg）、³：高用量 2（実測：44.0mg/kg）

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

溶媒対照群および陽性対照群は試験成立の基準を満たした。検体の高用量群および低用量群ともに平均および個体別の正味核グレイン数は 0 を下回り、修復細胞率も 2.0%以下で対照群と同等であった。

よって、検体は本試験条件下においてラット肝臓の不敵 DNA 合成を誘発しないと結論した。

1-12 生体の機能に及ぼす影響(一般薬理試験)

(資料 32)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1989 年

検体の純度:

投与液の調製/投与容量: げっ歯類を用いた場合、検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC) で懸濁して所定の最高濃度とし、連続希釈して所定の低濃度とした。10mL/kg の一定容量を強制経口投与した。

1-12-1 中枢神経系に対する作用

1-12-1-1 ラットにおける Irwin の多次元行動観察

供試動物: COBS Wistar 系ラット、雄(投与時体重 151~166g)、1 群 4 匹、約 10 週齢

方法: 300 mg/10mL の懸濁液を調製し、連続希釈して 30、100 及び 300mg/kg の用量となるようにした。投与は 24 時間間隔で 2 回行なった。

初回投与 30、90、150 および 300 分後、さらに 2 回目投与 0.5、1.5、5、24、48、72、96 および 120 時間後にそれぞれ Irwin の多次元行動観察を行なった。

結果: 初回投与 30 分後より影響が観察され、主な症状は無関心、下痢、異常歩行、呼吸促迫、異常姿勢、カタレプシー等があった。

2 回目投与後の観察では、1 日目に観察された影響の程度がより増悪し、その用量依存性がより明確になった。300mg/kg 群で眼瞼下垂及び触覚反応の低下が観察された。この群の 4 例のすべてが 2 回目投与後 28 時間以内に死亡した。

生存動物においては、観察された徴候は 7 日目までにはすべて消失した。

以上の結果より、ジチアノンのラットにおける経口投与では、呼吸促迫を伴う非特異的毒性作用を引き起こすことがわかった。

1-12-1-2 マウスのヘキソバルビタール睡眠時間に対する影響

供試動物: CD-1 系マウス、雄(投与時体重 23~29g)、1 群 6 匹

方法: 100 mg/10mL の懸濁液を調製し、連続希釈して 10、30 及び 100mg/kg の用量となるようにした。投与は連続 5 日間行なった。

5 日目の投与 30 分後にヘキソバルビタールナトリウム 100mg/kg を腹腔内に投与し、マウスの睡眠開始時間と睡眠持続時間を観察した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

結 果：マウスのヘキソバルピタール平均睡眠時間は次表のとおりであった。

群	検体	用量 (mg/kg)	睡眠時間 (分)
1	0.5% CMC	—	36.40
2	ジチアノン	10	39.43
3	ジチアノン	30	31.29
4	ジチアノン	100	37.38

以上の結果により、ジチアノンの経口投与はヘキソバルピタール睡眠時間に対してほとんど影響を及ぼさなかった。

1-12-2 運動・知覚神経系に対する作用

1-12-2-1 ラットの筋弛緩作用

供試動物：Wistar 系ラット、雄(205~225g)、雌(182~206g)、1群雄雌各5匹

方 法：100 mg/10mL の懸濁液を調製し、連続希釈して 10、30 及び 100mg/kg の用量となるようにした。投与は試験 1 及び 2 日に行なった。

ラットを傾斜板にのせ、1 秒当り 7.5 度の割合で板を傾斜させ、動物が平衡を失うまで(滑り落ちるまで)に要した傾斜板の平均傾斜角度を測定した。

結 果：ラットが滑り落ちる平均角度を次表に示す。

投与量 (mg/kg)	性	投与開始後日数						
		4日	6日	8日	10日	12日	14日	16日
対照(0.5%CMC)	♂+♀	48.4	43.0	41.4	41.9	40.5	40.1	42.0
ジチアノン 10	♂+♀	50.4	39.1 ^o	38.4 ^o	41.1	36.7 ^o	35.5 ^o	40.8
ジチアノン 30	♂+♀	48.4	43.5	41.4	42.5	39.2	39.2	42.6
ジチアノン 100	♂+♀	50.6	42.5	40.7	41.5	40.2	39.4	40.8

統計学的方法：分散分析及び t-分布法 ^o : p ≤ 0.001

ジチアノン 10mg/kg 投与群では、ラットが平衡を失うまでに要した傾斜板の平均傾斜角度は、試験 6、8、12 および 14 日目に有意に緩くなった。しかし、30 および 100mg/kg 用量では何ら神経学的影響を示さなかった。

1-12-2-2 マウスの協調運動に及ぼす影響

供試動物：CD-1 系マウス雌(投与時体重 16~21g)、1群 10 匹

方 法：検体 300 mg/10mL の懸濁液を調製し、連続希釈して 30、100 及び 300mg/kg の用量となるようにした。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はBASF ジャパン株式会社にある。

検体投与前にマウスを回転棒に乗せ、運動持続時間を測定した。検体 30、100 および 300mg/kg を経口投与 45 分後にマウスを回転棒に乗せ、回転棒上に留まることができる「最長運動持続時間」を測定した。試行は連続 3 回行った。

対照薬剤としてメフェネシンを用いた。

結 果：投与前および投与後の平均最長運動持続時間を次表に示す。

群	経口投与	投与量 (mg/kg)	最長運動時間 (秒)	
			投与前	投与後
1	0.5% CMC	—	140.0	>233.0
2	ジチアノン	30	139.6	>183.11
3	ジチアノン	100	138.5	>237.4
4	ジチアノン	300	139.2	>237.2
5	メフェネシン	400	141.0	>15.10

統計学的方法：分散分析及びt-分布法 11: $p \leq 0.05$ 0: $p \leq 0.001$

ジチアノン 30mg/kg の経口投与のみ回転棒上の運動持続時間が統計学的有意に短縮した。しかし、高用量では影響は殆ど認められなかった。

対照のメフェネシンは顕著に短縮した。

1-12-3 循環器系および呼吸器系に対する作用

1-12-3-1 麻酔犬の循環器系および呼吸器系に対する作用

供試動物：ビーグル犬(雄1頭、雌2頭、約11ヵ月齢、体重12~13kg)

方 法：検体を0.5%CMCに懸濁して、容量1mL/kgを十二指腸内に投与した。

ビーグル犬をチオペントンナトリウムで麻酔(麻酔を持続させるために必要に応じてクロラロースを投与)し、最低30分間安定させた後、検体を120分間隔で用量30、100および300mg/kgを順次増量し投与した。

大腿動脈にカテーテルを挿入して、圧トランスデューサーで血流量、血圧および心拍数を電気的に測定した。気管カニューレを挿入して、呼吸気量、呼吸数および毎分換気量をトランスデューサーで電気的に測定した。

心電図は四肢に電極を挿入して測定した。

結 果：

- (1) 血圧：3例のビーグル犬での6時間にわたる平均血圧の変化は、114~109 mm Hg、150~90 mm Hg および 144~134 mm Hg で、いずれの用量でも血圧に影響がなかった。
- (2) 心拍数：2例で心拍数が徐々に減少した(204~172回/分および210~170回/分)。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

1 例で 100mg/kg 投与後、かなりの心拍数の上昇が観察されたが(160~230 回)、300mg/kgに増量してもこれ以上の心拍数の増大は認められなかった。従って、検体の影響はないと判断される。

(3)心電図：検体投与に起因すると思われる影響は認められなかった。

(4)呼吸：呼吸器系のパラメーターは麻酔状態を反映したものであり、検体投与による影響は認められなかった。

(5)大腿部血流量：麻酔犬で一般的にみられる血流量変化のパターンであり、検体投与の影響は認められなかった。

(6)末梢血管抵抗：検体投与に起因すると思われる影響は認められなかった。

以上の試験結果より、血圧および心拍数でみられた変化は、長時間の観察に基づく生体側の変化によるものと考えられ、心血管系、呼吸器系パラメーターに対して検体は何ら影響を示さなかった。

1-12-4 自律神経系に対する作用

1-12-4-1 麻酔猫の循環器系および神経系に対する作用

供試動物：猫(雌、体重 2.1~2.4kg、9~10 ヶ月齢)、3 匹

方 法：検体を 0.5%CMC を加えた 0.9%生理食塩水に懸濁して 120 分間隔で用量 30、100 および 300mg/kg を順次増量し十二指腸内に投与した。

呼吸は気管カニューレを挿入して容易にした。大腿動脈にカテーテルを挿入して、圧トランスデューサーで血圧および心拍数を電気的に測定した。橋側皮静脈にカニューレを挿入し麻酔薬とノルアドレナリンの投与を行なった。

両瞬膜の外側縁に別々の等張光電変位計をつなぎ、一对の双極電極を左頸部交感神経の節前神経幹の真下に、他の一对を右頸部交感神経幹の節後部分に設置し、神経を刺激して神経節前及び節後刺激に対する瞬膜の収縮を測定した。両側頸動脈閉塞の効果を検討した。

結 果：

(1) 血圧：30mg/kg の初回投与で 3 例中 2 例に血圧降下が認められ、1 例では変化は認められなかった。引き続き 100 及び 300 mg/kgを投与したところ 2 例ではそれ以上の影響はみられなかったが、初回投与で血圧降下の見られた 1 例は 100mg/kg を投与後、血圧がさらに下降し、投与 80 分後に死亡した。

(2)心拍数：死亡した 1 例を除き何れの投与量でも影響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 BASF ジャパン株式会社にある。

- (3) 両側総頸動脈閉塞：両側総頸動脈閉塞によって誘発された血圧上昇は、ジチアノンの初回投与(30mg/kg)によって低下したが、死亡した動物においてのみ、この変化は続く投与(100mg/kg)によってさらに低下した。誘発された心拍数の変化は、生存動物例では最終段階まで影響がなかった。しかし、死亡例では溶媒投与後、血圧変化に一致して心拍数が減少し始めた。
- (4) ノルアドレナリン応答性：ノルアドレナリンにより誘発された血圧上昇および心拍数の変化に対しては、ジチアノン投与の影響は認められなかった。
- (5) 瞬膜収縮：電気刺激に対応する瞬膜収縮は、ジチアノン投与により影響を受けなかった。

以上の結果より、ジチアノンは血圧降下を認めたが、心拍数、瞬膜収縮、ノルアドレナリン誘発性の血圧、心拍数変化には影響しなかった。

1-12-5 消化器系に対する作用

1-12-5-1 幽門結紮ラットの胃液分泌に及ぼす影響

供試動物：COBS Wistar 系ラット、雄(投与時体重 164~212g)、1群 10匹

方法：検体を 0.5%CMC に懸濁して経口投与した。

ラットの幽門部を結紮した後 30、100 及び 300mg/kg を経口投与し、6 時間後にラットを屠殺して胃を摘出した。胃内容物の容量、 H^+ 、 Na^+ 、 K^+ 及び Cl^- の各イオン濃度を測定した。さらに、胃を切開し、腺胃損傷について肉眼的に観察した。

結果：

群	用量 (mg/kg)	胃内容物容量 (ml)	平均イオン濃度 mEq/vol				胃障害性スコア ^a
			Na^+	K^+	Cl^-	H^+	
0.5%CMC	—	17.8	0.86	0.12	2.51	1.53	3.6
ジチアノン	30	15.2 \downarrow	0.77	0.13	2.06 \downarrow	1.09 \downarrow	3.6
ジチアノン	100	13.4 \downarrow	0.73	0.11	1.83 \downarrow	1.06 \downarrow	3.0
ジチアノン	300	13.4 \downarrow	0.69	0.10	1.79 \downarrow	1.05	3.7

統計学的方法：分散分析法 \downarrow ; $p \leq 0.05$ $\downarrow\downarrow$; $p \leq 0.01$

^a : 0=正常 1=軽度充血 2=高度充血 3=出血 4=小さな潰瘍(<1mm) 5=大きな潰瘍(>1mm)

ジチアノンは胃液量を減少させ、それに伴い Cl^- 及び H^+ 濃度を有意に低下させた。胃液中の Na^+ 及び K^+ 濃度も僅かに低下したが、統計的に有意でなかった。これらの低下には用量関連性があった。イオン濃度に及ぼす影響は胃液量に左右されていると考えられる。

胃損傷に及ぼす影響はなかった。

1-12-5-2 マウスにおける炭末輸送による腸管運動に及ぼす影響

供試動物：CD-1 マウス(20~24g)、1群雄 10匹

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

方 法 : 300 mg/10mL の 0.5%CMC 懸濁液を調製し、連続希釈して所定の用量となるようにした。30、100 及び 300mg/kg を経口投与した。投与 30 分後に蒸留水に懸濁した炭末 (5% w/v) の 0.25mL を経口投与した。正確に炭末投与 30 分後に屠殺し、胃腸管のすべてを摘出し、幽門括約筋から盲腸方向に移動した炭末の距離を測定し、腸管全長に対する百分率として表した。

結 果 : 炭末の移動率を次表に示した。

群	用量 (mg/kg)	腸管全長に対する炭末移動率%の平均	対照群に対する%変化
溶媒 (0.5%CMC)	—	49.7	—
ジチアノン	30	60.8†	122.3
ジチアノン	100	58.0†	116.7
ジチアノン	300	52.8	106.2

統計学的方法 : 分散分析法 $†† : p \leq 0.05$

30mg/kg 群で対照群に比較して 22%の炭末移動距離の増加が認められ、統計学的に有意であった。100mg/kg および 300mg/kg 群でも炭末移動距離の増加が認められたが、30mg/kg 群より移動距離は短く、有意差は認められなかった。

1-12-6 泌尿器系に対する作用

1-12-6-1 ラットの尿量および尿中電解質排泄に対する作用

供試動物 : COBS Wistar 系ラット、雄 (9 週齢、体重 148~176g) 1 群 10 匹

方 法 : 検体を 0.5% CMC に懸濁して、容量 5mL/kg を 1、3 および 10mg/kg の容量で強制経口投与した。投与後、直ちに、各ラットに生理食塩水 25mL/kg を強制経口投与し、検体投与後 1、2、3、4、5 および 24 時間に排尿量を記録した。投与後 5 時間に採取した尿の Na⁺、K⁺、Cl⁻ および蛋白を測定した。

結 果 : ラットの尿量に及ぼすジチアノン経口投与の影響

群	投与物質	投与量 (mg/kg 経口)	投与後の経時的累積尿量 (h=時間、mL)					
			0-1h	0-2h	0-3h	0-4h	0-5h	0-24h
1	溶媒	—	0.89	2.01	2.71	3.28	3.63	6.40
2	ジチアノン	10	0.61	1.79	2.31	2.90	3.24	6.14
3	ジチアノン	3	1.15	2.04	2.76	3.32	3.75	6.63
4	ジチアノン	1	0.95	1.88	3.04	3.57	3.94	6.75

投与後 5 時間尿中の蛋白および電解質の含有量に及ぼすジチアノン経口投与の影響

群	投与物質	投与量 (mg/kg 経口)	尿蛋白含有量 (mg/dl)	尿中の平均電解質濃度 (mEq/vol)		
				Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
1	溶媒	—	36.6	0.46	0.20	0.44
2	ジチアノン	10	46.9†	0.41	0.18	0.41
3	ジチアノン	3	32.7	0.42	0.24	0.43
4	ジチアノン	1	33.7	0.43	0.25†	0.44

統計学的方法 : 一元配置分散分析 $†† : p \leq 0.05$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

ジチアノンの投与による尿量並びに尿中の Na⁺及び Cl⁻濃度にも変化がなかった。1.0 mg/kg 群のラットで K⁺排泄の有意な増加が認められたが、増加はわずかであり、10mg/kg 群で認められなかったことから、生物学的に意味のあるものとは考えられなかった。10 mg/kg 投与群のラットの尿中の蛋白含有量は著明かつ有意に増加した。

1-12-7 血液に対する作用

1-12-7-1 ラットの血液凝固に及ぼす影響

供試動物：Wistar 系ラット、雄(約9週齢、投与時体重 190~220g)、1群 10匹

方法：検体を 0.5%CMC に懸濁し、30、100 および 300mg/kg を経口投与した。

投与 60 分後にラット尾部より採血し、全血凝固時間を測定した。さらに、眼窩静脈叢から採血してプロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間を測定した。

結果：プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間及び全血凝固時間の群平均値を次表に示す。

群	用量 (mg/kg)	プロトロンビン時間 (秒)	活性化部分トロンボ プラスチン時間(秒)	全血凝固時間 (秒)
0.5%CMC	—	11.2	18.6	77
ジチアノン	30	10.9↓	18.7	75
ジチアノン	100	11.1	19.9	73
ジチアノン	300	10.6↓	18.9	73

統計学的方法：分散分析法 ↓：p≤0.05 ↓↓：p≤0.01

いずれの用量でも活性化部分トロンボプラスチン時間及び全血凝固時間に著明な影響はみられなかった。

しかし、30 及び 300 mg/kg でプロトロンビン時間に、わずかではあるが統計学的に有意な短縮がみられたが、その程度は非常に軽度であったので、生物学的に意義があるとは考えられない。

1-12-7-2 *in vitro* ヒト血液に及ぼす溶血作用

供試血液：ヒト血液の赤血球分画

方法：4名のボランティアより採血した血液を遠沈して赤血球分画をとり、等張生理食塩水に懸濁して3%血球懸濁液とした。

検体を等張生理食塩水に溶解し、1.33、0.40、0.133 および 0.04mg/mL の濃度を調製した。等張生理食塩水 3ml と 3%血球懸濁液 1ml を十分混合して、37°Cで2時間インキュベートした後、遠沈して分光光度計で吸光度を測定し、溶血率を算出した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

結 果：ジチアノン添加時の溶血率(%)を次表に示す。

ヒト No.	ジチアノン濃度 (mg/mL)			
	1.0	0.3	0.1	0.03
1	3.5	1.2	0	0
2	4.3	1.6	0	0
3	3.7	1.1	0	0
4	8.9	3.7	0	0
平均	5.1	1.9	0	0

$$\text{溶血率(\%)} = \frac{\text{試料の吸光度} - \text{陰性対照の吸光度}^{(1)}}{\text{陽性対照の吸光度}^{(2)} - \text{陰性対照の吸光度}} \times 100$$

(1) 赤血球懸濁液 1ml + 蒸留水 3ml

(2) 赤血球懸濁液 1ml + 等張生理食塩水 3ml

ジチアノンは 0.3mg/mL 異常の濃度で極軽度の溶血作用が認められたが、0.1mg/mL 以下の濃度では認められなかった。

なお、無毒性量(慢性毒性/発癌性試験における 1mg/kg)の 10 倍量である 10mg/kg を単回投与した血中動態試験における最高血中濃度は 0.992 μ g/g 血液であることから、溶血の見られない濃度と最高血中濃度の比(100 μ g/mL 生理食塩液 : 0.992 μ g/g 血液)は約 101 であることから、この溶血作用は生物学的に意義はないものと申請者は判断する。

「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

試験項目 (試験動物)	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
中枢神経系に及ぼす影響						
一般状態 [Irwin 法] (ラット)	2 回経口投与 (0.5%CMC) (2 回目は 24 時 間後)	30 100 300	雄 4		<30	1 回投与 30 分後より、無関心、 下痢、異常歩行、呼吸促迫、異常 姿勢、カクブシ等がみられ、2 回 目投与後はより増悪し、用量 依存性がより明確になった。 300mg 投与群では 2 回目投与後 28 時間以内に全例死亡した。 生存動物では 7 日目までに回 復した。
ヘキソバルビタール 麻酔に対す る作用 (マウス)	連続 5 日間 経口投与後 (0.5%CMC)、 ヘキソバルビタール 100mg/kg 腹腔 内投与	10 30 100	雄 6	—	100	異常はみられなかった。
運動・知覚神経系に及ぼす影響						
筋弛緩作用 (ラット) [傾斜板法]	2 日間反復経口 投与 (0.5%CMC)	10 30 100	雌雄各 5	—	100	10mg/kg 群のみ平衡を失う傾斜 角度が有意に緩くなったが、 高用量では影響なし。
運動協調性 (マウス) [回転棒法]	経口投与 (0.5%CMC)	30 100 300	雌 10	—	300	30mg/kg 群のみ回転棒上の運動 時間が有意に減少したが、高 用量では影響なし。
呼吸・循環系に及ぼす影響						
(麻酔イヌ)	120 分間隔で 十二指腸内に 順次増量投与 (0.5%CMC)	30 100 300	雄 1 雌 2	—	300	血圧、心拍数、心電図、呼吸、大 腿部血流量、末梢血管抵抗にい ずれも影響なし。 認められた変動は長時間観察 による生体の変化と判断され る。
自律神経系に及ぼす影響						
(麻酔ネコ)	120 分間隔で 十二指腸内に 順次増量投与 (0.5%CMC)	30 100 300	雌 3	30	—	血圧降下が 30mg/kg 以上でみ られたが、心拍数、瞳孔収縮、 β アドレナリン誘発性の血圧・心拍数 の変化には影響なし。全例に同 側総頸動脈閉塞による血圧上 昇は換体の初回投与で低下し た。1 例では続く 100mg/kg の 投与でさらに低下し、死亡し た。
消化系に及ぼす影響						
胃液分泌 (ラット) [幽門結紮]	経口投与 (0.5%CMC)	30 100 300	雄 10	30	—	30mg/kg 以上で用量関連性のある 胃液量が低下し、これに伴い 電解質の濃度が低下したが、膵 胃液量は少ない。
腸管運動 (マウス) [炭末輸送能]	経口投与 (0.5%CMC)	30 100 300	雄 10	30	—	30mg/kg で炭末輸送能が有意に 増加した。100 及び 300mg/kg では対照より増加したが、 30mg/kg より短かった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

試験項目 (試験動物)	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
泌尿器系に及ぼす影響						
(ラット)	経口投与 (0.5%CMC)	1 3 10	雄 10	10	3	尿量及び尿中電解質に影響はない。 10mg 投与で尿中蛋白が有意に増加した。
血液に対する作用に及ぼす影響						
血液凝固 (ラット)	経口投与 (0.5%CMC)	30 100 300	雄 10	—	300	30, 300mg/kg でプロトロン時間の非常に軽度の短縮が見られたが、生物学的に意義があるとは考えられない。活性化部分トロンボプラスチン時間、全血凝固時間に影響なし。
溶血 (ヒト赤血球)	<i>in vitro</i> 換体生理食塩液+赤血球 3% 生理食塩液の 混液	0.03 0.1 0.3 1.0 (g/L)	4	0.3 (g/L)	0.1 (g/L)	溶血作用は極めて弱く、生物学的意義はない。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

1-13 その他の試験

1-13-1 ラットにおける肝薬物代謝酵素誘導試験

(資料 No. 33)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成: 1993 年

検体の純度:

試験動物: Sprague Dawley CrI: CD BR 系ラット 1 群雌雄各 6 匹 (入手時約 35 日齢)

試験期間: 28 日 (1993 年 7 月 14 日~8 月 12 日)

方法: 検体を 0、600ppm の濃度で飼料に混入して 28 日間、ラットに自由摂取させた。混餌は毎週調製した。

陽性対照群にはフェノバルビタール・ナトリウム (PB) 500ppm 混入飼料を 28 日間投与した。

投与量設定根拠: ラットを用いた 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験において、検体の 600ppm 投与群で肝の病理組織学的変性を伴わない相対重量の増加が認められたので、600ppm は肝薬物代謝酵素誘導試験に適した投与量と判断した。

試験項目及び結果:

一般状態及び死亡率: 一般状態及び生死を毎日観察した。

検体投与群、陽性対照群とも投与に起因すると考えられる変化はみられなかった。

いずれの群にも死亡は認められなかった。

体重変化: 投与前 3 日より、週 2 回測定した。

検体投与群雄では、試験期間を通じて対照群と同等であった。雌では試験期間中、一貫して対照群より 15~20% 低く、投与 24 日目を除きその差は統計学的に有意であった。

一方、陽性対照群雄では、投与 3 及び 7 日目の体重が対照群より有意に高かったが、一貫性はなく、投与の影響とは考えられない。雌では、対照群と同等であった。

摂餌量: 体重と同じ間隔で測定した。

検体投与による影響はなかった。

陽性対照群では対照群と比べ、投与 3~7 日に統計学的有意な増加 (対照に比し 107%、 $p \leq 0.05$) が雌に認められたのみであり、その差もわずかであることから投与の影響ではないと考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

検体摂取量：体重、摂取量及び実投与濃度より算出した 1 日当りの平均検体摂取量 (mg/kg/日) は、下表のとおりである。

群	雄	雌
検体 600ppm	58.7	61.1
PB 500ppm	44	49.7

肝臓重量：投与終了後、各群の全例 (6 例) を対象として、剖検後肝重量を測定した。

検体投与群の雄は肝臓の重量及びその対体重比が対照群に比し統計学的に有意に高かった。雌では有意差は認められなかった。

陽性対照群の雄は肝臓の重量及びその対体重比とも有意に高かったが、雌では対体重比のみ有意に高かった。

群	雄			雌		
	体重	重量	対体重比	体重	重量	対体重比
検体 600ppm		131 [↑]	128 [↑]	91 [↓]	97	108
PB 500ppm		122 [↑]	119 [↑]		114	117 [↑]

統計学的方法：F₂-2 標本の両側 t-検定 [↑]：p≤0.05 [↓]：p≤0.01

生化学的検査：病理組織標本用に各動物の肝小葉の一部を切除し、残りの肝組織は均質化して、蛋白含量及び DNA 含量を測定した。又、ミクロソーム画分を調製し、その蛋白含量、チトクローム P-450 量及び 3 種の P-450 依存混合機能酸化酵素活性を調べた。

	検体 600ppm		PB 500ppm	
	雄	雌	雄	雌
全肝総蛋白の蛋白含量 (mg/g 肝)	—	—	146 [↑]	—
DNA 含量 (mg/g 肝)	—	—	—	—
ミクロソーム画分の蛋白含量 (mg/g 肝)	—	—	108 [↑]	—
P-450 量	—	—	246 [○]	175 [○]
3 種の P-450 依存混合機能酸化酵素				
7-エトキシソルフィン O-脱メチル化酵素	—	—	343 [○]	382 [○]
7-ペントキシソルフィン O-脱ペンチル化酵素	—	65 [↓]	4471 [○]	1186
エリスロマイシン N-脱メチル化酵素	75 [↓]	—	427 [○]	345 [○]

統計学的方法：プール 2 標本の両側 t-検定又は 2 標本の両側 t-検定

[↑]：p≤0.05 [↓]：p≤0.01 [○]：p≤0.001

表中の数値は変動の目安として対照群に対する変動率 (%) を示す。

検体投与群では、雄で P-450 依存混合機能酸化酵素の 1 種であるエリスロマイシン N-脱メチル化酵素活性が低下し、同雌で 7-ペントキシソルフィン O-脱ペンチル化酵素活性が低下した以外、対照群との有意な差はなかった。みられた変化は統計学的には有意であったが、量的にはわずかであり、毒性学的意味はないと思われる。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

これに対し、陽性対照は雌雄とも P-450 量及び P-450 依存混合機能酸化酵素のいずれも有意な活性亢進が認められ、さらに雄では蛋白含量の増加も認められ、明らかに肝薬物代謝酵素活性の誘導を認めた。

病理組織学的検査：各動物の肝小葉の一部を切除して病理組織標本を作成した。各群 2 例については電顕用標本も作成したが電顕観察はしなかった。

検体投与群では、肝小葉中心性肝細胞肥大が雄の全例(軽度)に認められたが、雌では認められなかった。炎症細胞巣は対照群と同等の発生であり、検体投与の影響とは考えられない。

陽性対照群では、雌雄とも肝小葉中心性肝細胞肥大が認められた。その程度は検体投与群雄よりも重度であった。

肝の病理組織学的検査所見 (検査動物数各群雌雄各 6 例)

肝臓の所見	雄			雌		
	対照群	検体 600ppm	PB 500ppm	対照群	検体 600ppm	PB 500ppm
小葉中心性肥大(軽度)	0	6 ↑	0	0	0	2
小葉中心性肥大(中等度)	0	0	0	0	0	3 ↑
小葉中心性肥大(重度)	0	0	6 ↑	0	0	0
炎症細胞巣	3	3	1	3	4	1

統計学的方法：Fischer の直接確率法又は Mann-Whitney の片側 U-検定] ↑：p ≤ 0.01

以上の結果から、検体 600ppm を 28 日間、ラットに混餌投与した場合、検体は肝重量の増加(雄)、体重の低下(雌)などの全身性の毒性作用を有するが肝薬物代謝酵素誘導作用を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 BASF ジャパン株式会社にある。

1-13-2 腎毒性に及ぼす短期投与(7日)の影響

(資料 34)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1991 年

試験目的: ラットを用いた慢性毒性/発がん性併合試験(資料 14)において、ジチアノンの主要な標的臓器は腎臓で、雄では自然発生の慢性進行性腎症の悪化、雌では腎腫瘍が認められた。ジチアノンの腎臓毒性と腫瘍生成の関連に付いて明らかにすること。

検体純度:

試験動物: Sprague Dawley CrI: CD(SD) BR 系ラット 1 群雌雄各 5 匹

試験開始時体重: 雄 110.3~139.3g、雌 135.6~164.6g

投与期間: 7 日(1991 年 4 月 22 日~4 月 29 日)

方法: 検体を 0、120、600 及び 1080ppm の濃度で飼料に混入して給餌し、投与 48 時間、96 時間又は 7 日後に屠殺した。混餌は 1 回のみ調製した。

投与量設定根拠: ラットを用いた 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験において、600ppm で慢性進行性腎症あるいは腎腫瘍が認められたので、高用量は 3 ヶ月反復投与試験と同じ 1080ppm とし、低用量は併合試験と同じ 600 及び 120ppm を用いた。

試験項目及び結果:

一般状態及び死亡率: 一般状態及び生死を毎日観察した。

投与期間中、一般症状に異常は認められなかった。

体重: 投与開始時及び屠殺時に測定した。

統計学的有意差の認められた最終体重の対照群に対する比率%を次表に示す。

群 (ppm)	48 時間後屠殺	96 時間後屠殺	7 日後屠殺
雄	120		
	600		
	1080	89↓	88↓
雌	120		
	600		
	1080	97	96

統計学的方法: Student t-検定 ↓: $p \leq 0.05$ 矢印のない数値は有意差なし。

いずれの時期の屠殺とも、1080ppm 群の雄では体重の有意な抑制がみられた。雌では僅かに抑制されたのみであった。

摂餌量: 投与期間中の摂餌量をケージごとに測定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

1080ppm 群の雌雄とも有意ではないが、雄では 48 及び 96 時間後屠殺で摂餌量の軽度減少(対照群の 91%又は 87%)が、雌では 3 日後以降軽度の減少(対照群の 93%)がみられた。

肉眼的検査：肉眼的外表異常及び内蔵異常について検査した。

腎臓の肉眼的病変(検査動物 5 例中の発生数)を次表に示す。

群(ppm)		48 時間後屠殺	96 時間後屠殺	7 日後屠殺
		退色	退色	退色
雄	0			
	120			
	600		1	
	1080		2	3
雌	0			
	120		1	
	600		1	
	1080		3	

腎臓の退色が表のように認められた。この他に、副腎の暗調化、小型あるいは腫大、尿の退色が対照群を除く投与群で散見された。又、肺出血が雌雄の多数例に見られたが、原因は不明であった。

臓器重量：腎臓の重量を測定した。

腎臓の対体重比にいずれの屠殺時期とも増加が認められた。

群(ppm)		48 時間後屠殺	96 時間後屠殺	7 日後屠殺
雄	120			
	600			
	1080	115†	117†	126†
雌	120			
	600			
	1080	110	127	129

統計学的方法：Student t-検定 †; p ≤ 0.05 矢印のない数値は有意差なし。

組織学的検査：腎臓、副腎及び肉眼的異常のみられた全ての臓器について、標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色して検査した。

右腎皮質の電顕用切片を作製し、対照群と 1080ppm 群について検査した。しかし、48 時間屠殺群の対照群と 1080ppm 群の標本は、質が悪く評価に使用できなかった。

腎臓の組織学的所見を次表に示す。

600 及び 1080ppm 群の雌雄で、近位尿細管細胞に水腫性変性が投与 96 時間及び 7 日後にみられ、発生頻度と程度に用量依存性があった。これは雄より雌で増悪していた。投与 48 時間後では、雌雄とも組織学的にこの病変は認められなかった。

内腔が小さく、又刷子縁が浅い立方状細胞からなる好塩基性尿細管の病変が、投与7日後に600及び1080ppm群の雌雄で認められた。これは尿細管の再生で、水腫性変性を通して近位尿細管細胞の広範に及ぶ消失を反映していると思われる。雌では新しく再生した尿細管上皮にも水腫性変性巣がみられ、検体の傷害に対し、これらの細胞が持続的に感受性であることを示していた。雄では新たに再生した尿細管上皮に水腫性変化は認められなかった。

尿細管拡張、好塩基性尿細管、間質細胞浸潤は対照群及び120ppm群でも認められ、雌雄に通常見られる自然発生の慢性進行性腎症の初期段階であると考えられた。

性別	屠殺時期 (投与後)	群(ppm)	尿細管拡張	水腫性変性	間質細胞浸潤	好塩基性尿細管	
						少数	数個
雄	48時間	0			1		
		120	2		1	2	
		600	1				
		1080	1				
	96時間	0					
		120					
		600		1		1	
		1080		3		2	
	7日後	0					1
		120					1
		600		2		1	1
		1080		1		1	2
雌	48時間	0	1			2	
		120	1				
		600			2	1	
		1080			1	2	
	96時間	0					2
		120				1	1
		600		3			1
		1080		4			
	7日後	0					1
		120					
		600		4			
		1080		4			

電顕で、標的細胞における主要な小器官はミトコンドリアであった。ミトコンドリアの傷害には用量及び性依存性がみられ、1080ppm群雌で最も強く、通常の大きさの約3倍に腫大し、稜が見られなかった。電顕所見の程度と発生頻度は光学顕微鏡の観察所見とほぼ同じであり、腎臓におけるジチアノンの毒作用に対し、感受性におけるラットの性差を確認できた。しかし、120ppm群で光学顕微鏡では雌雄に何ら病変は認められなかったが、電顕で、48時間投与した雌でのみ水腫性変性を示唆する限局性変化がみられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

結論として、600 あるいは 1080ppm の濃度で 96 時間又は 7 日間投与した結果、腎臓の近位尿細管に水腫性変性を生じた。腎臓の傷害は、120ppm 群の全ての検査時期、あるいは 600 及び 1080ppm 群の投与 48 時間後では雌雄とも観察されなかった。観察された腎病変は雄よりも雌でより重篤で、7 日間の投与期間内に、再生性反応を生じた。雌では、再生した細胞に傷害があり、再生細胞も持続的に感受性を示し、尿細管上皮細胞の持続的回転を誘発している。これに対し、雄では再生細胞は明らかに耐性を示していた。超微細構造レベルで、腎尿細管細胞のミトコンドリアが毒作用の主要な標的であった。

電顕所見の程度と発生頻度は光学顕微鏡の観察所見とほぼ同じであり、ジチアノンの毒作用に対し、SD ラット雌雄の感受性における性差を確認できた。

腎臓において、変性続く持続的尿細管の再生は非遺伝毒性物質による腫瘍発生の特徴である。したがって、ジチアノンの慢性曝露による持続的尿細管傷害とその後の細胞の再生は雌ラットにおける腎腫瘍の発生の誘因であり、非遺伝毒性物質による腫瘍発生の機序と類似の機序による催腫瘍性と判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

1-13-3 腎臓細胞の回転に関する試験

(資料 35)

試験機関：

報告書作成年：1993 年

[GLP 対応]

試験目的：ラットを用いた慢性毒性/発がん性併合試験(資料 15)において、ジチアノンの主要な標的臓器は腎臓で、雄では自然発生の慢性進行性腎症の悪化、雌では腎嚢瘍がみられた。ジチアノンを 28 日間投与して雌における腎毒性を明らかにするために行った。

検体純度：

試験動物：Sprague Dawley CrI：CD(SD) BR 系ラット 1 群雌各 5 匹(5 匹/ケージ)

試験開始時体重：雌 141.4~188.2g

投与期間：28 日(1991 年 3 月 5 日~4 月 2 日)

方法： 検体を 0、20、120 及び 600 ppm の濃度で飼料に混入して 7、14 又は 28 日間給餌した。混餌は週 1 回調製した。

屠殺 7 日前に皮下に浸透圧ミニポンプを埋入し、プロモデオキシウリジン(BrdU)を 1 週間持続投与した。

投与量設定根拠：ラットを用いた 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験における用量と同じにした。

試験項目及び結果：

一般状態及び死亡率：一般状態及び生死を毎日観察した。

投与期間中、一般症状に異常は認められなかった。

体重： 投与開始時及び各屠殺時に測定した。

体重に投与の影響はなかった。

摂餌量：投与期間中の摂餌量をケージごとに測定した。

摂餌量に投与の影響はなかった。

肉眼的検査：肉眼的外表異常及び内臓異常について検査した。

表(各 5 例中の発生頻度)のように腎臓の退色が認められたのみであった。

所見	群(ppm)	投与 7 日後	投与 14 日後	投与 28 日後
退色	0			
	20	1		
	120		1a	1
	600	3	1	1

a：浸透圧ポンプ埋入前の過麻酔により 1 例が死亡したので 4 例当り。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

臓器重量：腎臓重量と同時に体重を測定した。

600ppm 群で腎臓重量は増加傾向にあり、対体重比は有意に増加した。

屠殺時期	群 (ppm)	腎臓重量		対体重比	
		右	左	右	左
投与 7 日後	20				
	120				
	600	114	117	111	113†
投与 14 日後	20				
	120				
	600	123	119	129†	125†
投与 28 日後	20				
	120				
	600	107	109	111†	113†

統計学的方法: Student t-検定 †: $p \leq 0.05$ 矢印のない数値は有意差なし。

組織学的検査：腎臓及び肉眼的異常のみられた全ての臓器について、標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色して検査した。

腎臓の組織学的所見(各 5 例当り)及び BrdU 標識数を次表に示す。

所見	投与 7 日後				投与 14 日後				投与 28 日後			
	0	20	120	600	0	20	120a	600	0	20	120	600
水腫性変性計				4			1	3				2
軽微				2				2				1
軽度				1			1	1				
中度				1								1
再生尿細管計	3	2	3	5	1	4	3	4	4	1	2	4
軽微	1	1	2		1	2	2	3	4	1	1	1
軽度	1	1		1		1	1				1	1
中度	1		1	3		1		1				2
高度				1								
間質細胞浸潤	1		1			1	2	1	1			1
嚢胞						1						
尿細管拡張				1					1	1		1
石灰沈着(限局性)	3	2		1		1						
線維症						1			1			
BrdU 標識数 b	29.8	28.2	34.8	75.5†	35.1	24.6	38.5	38.9	14.8	16.5	17.2	35.5†

a: 浸透圧ポンプ導入前の過麻酔により 1 例が死亡したので 4 例当り。

b: 10 視野の平均値

統計学的方法 (BrdU 標識数): Student t-検定 †: $p \leq 0.05$ 矢印のない数値は有意差なし。

主要な病変は水腫性変性で、600ppm 群でのみ全ての 3 検査時期に認めら、水腫性細胞は正常細胞の大きさの約 2~3 倍に腫大し、僅かな好酸性物質及び濃縮核を含む不規則な腔からなっていた。これらの傷害細胞は 3 ないし 6 細胞の房状に見え、近位尿細管の分節 P2 に見られた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

尿細管の再生は対照群を含め全群の動物に現れた。これは、600ppm 群では相当顕著で、特に 7 日後の屠殺動物で、重度の傷害によってもたらされた細胞の消失に反応して再生が起こっていたことを示唆していた。

対照群、20 及び 120ppm 群では、尿細管の再生は顕著ではなく、大部分の動物で極少数の孤立巣に限られていた。これらの群で観察された尿細管の再生は、恐らくラットの慢性腎症のためであり、投与に関連がないと考えられた。

全ての 3 検査時期で、600ppm 群で標識された尿細管の細胞数に増加がみられた。最も著しい変化は組織学的所見と一致する投与 7 日後に見られた。0ppm(対照群)及び 120ppm 群にみられた 14 日後の高い結果は、ラットの慢性腎症と一致しており、背景所見と考えられる。

結論として、600ppm を 28 日間投与した結果、水腫性変性が近位尿細管に生じ、これが再生性反応の誘因であった。腎尿細管細胞の持続的消失のために、尿細管上皮細胞の持続的回転が誘発された。この結果は BrdU 標識細胞で確認された。腎臓において、変性に続く持続的尿細管の再生は非遺伝毒性物質による腫瘍発生の特徴である。したがって、ジチアノンの慢性曝露による持続的尿細管傷害とその後の細胞の再生は雄ラットにおける腎腫瘍の発生の誘因であり、非遺伝毒性物質による腫瘍発生の機序と類似の機序による催腫瘍性と判断される。病理組織学的に、投与依存性の腎傷害は 120ppm 以下の用量で認められなかった。

1-13-4 ラットの腎臓細胞における *in vivo* コメットアッセイ

(資料 追15)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2009 年

試験の目的： ラットを用いた慢性毒性発がん性併合試験(資料 14)において雌の腎臓の腫瘍発生率が増加した。この腫瘍発生について、ジチアノンの遺伝毒性の関与を *in vivo* コメットアッセイ法を用いて独立した4実験を実施し、検討した。

検体の純度：

供試動物： Wistar Han系ラット(Crl:WI(Han))、1群雌雄各5匹、開始時週齢：8-11週齢
開始時平均体重：実験1(210g)、実験2(198g)、実験3(215g)、実験4(209g)

方法： 検体は0.5%カルボキシメチルセルロース(CMC)に懸濁して単回強制経口投与した。陰性対照には溶媒(0.5%CMC)を経口投与した。陽性対照として実験1,2および3ではStreptozotocin(STZ)を単回尾静脈内投与し、実験4ではethylmethanesulfonate(EMS)を単回経口投与し、またCox-2阻害剤のparecoxibを2回尾静脈内投与、またはIndomethacinを1回強制経口投与した。
経口投与の投与容量は10mL/kg、静脈内投与の投与容量は2mL/kgとした。
試験設計の概要を以下の表に示す。

実験	投与薬物	用量 (mg/kg)	投与 経路	屠殺時間 (h)	動物数	
					雄	雌
1	溶媒対照(0.5%CMC)	—	経口	6, 24	各5	各5
	ジチアノン	12.5		6, 24	各5	各5
		25		6, 24	各5	各5
		50		6, 24	各5	各5
	陽性対照(STZ)	10	静脈内	24	—	5
		20		6, 24	各10	各5
30		6		—	5	
2	溶媒対照(0.5%CMC)	—	経口	24	—	10
	ジチアノン	25				10
		50				10
		75				10
	陽性対照(STZ)	10	静脈内	10	10	
3	溶媒対照(0.5%CMC)	—	経口	24	—	5
	ジチアノン	25				5
		50				5
		75				5
	陽性対照(STZ)	10	静脈内	5	5	

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

実験	投与薬物			Cox-2 阻害剤				屠殺時間 (h)	動物数
	名称	用量 (mg/kg)	経路	名称	用量 (mg/kg)	経路	投与時間*		
4	溶媒対照 (0.5%CMC)	-	経口	-	-	-	-	24	雌 5
	ジチアノン	75		-	-	-	-		雌 10
	溶媒対照 (0.5%CMC)	-	経口	Parecoxib	50	静脈内	-2, 6 hr	24	雌 5
	ジチアノン	75			5				雌 5
					20				雌 5
					50				雌 5
	溶媒対照 (0.5%CMC)	-	経口	Indomethacin	3	経口	-2, 2, 18hr	24	雌 5
ジチアノン	75	雌 5							
陽性対照 (EMS)	150	経口	-	-	-	-	4	雌 5	

投与前に絶食はしなかった。投与 6 時間後に屠殺する群では屠殺 2 時間前に、24 時間後に屠殺する群では 6 時間前に給餌をやめた。

用量設定： ラットの急性経口毒性試験において、半経口致死量 (LD₅₀) は約 300mg/kg であった。50mg/kg では明瞭な毒性徴候が認められたが、死亡はなく、この用量を実験 1 の投与量の最高用量として、以下 12.5 および 25mg/kg を選択した。実験 2 および 3 では高用量を 75mg/kg とし、50 及び 25mg/kg を選定した。実験 4 では実験 2 で明瞭な陽性を示した 75mg/kg を選択した。

試験項目

1) コメットアッセイ： 実験 1、2 および 4 について実施した。

細胞の調製： 動物に Narcoren (100mg/kg) を腹腔内投与して麻酔し、還流液 (0.5mM EGTA, 10mM HEPES) で腎臓を還流し、続いて腹部大動脈をコラゲナーゼ還流液 I で還流した。腎臓を取り出してコラーゲン入り還流液 II 中で細切し、37°C で 15 分消化した。細胞の懸濁液を 100 μm 細胞濾過器で濾過し、10% 仔牛血清 (FCS) 入り HBSS 液で酵素反応と止めた。遠心 (4°C, 10 分) 後、上清を捨てて細胞のペレットを 10% FCS 入り HBSS 液に再懸濁し、懸濁液は 100 μm 濾過器で 2 度濾過した。

生存細胞の確認： 懸濁液 100 μL をトリパンブルー (100 μL) で染色し、細胞を計測して生存細胞の割合を計算した。

$$\text{生存細胞率 (\%)} = \frac{\text{生存細胞}}{\text{生存} + \text{死亡細胞}} \times 100$$

生存細胞； 無染色

死亡細胞； 明青色

単細胞電気泳動； Tice ら および Singh ら、の方法によりアルカリ条件下 (pH13) でコメットアッセイを実施した。

10 μ L の単細胞懸濁液 (スライド当り 2.5×10^4 個の生存細胞) 90 μ L の溶かしたアガロースと混合し、コーティングしたスライド上に層にした (動物当り 6-8 枚)。水上で固化させ、暗条件下、4°C で Lysis 溶液 (pH10) に 1 時間保持し、暗所に保管した。電気泳動緩衝液 (> pH 13) で 20 分覆い、DNA を解き、30 分環電気泳動にかけた (25V ; 300mA ; 0.85V/cm)。スライドは中性緩衝液に 10 分間移し、エタノールに 1 分間暴露させた後風乾した。

評価； 臭化エチジウムで染色したスライド上の DNA を蛍光顕微鏡で評価した。イメージ分析システムを付属した CCD を用い、動物当り 2 枚のスライドで各 50 のイメージを調べた。また、細胞生存率とともに形態学的観察から細胞毒性についても調べた。

試験の妥当性； 以下の基準を満たした場合、試験は成立すると判断した。

- ・ 細胞生存率が >70% である。
- ・ 動物あたり 100 のイメージを調べられるスライドがある。
- ・ 陽性対照の平均の尾の DNA 相対輝度 (%) が明らかに対照より高い。(現在の背景データ； 雄 22.71-40.95% (n=6)、雌 25.32-55.29% (n=5))
- ・ 溶媒対照群の Hedgehog 数が平均で 20% を超えない。

評価の基準； 文献を参考に以下の基準を用いて評価した。

以下の 2 基準を満たす場合、陽性とみなす。

- ・ 1 群の平均の尾の DNA 相対輝度 (%) が同時実施溶媒対照群および背景データから明らかに逸脱している。(現在の背景データ； 雄 1.99-8.84% (n=10)、雌 4.66-14.28% (n=11))
- ・ 平均の尾の DNA 相対輝度 (%) の用量関連性のある増加。

以下の基準を満たす場合、陰性とみなす。

- ・ 全群で平均の尾の DNA 相対輝度 (%) が同時実施対照群および背景データと同等である場合。

2) 腎臓の組織病理学的検査；

- ・ 浸漬固定； 実験 2 の全例および実験 4 の各群 5 匹について、右の腎臓をホルマリン中性緩衝液に 24-48 時間浸漬固定した後エタノールへ移した。薄切標本を作製し、ヘマトキシリン-エオジンで染色して光学顕微鏡により病理組織学的検査を実施した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

- ・還流固定： 実験 3 の各群 5 匹について還流固定後腎臓を取り出し、薄切標本を作製し、ヘマトキシリン-エオジンで染色して光学顕微鏡により病理組織学的検査を実施した。また、構造を詳細にみるため OSOM 域から 3 箇所を電子顕微鏡検査用に標本を作製し、AmbF 染色した。対照群および 25mg/kg 群を電子顕微鏡で詳細に検査した。

3) 酸化ストレスの確認： 実験 2 で得られた腎細胞から DNA を抽出し、ELISA により 8-ヒドロキシデオキシグアノシンを測定して酸化ストレスを調べた。

結 果：

1) コメットアッセイ： 結果を以下の表 1~3 に示す。

表 1. 実験 1

性別	採取時間 (hr)	群 (mg/kg)	動物数	観察細胞数 (合計)	平均 Hedgehog 細胞数	群平均 尾の DNA 相対輝度 (%) *		細胞生存率	
						平均	SD	平均(±SD)	対対照 (%)
雄	6	溶媒対照 0.5%CMC	5	500	11	5.8	2.6	73.9(4.4)	100
		ジフェノン (12.5)	5	500	8	6.3	2.3	75.8(5.7)	103
		ジフェノン (25)	5	500	8	7.1	0.9	78.7(3.4)	107
		ジフェノン (50)	5	500	14	7.2	1.8	77.1(5.0)	104
		陽性対照 I STZ (20)	5	500	8	7.7	1.5	75.0(7.0)	101
		陽性対照 II STZ (20)	5	500	14	23.5	16.5	75.2(2.9)	102
	24	溶媒対照 0.5%CMC	5	500	12	8.2	2.1	77.3(4.6)	100
		ジフェノン (12.5)	5	500	9	8.2	1.5	77.4(5.5)	100
		ジフェノン (25)	5	500	8	8.9	3.3	83.4(4.6)	108
		ジフェノン (50)	5	500	10	8.5	2.4	76.1(5.4)	98
		陽性対照 I STZ (20)	5	500	12	10.9	6.8	76.1(4.4)	98
		陽性対照 II STZ (20)	5	500	23	27.3	14.9	70.6(4.7)	91
雌	6	溶媒対照 0.5%CMC	5	500	9	8.8	2.1	76.6(6.9)	100
		ジフェノン (12.5)	5	500	10	13.0	2.4	73.3(6.2)	96
		ジフェノン (25)	5	500	9	6.6	1.4	75.9(4.0)	99
		ジフェノン (50)	5	500	6	7.1	1.0	75.8(3.8)	99
		陽性対照 STZ (30)	5	500	38	34.6	12.9	83.3(2.6)	109
	24	溶媒対照 0.5%CMC	5	500	10	9.3	2.8	77.1(6.6)	100
		ジフェノン (12.5)	5	500	15	10.2	1.5	76.6(4.8)	99
		ジフェノン (25)	5	500	8	6.8	2.0	75.3(2.9)	98
		ジフェノン (50)	5	500	7	18.0	6.4	81.9(2.9)	106
		陽性対照 STZ (30)	5	500	26	28.3	5.8	88.9(7.7)	89

STZ: Streptozotocin, SD: 標準偏差, *: 細胞全体に対する尾の輝度の割合 (%)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

雌 50mg/kg 投与群で 24 時間後の群平均尾の DNA 相対輝度が増加した。雄の投与群はいずれも対照群と同等であった。用量関連性を見るため、ジチアノン 75mg/kg 群を設けて実験 2 を実施した。

表 2. 実験 2

性別	採取時間 (hr)	群 (mg/kg)	動物数	観察細胞数 (合計)	平均 Hedgehog 細胞数	群平均 尾の DNA 相対輝度 (%) *		細胞生存率	
						平均	SD	平均 (±SD)	対対照 (%)
雌	24	溶媒対照 0.5%CMC	10	1000	9	8.3	2.1	80.6(4.4)	100
		ジチアノン (25)	10	1000	9	9.4	1.8	77.8(4.7)	97
		ジチアノン (50)	10	1000	10	10.6	3.6	80.1(5.8)	99
		ジチアノン (75)	10	1000	11	12.9	4.1	76.5(5.6)	95
		陽性対照 STZ (10)	10	1000	15	18.1	9.6	76.5(4.3)	95

STZ: Streptozotocin, SD: 標準偏差, *: 細胞全体に対する尾の輝度の割合 (%)

ジチアノン 50 および 75mg/kg 投与群で用量関連性のあるわずかな増加傾向がみられたが、平均値は背景データの範囲内であり、DNA 損傷の再現性は疑わしかった。個々の変動では背景データを超える動物が 50mg/kg 群では 1 例 (16.8%)、75mg/kg 群では 3 例 (16.1、18.0 および 20.4%) であった。

文献¹⁾より、ラットの雌の腎臓には種および性特異的にシクロオキシゲナーゼ-2 (Cox-2) が多く、ジチアノンの代謝物の幾つかはこの Cox-2 の基質になる可能性が考えられる。Cox-2 が雌ラットの腎臓での腫瘍発生に関連しているかどうかを Cox-2 阻害剤である、Parecoxib および indomethacin を用いて尾の DNA 相対輝度への影響を調べた (実験 4)。実験 1 および 2 で用いた陽性対照は静脈内投与のため精度が低いことが考えられたことから、陽性対照を通常用いられる ethyl methansulfonate に変更し経口投与した。その結果を表 3 に示す。

表 3. 実験 4

性別	採取時間 (hr)	群 (mg/kg)	動物数	観察細胞数 (合計)	平均 Hedgehog 細胞数	群平均 尾の DNA 相対輝度 (%)*		細胞生存率	
						平均	SD	平均(±SD)	対対照 (%)
雌	24	溶媒対照 0.5%CMC	5	500	21 (16**)	9.3	2.3	77.9 (3.5)	100
		ジチアノン (75)	10	1000	14	11.1	2.6	77.3 (5.1)	99
		溶媒対照 0.5%CMC + Parecoxib (50)	5	500	17	7.7	1.8	76.7 (8.0)	98
		ジチアノン (75) + Parecoxib (50)	5	500	10	10.4	3.1	70.2 (9.3)	90
		ジチアノン (75) + Parecoxib (20)	5	500	14	11.0	1.7	70.1 (6.9)	90
		ジチアノン (75) + Parecoxib (5)	5	500	22	11.9	4.2	74.7 (1.9)	96
		溶媒対照 0.5%CMC + Indomethacin (3)	5	500	11	9.3	1.5	73.5 (3.5)	94
		ジチアノン (75) + Indomethacin (3)	5	500	17	8.8	2.1	72.1 (7.5)	93
		陽性対照 EMS (150)	5	500	31	32.9	5.7	80.6 (5.5)	104

EMS: ethyl methanesulfonate, SD: 標準偏差

*: 細胞全体に対する尾の輝度の割合(%), **: 還流が不十分の動物 213 (>40) を除いた値

実験 4 の結果、全ての群は溶媒対照と同等であった。ジチアノン (75mg/kg) 単独投与群で DNA への有意なダメージが認められなかった。Cox-2 阻害剤の投与はいずれも結果に影響を与えなかった。Cox-2 阻害剤を投与したジチアノン投与群の値はいずれも溶媒対照群と同等であった。

溶媒対照群および溶媒対照+Parecoxib 投与群に各 1 例 Hedgehog が >40 となる動物がいたが、これらは還流が十分でなかったためと思われる。陽性対照群では Hedgehog >40 の動物が 3 例いたが、これらは EMS の変異原性によるものであると考えられた。

本試験においてジチアノン単独投与により DNA 損傷が確認できなかったことから、本剤の腫瘍発生と Cox-2 との関連性は検討できなかった。

2) 組織病理学的検査:

- ・光学顕微鏡検査: 検体投与による影響は認められなかった。
- ・電子顕微鏡検査: 25mg/kg 群の 1 例の腎尿管基始部の上皮細胞にミトコンドリアの初期変性が認められた。ミトコンドリアは軽度から中等度に肥大し、またマトリックス内の組織は腫脹し、その密度は希薄化していた。

組織所見の写真を図に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

3) 酸化ストレス： 表 4 に示すように、DNAmg あたりの 8-OHdG の量に検体投与による影響はなかった。よって、ジチアノン投与による酸化ストレスはないものと判断した。

表 4.

	動物数	8-OHdG ng/mg DNA
対照群 (0.596CMC) po	10	5.75±0.97
ジチアノン 25mg/kg po	10	6.18±1.58
ジチアノン 50mg/kg po	10	5.92±0.74
ジチアノン 75mg/kg po	10	5.69±0.64
陽性対照 (STZ) 10mg/kg iv	10	5.90±0.83

検定方法： Wilcoxon-test (両側) 有意差はなかった。

上記の試験の結果より、コメットアッセイではジチアノンは雄の腎臓細胞に影響を及ぼさなかったが、雌では尾の DNA 相対輝度の増加傾向を示した。しかしながら、3 回の実験でははっきりした再現性が得られなかった。実験 1 および 2 におけるジチアノン 50mg/kg 投与群 (24 時間後) では有意または軽度の増加が見られたが、これらは動物の個体変動が大きいことに起因すると思われた。実験 1 での溶媒対照群の変動は 2.1-2.8% であったのに対し、個体変動は 4.0-19.9% であった。同様に他の試験でも個体変動が群変動を上回った。

また、ジチアノン 50mg/kg 以上の投与群では一般状態の変化として、下痢、不整呼吸、立毛および円背位がみられ、検体投与による全身毒性の影響の可能性も考えられた。

光学顕微鏡検査では病理組織学的変化はみられなかった。腎毒性に及ぼす短期投与 (7 日) の影響 (資料 34) において腎臓に細胞毒性が認められる時間的経緯をみると、毒性影響が組織所見に現れるにはコメットアッセイの暴露時間では短かったもの思われた。しかし、電子顕微鏡検査において細胞変性の初期状態が認められた。ミトコンドリアの変性が腎臓細管基始部の上皮細胞に認められており、この初期の細胞毒性が二次的に DNA の傷害を引き起こしたものと考えられた。また、電顕で所見のみられた部位は他の毒性試験で見られた所見の位置と一致していた。

よって、実験 1 にのみもっとも明瞭にみられたジチアノン 50mg/kg 群の DNA への傷害は再現性がなく、個体変動が大きいことから、この用量でみられた全身毒性および腎細胞への初期の毒性影響からの二次的な DNA 損傷であり、遺伝毒性によるものではないと考えられた。

以上より、ジチアノンおよびその代謝物はラット雄の腎臓細胞に対して遺伝毒性を有さないと判断した。

1-13-5 ¹⁴C-ジチアノンを用いたラットにおける DNA 共有結合性の検討 (資料 追 17,18)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 2009 年

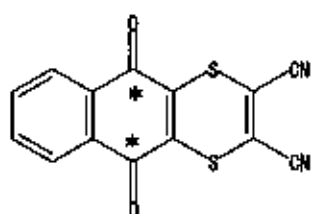
試験の目的: 本試験はジチアノンのラットにおける慢性毒性発がん性併合試験において雌ラットの腎臓に腫瘍性病変の発生率が増加したことから、ジチアノンのラットの DNA との共有結合性を検討した。

供試標識化合物:

化学名: 5,10-dihydro-5,10-dioxonaphtho[2,3-b]-1,4-dithiin-2,3-dicarbo-nitrile

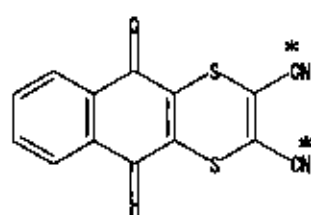
一般名: ジチアノン

構造式: ¹⁴C-環標識体



* 印: ¹⁴C 標識部位 (5 および 10-位)

¹⁴C-シアノ基標識体



* 印: ¹⁴C 標識部位 (2,3-シアノ基)

表 1 検体情報

供試化合物	¹⁴ C-5,10-位標識体	¹⁴ C-シアノ基標識体	非標識体
バッチ番号			
比放射能	MBq/mg	MBq/mg	-
放射科学的純度	%	%	-
化学的純度	%	%	%
標識位置	2箇所(5,10位)	2箇所(2,3-シアノ基)	-

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

陽性対照：³H-2-Acetylaminofluorene
IUPAC 名：2-Acetylaminofluorene [³H(N)]-
バッチ番号：645-137-0044-A-20090320-JG
放射化学的純度：97.9%
比放射能：4.4Ci/mmol

供試動物：SD ラット，雌 15 匹，
試験開始時：8-13 週齢，平均体重：275±14g

投与液の調製：¹⁴C-ジチアノンの原液はアセトニトリルに溶解して調製した。溶媒はエバポレーターで除去し、0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液(1% Cremophor¹含有)に懸濁して調製した。
陽性対照の原液はエタノールに溶解して調製し、以下¹⁴C-ジチアノンと同様に調製した。

投与用量：表 2 の投与量を設定した。動物にこれらの化合物を強制経口投与し、投与容量は 10mL/kg とした。

表 2

投与化合物	投 与 量	
¹⁴ C-環標識体	15 MBq/動物	2.2 または 8.8mg/kg 体重
¹⁴ C-シアノ基標識体	15 MBq/動物	1.7 または 7.0mg/kg 体重
³ H-2-Acetylaminofluorene	3 MBq/動物	-

用量設定：¹⁴C-ジチアノンの投与用量は共有結合指数(CBI)測定において、検出限界が適切かつ DNA 結合性が検出できる放射投与濃度を選択した。放射化学的純度が 100%のものが最大の感度を示した。上記の濃度はジチアノンの反復毒性試験結果からもラットにおいて耐容用量であった。

陽性対照は Harlan 研究所で CBI 測定に実績があり、当該施設でに過去に実施した結果より適切な用量を選択した。

試験方法：

1) Phase I (動物実験)：表 3 に示す 4 つの試験を実施した。

実験 2 及び 3 で採取した尿、糞、血液/血漿および骨髄の放射能を測定した。

肝臓及び腎臓について Harlan 研究所において DNA 共有結合性を調べた(Phase II)。

¹：ポリオキシエチレンひまし油

表 3. 試験方法

実験	群	動物数	化合物	投与量 (mg/kg)	屠殺 時間	試験方法	動物 番号
実験 1 (対照)	1	4	- (実験 2 の対照)		24	肝臓/腎臓採取；細切後-20°Cで凍結し、CBI 測定に供した。	1-4
	4	4	- (実験 3 の対照)		24	肝臓/腎臓採取；細切後-20°Cで凍結し、CBI 測定に供した。	9-12
実験 2	2	3	¹⁴ C-環標識 ジチノン	2.2 8.8	24	尿採取；0-6h, 6-12, 12-24h 糞採取；0-24h 血液/血漿；24hr 肝臓/腎臓採取；細切後-20°Cで凍結し、CBI 測定に供した。 骨髄採取；放射能を測定した。	5-7
実験 3	5	3	¹⁴ C-7/基 標識 ジチノン	1.7 7.0	24	尿採取；0-6h, 6-12, 12-24h 糞採取；0-24h 血液/血漿；24hr 肝臓/腎臓採取；細切後-20°Cで凍結し、CBI 測定に供した。 骨髄採取；放射能を測定した。	13-15
実験 4	3	1	陽性対照 ¹⁾	3MBq /動物	24	肝臓/腎臓採取；細切後-20°Cで凍結し、CBI 測定に供した。	8

¹⁾ : ³H-2-Acetylaminofluorene

2) Phase II (共有結合性の検討)； 実験 1-4 で得た肝臓及び腎臓組織は Harlen 研究所にて DNA との共有結合性を調べた。

- ・ Sagelsdorff らの方法に基づき、肝臓および腎臓を 75mM NaCl, 10mM Tris/HCl, 10mM EDTA, Hp7.8 中で個別にホモジネートして DNA を単離した。
- ・ 沈殿したクロマチンは変性させたライジング媒体に混入してクロロホルム/イソアミルアルコール/フェノール (CIP) で除タンパクし、ジエチルエーテルで抽出後、ヒドロキシアパタイトカラムに吸着させてエタノールを用いて分離沈殿させて精製した。
- ・ 高純度の DNA (タンパク<0.2%、RNA<1%) を溶解して一部を DNA 含有量の UV 検出に用い、他の一部をシンチレーションカクテルと混合して放射能を測定した。検出限界以上の放射能が測定される場合は CIP で抽出し、同操作を繰り返して検出限界以下になるまで測定した。
- ・ 対照群の動物から検出された放射能をバックグラウンドとした。
- ・ 共有結合指数 (CBI) の計算方法

$$\begin{aligned}
 \text{CBI} &= \frac{\mu\text{mol 化学結合} / \text{mol DNA} \times \text{検出}}{\text{nmol 投与化学物質} / \text{kg 体重}} \\
 &= \frac{\text{dpm} / \text{mg DNA}}{\text{dpm} / \text{kg 体重}} \times 309 \times 10^6
 \end{aligned}$$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

- ・ 試験の妥当性
平均バックグラウンドカウントがシンチレーションカクテルのみの値の 2 倍以内である。
- ・ DNA 結合の基準
バックグラウンドの平均値+3SD を超える場合 (SD:標準偏差)。
インキュベーション(*in vitro*)から得た DNA サンプルの比放射能が、処置動物から抽出したサンプルの DNA 結合放射能の 50%未満であるとき。

結果:

- 1) 物質収支: 実験 2 および 3 において採取した臓器/組織およびサンプルの放射能の物質収支を表 4 に示す。

表 4.

試験群		実験 2		実験 3		
投与化合物		¹⁴ C-環標識ジ f71n		¹⁴ C-β71基標識ジ f71n		
目標投与量 (mg/kg)		8.8		7.0		
動物数		3		3		
体重 (g)		264.5 ± 8.34		212.5 ± 14.20		
比放射能 (MBq/g)		5838.93		8026.43		
投与量 (mg/kg)		9.80 ± 0.17		8.27 ± 0.40		
投与放射能 (MBq/ラット)		15.13 ± 0.78		18.72 ± 9.36		
放射能		%TRR	mg eq/g 組織	%TRR	mg eq/g 組織	
組織	尿	0-6 h	2.97	18.07	38.88	139.03
		6-12 h	12.74	74.91	18.72	79.88
		12-24 h	17.99	77.40	5.12	19.13
	糞	0-24 h	25.29	35.05	20.90	25.75
	血漿		0.04	0.25	0.05	0.23
	骨髓		0.0001	0.05	0.0004	0.14
計		59.02		83.67		

%TRR: 投与量に対する放射能の割合(%). 表中の数値(○±○)は平均値±標準偏差を示す。

*: プールしたサンプルの値

- 2) DNA 共有結合性 (CBI)

試験の妥当性: シンチレーションカクテルのみの放射活性は 14.10cpm であった。対照動物の組織から得た DNA サンプルの放射活性は 12.73-13.90cpm (平均±SD; 13.34±1.67) であった。また、陽性対照は肝臓で CBI 値が 475 で通常中等度の変異原性物質として確認されたことから、試験は妥当であった(表 5)。

表 5. 陽性対照

動物番号(組織)		動物 8 (肝臓)	動物 8 (腎臓)
投与量	mg/kg 体重	0.015	0.015
	dpm/kg 体重 $\cdot 10^{-3}$	0.655	0.655
DNA	^{14}C 中の量 (mg)	2.592	1.834
	総放射活性 (cpm) ^b	960	36.1
	正味の放射活性 (cpm) ^a	956	31.1
	正味の放射活性 (dpm)	2611	73.8
	比活性 (dpm/mg)	1007	40.2
DNA との結合	CBI units	475	19

^a: 対照動物(動物番号 9)の肝臓(4.63cpm)および動物番号 1 の腎臓(5.00cpm)をバックグラウンドに用いた。

^b: カウントの有効性は肝臓で 43.6%、腎臓で 42.1%であった。

ジチアノンの DNA 共有結合指数(CBI) :

試験の結果を次頁表 6 に示す。

2 種類の ^{14}C 標識ジチアノンを投与した動物の肝臓における CBI は 0.11-0.46 であった。また、腎臓における CBI は 0.22-0.76 であった。CBI の値により遺伝毒性の強さは以下のように文献^{1, 2, 3}で示されている。

CBI	遺伝毒性の強さ
10^3	非常に強い (例)アフラトキシン B (>4000)
10^2	中等度に強い
1-10	弱い
<0.1	遺伝毒性なし

本試験においてジチアノンは $0.1 < CBI < 1$ であり、DNA との結合性は非常に低かった。

しかし、各投与群の比活性は対照動物から採取したサンプルと DNA フリーの上清とのインキュベーションでの比活性と同様であった。約 0.2%の蛋白のコンタミがあると考えられることから、その分の比活性を除くと、実質上の CBI は 0.1 未満であると考えられた。

文献 1 Caviezel M, Lutz WK, Minini U and Schlatter C: Interaction of esterone and estradiol with DNA and protein of liver and kidney in rat and hamster in vivo and in vitro. Arch Toxicol 1984; 55:97-103

文献 2 Lutz WK: In vivo covalent binding of organic chemicals to DNA as a quantitative indicator in the process of chemical carcinogenesis. Mutation Res 1979, 65, 289-356

文献 3 Lutz WK: Quantitative evaluation of DNA binding data for risk estimation and for classification of direct and indirect carcinogens. J Cancer Res Clin Oncol 1986, 113, 85-91

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

以上より、ジチアノンおよびその代謝物のラット肝臓及び腎臓細胞への共有結合性はないものと判断された。

表 6

群		2						
化合物		¹⁴ C-環標識ジチアノン						
組織		肝臓			腎臓			
動物番号		4 ^a	5	6	7	5	6	7
投与量	mg/kg 体重		9.71	9.65	10.0	9.71	9.65	10.0
	dpm/kg 体重・10 ⁻⁹		3.353	3.381	3.511	3.353	3.381	3.511
カマチン蛋白比活性 (dpm/mg)			181	154	224	1343	917	1158
DNA	ハ イル中の量 (ng)	6.159	6.345	6.414	7.066	2.000	1.988	1.659
	総放射活性 (cpm)	23.47	19.93	21.40	21.43	21.27	17.77	18.23
	正味の放射活性 (cpm)	10.08	6.54	8.01	8.04	7.80	4.30	4.77
	対照動物のバックラウンド		13.39cpm			13.47cpm		
	正味の放射活性 (dpm)	11.38	7.39	9.05	9.09	8.66	4.77	5.29
	カウント有効性 (%)		88.5			90.1		
	比活性 (dpm/mg)	1.85	1.16	1.41	1.29	4.33	2.40	3.19
DNA との結合 CBI unit			0.11	0.13	0.11	0.40	0.22	0.28
群		3						
化合物		¹⁴ C-シアノ基標識ジチアノン						
組織		肝臓			腎臓			
動物番号		10 ^b	13	14	15	13	14	15
投与量	mg/kg 体重		8.47	8.47	7.80	8.47	8.47	7.80
	dpm/kg 体重・10 ⁻⁹		4.079	4.079	3.754	4.079	4.076	3.754
カマチン蛋白比活性 (dpm/mg)			1219	1580	1280	2210	2045	1647
DNA 精製 1 回目	ハ イル中の量 (ng)	2.306	n. a.	1.259	2.252	0.926	1.476	1.178
	総放射活性 (cpm)	29.03	n. a.	33.97	33.67	21.20	25.33	29.57
	正味の放射活性 (cpm)	16.03	n. a.	20.97	20.67	7.73	11.87	16.10
	対照動物のバックラウンド		13.00cpm			13.47cpm		
	正味の放射活性 (dpm)	17.83	n. a.	23.32	22.99	8.53	13.08	17.75
	カウント有効性 (%)		89.9			90.7		
	比活性 (dpm/mg)	7.73	n. a.	18.53	10.21	9.21	8.86	15.07
DNA 精製 2 回目	ハ イル中の量 (ng)	2.583	n. a.	0.477	1.069	0.460	0.606	0.447
	総放射活性 (cpm)	21.70	n. a.	16.07	17.67	15.23	18.43	17.27
	正味の放射活性 (cpm)	8.23	n. a.	2.60	4.20	1.67	4.87	3.70
	対照動物のバックラウンド		13.47cpm			13.57cpm		
	正味の放射活性 (dpm)	9.17	n. a.	2.90	4.68	1.85	5.39	4.10
	カウント有効性 (%)		89.8			90.3		
	比活性 (dpm/mg)	3.55	n. a.	6.07	4.37	4.01	8.90	9.18
DNA との結合 CBI unit			n. a.	0.46	0.36	0.30	0.67	0.76

a: *in vitro*, 動物番号 4 の肝臓からカマチンを採取し、動物番号 5 より得た DNA 単離の最初の遠心分離での上清とインキュベート。(比活性: 1.85dpm/mg)

b: *in vitro*, 動物番号 10 の肝臓からカマチンを採取し、動物番号 5 より得た DNA 単離の最初の遠心分離での上清とインキュベート。(比活性: 3.55dpm/mg)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

1-13-7 7日間混餌投与雌ラットにおける腎細胞の細胞増殖活性（S-期反応）試験

（資料 追 20, 21）

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2009年

検体純度：

供試動物：CrI:CD(SD)ラット，1群雌雄各8匹，開始67-69日齢

試験開始時体重範囲（雄：339.9-376.0g，雌：213.3-249.9g）

試験目的：ラットの慢性毒性発がん性試験の高用量群雌において腎臓の腫瘍発生が観察されたことから，検体投与が腎臓細胞の増殖活性に及ぼす影響を検査した。

投与期間：7日間

試験方法：検体を0，120及び600ppmの濃度で飼料に混入し，7日間投与した。投与開始時にBrdU（5-Bromo-2'-Deoxyuridine）の2mL（20mg/mL生理食塩水溶液）の入ったミニポンプをラットの背部にインプラントした。投与期間終了後動物を屠殺し，腎臓細胞の増殖活性（S-期反応の標識率）およびアポトーシスを検査した。

用量設定根拠：ラットを用いた慢性毒性/発がん性併合試験（資料14）において，検体を0，20，120，及び600ppmの濃度で飼料中に混入して投与したところ600ppm群の雌において腎臓腺腫の発生率の増加が見られたことから，本試験の高用量を600ppm、低用量を120ppmとした。

一般状態：一般状態は毎日観察した。

死亡および一般状態の変化はみられなかった。

体重：体重は投与開始時および投与終了時に測定した。

検体投与による体重の有意な変化はみられなかった。

飼料摂取量および飲水量：飼料摂取は週毎に測定し，飲水量は飲水ピンを目視により毎日観察した。飼料摂取量および体重から摂餌効率も計算した。

飼料摂取量，飲水量および摂餌効率に検体投与による変化はみられなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

検体摂取量： 検体摂取量は飼料摂取量および飼料中の検体濃度から算出した。

表 2. 検体摂取量

用量群 (ppm)	検体摂取量 (mg/kg/日)	
	雄	雌
120	6.5	8.0
600	32.8	40.6

肉眼的病理検査および臓器重量： 投与期間終了後動物は麻酔下で屠殺し、肉眼的病理検査を実施し、肝臓および腎臓の臓器重量を測定した。

有意差のみられた項目を表 3 に示す。

表 3. 臓器重量

臓器	用量 (ppm)	雌	
		120	600
腎臓	絶対	↑ 110%	↑ 116%
	対体重	↑ 110%	↑ 119%
肝臓	対体重	107%	↑ 115%

表中の値は対照群値を 100%とした場合の割合。

統計検定： Kruskal-wallis-H + Wilcoxon (両側検定) † ; p<=0.05, †† ; p<=0.01

矢印のない数値は有意差なし。

雌の全投与群の腎臓において絶対および対体重ともに用量関連性のある有意な増加が認められたが、120ppm 群においては関連する組織病理学的所見、細胞増殖活性の増加およびアポトーシスの変化は見られなかったことから、毒性学的意義のないものであると判断した。雄には臓器重量の有意な変化はみられなかった。

組織病理学的検査： 腎臓は 4%ホルマリン溶液で固定後切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色、BrdU および TUNEL 免疫染色し、光学顕微鏡で組織病理学的検査を実施した。

1) BrdU を用いた腎臓の細胞増殖活性 (S-期反応) 検査結果を表 3 に示す。

表 4. 細胞増殖活性 (S-期反応)

臓器	雄		雌	
	120	600	120	600
腎臓 (皮質)	104%	46%	94%	141%
腎臓 (OSOM)	↑ 139%	↑ 177%	109%	↑ 249%

OSOM：髄質の外層の外帯

表中の値は対照群の LI (標識率) を 100%とした場合の割合。

統計検定： Wilcoxon (片側検定) † ; p<=0.05, †† ; p<=0.01

600ppm 群雌雄および 120ppm 群雄の髄質の外層の外帯に有意な細胞増殖活性の増加がみられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

2) TUNEL 染色によるアポトーシスの検査結果を表 4 に示す。

表 4. アポトーシス

臓器	雄	
	120	600
用量 (ppm)		
腎臓 (皮質)	↑ 168%	↑ 216%
腎臓 (OSOM)	82%	52%

OSOM: 髄質の外層の外帯

表中の値は対照群の LI (標識率) を 100% とした場合の割合。

統計検定: Wilcoxon (片側検定) †: $p < 0.05$, ††: $p < 0.01$

雄の皮質において全投与群に有意なアポトーシスの増加がみられた。

3) HE 染色による病理組織学的検査結果を表 5 に示す。

表 5. 腎臓

性別	雄			雌			
	用量 (ppm)	対照	120	600	対照	120	600
検査動物数		8	8	8	8	8	8
尿細管細胞、塩基性		1	5	4			
皮質 癒痕			1	1			
皮質 嚢胞						1	
空胞性変性 (巢)							3
BrdU: (皮質/OSOM)							
びまん性		8	8	8	8	8	
帯状							6
縞状 ^{a)}							1
点状							1

OSOM: 髄質の外層の外帯

表中の空欄は該当動物なし。^{a)}: OMOS から皮質をとおり垂直方向に。

雌の 600ppm 群に空胞性変性および細胞増殖活性が帯状、縞状および点状にみられた (皮質および OSOM)。

以上の結果から、ラットに 7 日間検体を飼料に混入して投与したところ、雄において全投与群に塩基性の尿細管細胞の極軽度から軽度の増加がみられた。これはラットの慢性腎症の第一段階にあたる。また、600ppm 群雌では最小の細胞増殖およびアポトーシスの増加がみられたが、腎臓に細胞毒性はみられておらず、これは慢性腎症の第一段階のマージナルな悪化を示しているものと思われた。慢性腎症はラットに特有の自然発生病変でありヒトには関連性のないものである^{*)}

一方、雌の 600ppm 群においては細胞増殖活性の有意な増加がみられたが、アポトーシスの増加はみられなかった。また、雄とは異なり尿細管上皮細胞に空胞性変性がみられた。

*) Hard GC and Khan KN (2004). A contemporary overview of chronic progressive nephropathy in the laboratory rat, and its significance for human risk assessment. *Toxicol. Pathol.* 32: 171-180.