

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

フェンヘキサミドのマウスを用いた発がん性試験

(毒性資料 原体 22)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年月日 : 1996年10月14日

検体の純度 : %

試験動物 : B6C3F1 系マウス(SPF) [試験開始時 5~6 週齢、平均体重 雄 18.6g、雌 14.8g] 1群雌雄各 50 匹+雌雄各 10 匹 (中間検査用 : 12 ヶ月後に計画殺)

試験期間 : 1993年4月~1995年5月
(投与期間 ; 約 24 ヶ月)

【試験方法】

検体を 0 (対照群)、800、2400 及び 7000ppm となるように粉末飼料(1%のピーナッツ油添加)に混ぜ 24 ヶ月間マウスに投与した。

用量設定の根拠 ;

【試験項目及び試験結果】

1) 臨床症状

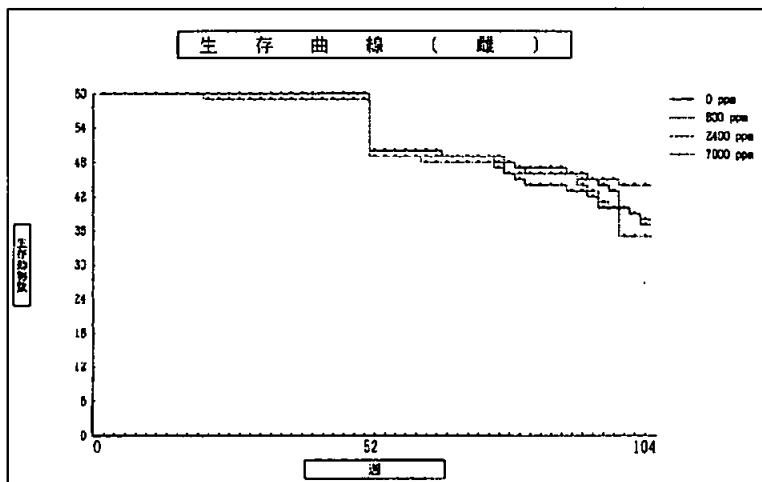
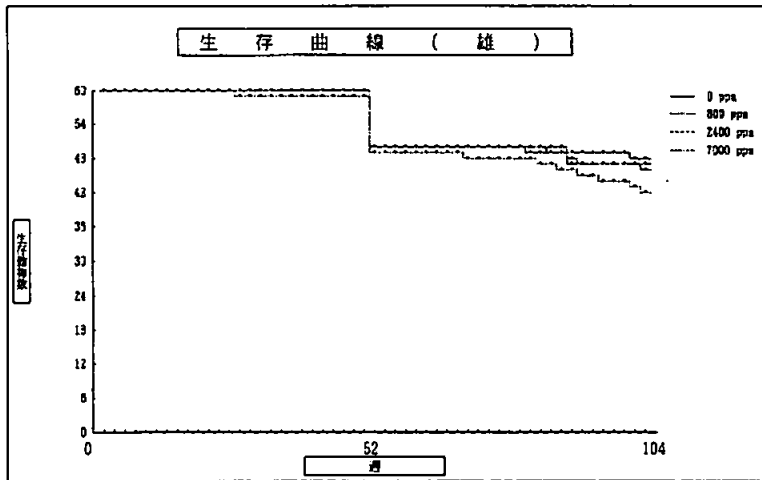
動物を少なくとも 1 日 2 回 (週末と休日は 1 回) 観察し、臨床症状と異常を記録した。各個体の詳細な検査は週 1 回実施した。

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

2) 死亡率 (図 1)

本検体の投与は、7000ppm 群まで雌雄共に、死亡率に関して影響を示さなかった。

図 1. 生存曲線



3) 体重(図 2-1, 図 2-2)

投与開始前から試験終了まで週 1 回の間隔で、生存動物の体重を測定した。

更に、臓器の体重比重量の計算のため、12 カ月、24 カ月後の計画屠殺直前に体重を測定した。

雌の体重については、全用量群で、雄の体重については、800ppm と 2400ppm 群で統計学的に有意な差は認められなかったが、7000ppm 群の雄では対照群に比べ体重増加の抑制が認められた。このうち、48 週の 7000ppm 群の雄の体重は対照群に比較して 8%の低下であり、検体投与の影響と考えられた。

図 2-1. 体重 (雄)

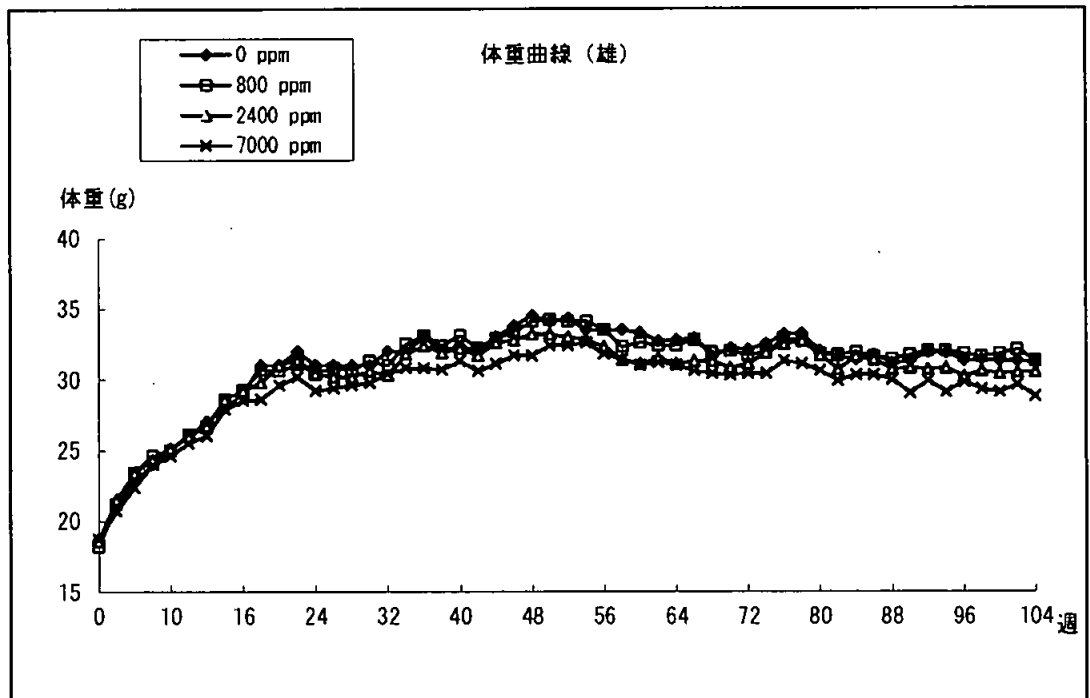
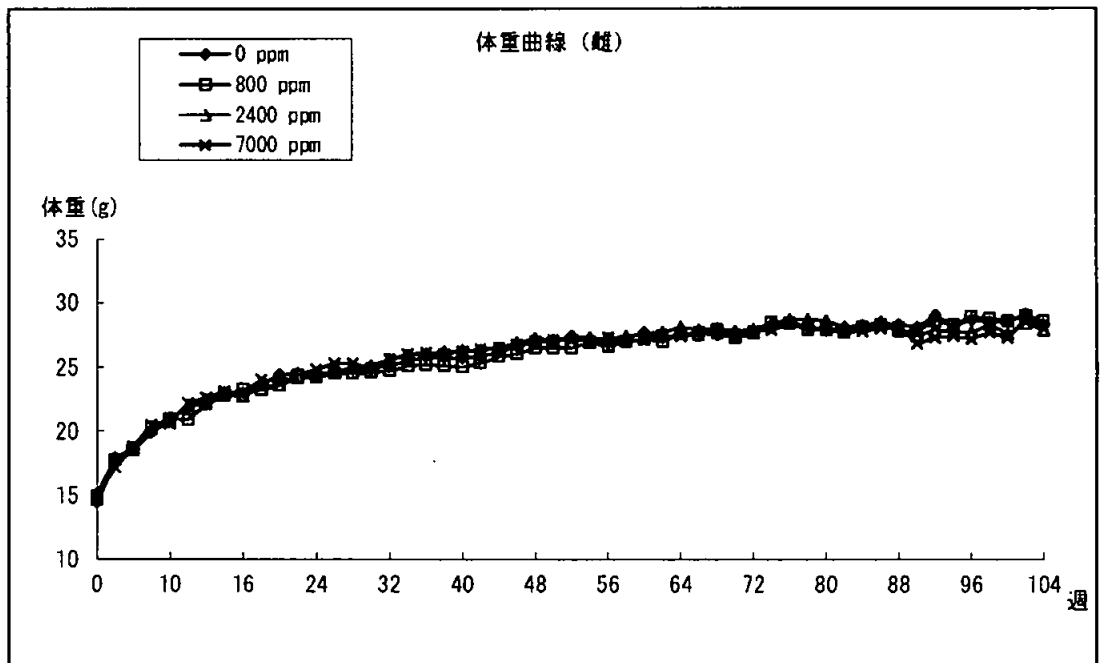


図 2-2. 体重 (雌)



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

4) 摂餌量及び検体摂取量 (表 1)

摂餌量を各群 20 匹について個体毎に 13 週まで週 1 回の間隔で、その後は 4 週間に 1 回の間隔で測定し、これを基に検体摂取量を算定した。

全用量群の雌雄の動物あたりの摂餌量は対照群と同等であった。

以下に検体摂取量(mg/kg 体重/日)を示す。

表 1. 検体摂取量(mg/kg 体重/日)

項 目	雄				雌			
	0	800	2400	7000	0	800	2400	7000
検体摂取量	—	247	807	2350	—	364	1050	3180

5) 飲水量

飲水量を各群 12 匹について個体別に 13 週まで週 1 回の間隔で、その後 4 週間に 1 回の間隔で測定した。

7000ppm 群の雌雄共に対照群と比較して、飲水量の有意な増加が認められたが、800ppm と 2400ppm 群の飲水量は対照群と同等であった。7000ppm 群の累積飲水量では対照群に比較して雄で 39%、雌で 37%の増加であった。

6) 臨床検査

各群任意に選抜した 10 例の動物について血液学的検査及び血液生化学的検査を 12、24 カ月で行った。なお、白血球百分率のみは、80 週にも検査した。

6-1) 血液学的検査 (表 2)

エーテル麻酔下で、眼窩静脈叢から採取した末梢血において、白血球百分率、赤血球形態、赤血球数、白血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)、平均赤血球容積(MCV)、血小板数、ハインツ小体及び網赤血球数を測定又は算定した。

全用量群の雌雄で、血液学的検査で毒性学的に意味のある変化は認められなかった。7000ppm群の雄で 24 カ月の検査のヘモグロビン量とヘマトクリット値が有意に

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

増加したが、対照群のそれぞれ1例と2例に低い数値があったことと7000ppm群の1例が背景データの上限を越えていたことによる変化と考えられた。12ヵ月の検査時の2400ppmの雄(313g/L)と7000ppm群の雌(312g/L)のMCHCの有意な低下はそれぞれの対照群の数値(325と319g/L)とわずかな差であった。12ヵ月の検査時で全投与群の雄と7000ppm群雌の白血球数の有意な低下が認められたが、対照群の数値(雄; $6.7 \times 10^9/L$, 雌; $4.2 \times 10^9/L$)が背景データ(雄= $0.7 \sim 3.8 \times 10^9/L$, 雌= $0.7 \sim 4.0 \times 10^9/L$)と比較すると高いことと、後述の白血球百分率の結果やリンパ系組織に形態学的変化を示していないことから、これらの変化は検体に起因したものでなく、毒性学的な意義がないものと考えられた。

白血球百分率では、リンパ球、分葉核好中球、好酸球、好塩基球について、3回の検査時の全投与群で対照群と有意な差は認められず、投与による百分率の移行性は認められなかった。

表2. 血液学的検査 (有意差を認めた所見)

項 目	検査週 (ppm)	12ヵ月			24ヵ月		
		800	2400	7000	800	2400	7000
雄							
白血球		↓64	↓64	↓44			
ヘモグロビン							↑117
ヘマトクリット							↑117
MCHC			↓96				
雌							
白血球				↓71			
MCHC				↓97			

↑↓ : $P < 0.05$, ↑↓ : $P < 0.01$ (U検定による)

表中の数値は対照群に対する変動率(%)

6-2) 血液生化学的検査 (表3)

末梢血の血漿において、アルカリホスファターゼ(ALP)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALAT)、ビリルビン、総蛋白、尿素、クレアチニン、コレステロール、グルコース、アルブミンを測定した。

なお、これらの血液サンプルは、グルコース測定用(無麻酔下の非絶食の動物の

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

尾静脈から採血し、除蛋白処理)を除き、エーテル麻酔下で動物の眼窩静脈叢から採血した。

クレアチニンの増加が両検査時に 7000ppm 群の雄で認められた。この所見は腎臓重量の低下に加え、腎臓の病理組織学的所見の皮質尿細管の好塩基性化(7000ppm 群の雌)と慢性腎症(7000ppm 群の雄)との関連から検体の影響と考えられた。また尿素の有意な上昇が雄の 12 ヶ月時に全ての用量群で認められた。用量群の値(10.99~11.69mmol/L)及び対照群の値(9.63mmol/L)は、いずれも背景値(8.7~16.94mmol/L)であり、検体投与との関連性は否定できると考えられる。しかし、7000ppm 群でのこの上昇は、クレアチニンの変動とも関連が示唆され、また 24 ヶ月時に有意差は認められないが、上昇傾向が伺えることから、検体投与の影響とも考えられた。ALP の上昇が 52 週時に 7000ppm 群の雄でみられたが、24 ヶ月時及び雌ではみられなかったことから、毒性学的に関連した変化とは考えられなかった。

その他に認められた統計学的な有意差は、正常変動範囲内にあるか用量相関性が認められないかなどの理由により、本検体による影響とはみなされなかった。

表 3. 血液生化学的検査 (有意差を認めた所見)

項 目 (ppm)	12 ヶ月			24 ヶ月		
	800	2400	7000	800	2400	7000
雄						
AP			↑ 109			
コレステロール				↑ 114		↑ 154
クレアチニン			↑ 110			↑ 118
尿素	↑ 115	↑ 109	↑ 121			
総ビリルビン			↑ 115			
アルブミン		↑ 107	↑ 106			
雌						
血糖	↑ 110					
総蛋白			↓ 95			

↑ ↓ : P < 0.05, ↑ ↓ : P < 0.01 (U検定による)

表中の数値は対照群に対する変動率(%)

7) 剖検

途中死亡動物、中間屠殺動物及び最終屠殺動物の全動物を剖検した。

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

中間屠殺動物の剖検において、全用量群とも検体投与に起因する肉眼的変化は認められなかった。また、切迫屠殺あるいは途中死亡動物についても検体に起因する異常所見は認められなかった。

最終屠殺の剖検では、全用量群とも本検体による肉眼的所見は認められなかった。

8) 臓器重量 (表 4)

52 及び 106 週後の剖検において、脳、肝臓、腎臓、脾臓、卵巣及び精巣の臓器重量を測定した。

2400ppm と 7000ppm 群の雄では腎臓実重量と体重比重量の低下が中間時(2400ppm 群の実重量を除く)と最終屠殺時にみられた。また、7000ppm 群雌の腎臓実重量及び体重比重量の低下が認められ、いずれも検体投与によるものと考えられた。

その他の臓器で見られた有意な変化は、用量相関性が認められないかあるいは、軽度であることなどの理由により毒性学的に意味のある所見とは考えられなかった。

表 4. 臓器重量 (有意差を示した臓器)

項 目	種 別	実重量						体重比重量					
		52 週			106 週			52 週			106 週		
	検査週	800	2400	7000	800	2400	7000	800	2400	7000	800	2400	7000
雄	脳												↑ 109
	腎臓		↓ 79		↓ 90	↓ 76		↓ 90	↓ 83		↓ 91	↓ 80	
	脾臓				↑ 141						↑ 143		
雌	肝臓		↑ 109										
	腎臓					↓ 86						↓ 86	

↑ ↓ : P < 0.05, ↓ : P < 0.01 (ANOVA による)

表中の数値は対照群に対する変動率 (%)

9) 病理組織学的検査 (表 5~10)

中間屠殺動物からは下記の器官を摘出し、病理解剖的な検査を行ったが、組織学的な検査は行わなかった。途中死亡した動物や切迫屠殺及び最終屠殺動物の以下の臓器について病理組織学的検査を行った。

副腎、大動脈、脳、腸管 (十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸)、眼球、精巣上体、大腿骨 (骨髄)、胆のう、ハーダー氏腺、心臓、腎臓、涙腺、肝臓、肺、リンパ節 (腸間膜及び顎下)、食道、卵巣 (卵管を含む)、脾臓、脳下垂体、前立腺、

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

唾液腺、坐骨神経、精のう、骨格筋、皮膚（乳腺域）、脊髄（3部位）、脾臓、胸骨、胃、精巣、甲状腺、舌、膀胱、子宮、膈、喉頭、乳腺、視神経、尿管、尿道、異常部位

9-1) 非腫瘍性病変（表 5, 9）

7000ppm 群の雌で腎臓の皮質尿細管の好塩基性化、雄で慢性腎症の増加が認められた。これらの所見は検体の投与によるものと考えられた。また、2400ppm と 7000ppm 群の雄で、尿細管の空胞化の頻度の抑制が認められたが、腎障害を反映するものとは考えられず、毒性学的意義は明らかではない。

その他の鏡検所見は、自然発生的変化と考えられた。

表 5. 腎臓における顕著な非腫瘍性病変

項 目 (ppm)	雄				雌			
	0	800	2400	7000	0	800	2400	7000
【検査数】	49	50	50	50	50	50	50	50
腎臓								
尿細管好塩基性化	38	35	36	39	#7	7	8	↑22
慢性腎症	#1	1	1	↑9	2	2	0	2
近位尿細管空胞化の抑制	#2	3	↑21	↑50	-	-	-	-

χ^2 検定(申請者) - \uparrow : P<0.05, \uparrow : P<0.01

傾向性検定(Cochran-Armitage 法) - # ; P<0.005

9-2) 2年後の最終計画屠殺用動物の腫瘍性病変（表 6~8, 10）

腫瘍を有する動物数（表 6）に用量相関性が見られず、また、計画屠殺した動物と比較して腫瘍を有する切迫屠殺例の数（表 6）にも用量依存性が認められなかった。更に、良性及び悪性腫瘍の発生頻度（表 7）に差は認められなかった。また、腫瘍動物の発生における経時的変化（表 8）に用量依存性は認められなかった。

表 6. 最終屠殺用動物の良性腫瘍と悪性腫瘍を有する動物数

性別	雄				雌			
	0 50	800 50	2400 50	7000 50	0 50	800 50	2400 50	7000 50
【死亡あるいは切迫屠殺動物】								
検査動物数	4	8	3	2	13	15	7	12
腫瘍を有する動物数	3	5	3	0	11	13	5	6
良性腫瘍のみを有する動物数	1	0	1	0	0	2	0	0
悪性腫瘍のみを有する動物数	2	4	2	0	7	11	5	6
良性と悪性腫瘍を有する動物数	0	1	0	0	4	0	0	0
【最終屠殺動物】								
検査動物数	46	42	47	48	37	35	43	38
腫瘍を有する動物数	23	17	24	19	24	21	19	24
良性腫瘍のみを有する動物数	8	7	7	9	8	5	3	8
悪性腫瘍のみを有する動物数	14	6	16	7	12	8	8	8
良性と悪性腫瘍を有する動物数	1	4	1	3	4	8	8	8
【全動物】								
検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50
腫瘍を有する動物数	26	22	27	19	35	34	24	30
良性腫瘍のみを有する動物数	9	7	8	9	8	7	3	8
悪性腫瘍のみを有する動物数	16	10	18	7	19	19	13	14
良性と悪性腫瘍を有する動物数	1	5	1	3	8	8	8	8

χ^2 検定-申請者

表 7. 最終屠殺用動物の腫瘍数

性別	雄				雌			
	0 50	800 50	2400 50	7000 50	0 50	800 50	2400 50	7000 50
腫瘍数								
良性	9	12	10	12	12	17	17	17
悪性	15	10	18	12	16	17	17	18
総数	24	22	28	24	28	34	34	35

χ^2 検定-申請者

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

表 8. 腫瘍を有する動物の経時的発生（最終屠殺用動物群）

性別	雄				雌			
	0	800	2400	7000	0	800	2400	7000
用量 (ppm)	0	800	2400	7000	0	800	2400	7000
動物数	4	8	3	2	13	15	7	12
週								
13-26	0	0	0	0	0	0	0	0
27-39	0	0	0	0	0	0	0	0
40-52	0	0	0	0	0	0	0	0
53-65	0	0	0	0	1	0	0	0
66-78	0	1	0	0	0	2	0	0
79-91	2	1	2	0	3	0	2	2
92-剖検	1	3	1	0	7	11	3	4
0-剖検	3	5	3	0	11	13	5	6

表 9-1 最終屠殺用動物の主要な非腫瘍性病変

検査時期	性別	雄				雌			
	用量群 (ppm)	0	800	2400	7000	0	800	2400	7000
	[検査動物数]	4	8	3	2	13	15	7	12
死亡 ・ 切迫 屠殺 動物	脳								
	鋳質沈着	3	2	3	1	4	4	2	1
	脊髓								
	円形細胞浸潤	0	1	0	0	2	0	0	0
	坐骨神経								
	変性	1	0	0	0	6	10	1	4
	肺								
	貪食細胞蓄積	1	0	0	0	3	0	1	1
	無気肺	0	2	1	0	0	0	0	0
	充血/うっ血	2	3	2	1	2	5	3	3
	胃								
	粘膜萎縮	1	0	0	0	3	0	0	3
	胃拡張	0	1	0	0	0	1	0	0
	肝臓								
	肥大	0	0	0	0	1	0	0	0
	壊死	0	3	1	1	0	1	2	0
	円形細胞浸潤	0	1	0	0	1	0	0	2
	グリコーゲン減少	1	4	2	1	4	3	2	6
	腎臓								
	尿細管好塩基性化	1	2	1	2	1	0	0	1
	空胞化減少	0	0	0	2	0	0	0	0
	慢性腎症	0	0	0	0	0	0	0	1
	蛋白円柱	0	1	0	0	2	0	0	2
	色素沈着	0	0	0	0	0	1	0	1
	膀胱								
	円形細胞浸潤	0	0	0	0	4	2	0	2
	精巣								
	精細管萎縮	2	4	0	0	/	/	/	/
	前立腺								
	萎縮	2	3	0	1	/	/	/	/
	甲状腺								
	のう胞	0	0	0	0	2	2	1	3
	副腎								
被膜下細胞過形成	0	0	0	0	0	1	0	0	
皮質細胞過形成	0	0	0	0	0	1	0	0	
皮質細胞肥大	0	0	0	0	0	1	0	0	
脾臓									
髓外造血	1	4	2	0	7	3	0	7	
卵巣									
萎縮	/	/	/	/	4	8	3	7	
のう胞	/	/	/	/	1	3	0	4	
子宮									
のう胞性内膜過形成	/	/	/	/	9	15	5	9	

χ^2 検定-申請者, 傾向検定Armitage法

表 9-2 最終屠殺用動物の主要な非腫瘍性病変(つづき)

検査時期	性別	雄				雌			
	用量群(ppm)	0	800	2400	7000	0	800	2400	7000
	[検査動物数]	46	42	47	48	37	35	43	38
最終屠殺動物	脳								
	鉍質沈着	34	24	↓25	27	11	12	19	16
	脊髓								
	円形細胞浸潤	4	3	7	4	12	10	11	12
	坐骨神経								
	変性	16	21	14	14	30	27	34	28
	肺								
	貪食細胞蓄積	6	3	5	3	3	0	1	0
	無気肺	2	3	6	3	2	2	2	2
	充血/うっ血	1	0	1	0	2	2	0	0
	胃								
	粘膜萎縮	0	0	1	2	1	0	4	2
	胃拡張	1	1	2	2	0	1	1	2
	肝臓								
	肥大	1	2	2	2	0	0	2	3
	壊死	1	2	3	1	6	6	8	9
	円形細胞浸潤	10	11	6	5	10	7	14	10
	グリコーゲン減少	1	0	1	0	1	2	6	3
	腎臓								
	尿細管好塩基性化	37	33	35	37	6	7	8	↑21
	空胞化減少	2	3	↑21	↑48	0	0	0	0
	慢性腎症	1	1	1	9	2	2	0	1
	線維化	3	0	2	3	1	2	1	0
	蛋白円柱	2	0	2	2	4	1	1	1
	色素沈着	0	0	0	0	0	0	0	1
	膀胱								
	円形細胞浸潤	5	5	5	7	21	19	27	22
	精巣								
	精細管萎縮	3	1	3	3	/	/	/	/
	前立腺								
	萎縮	2	1	1	3	/	/	/	/
	甲状腺								
	褐色色素沈着	2	0	0	0	5	3	4	9
	のう胞	3	1	3	3	5	7	9	3
	副腎								
	被膜下細胞過形成	1	3	1	1	1	0	0	2
皮質細胞過形成	5	↑13	0	7	2	0	0	0	
皮質細胞肥大	13	6	5	9	5	1	6	5	
脾臓									
髓外造血	4	2	3	3	0	5	4	5	
卵巣									
萎縮	/	/	/	/	17	16	15	18	
のう胞	/	/	/	/	6	4	9	7	
子宮									
のう胞性内膜過形成	/	/	/	/	37	35	42	38	

χ^2 検定(申請者)-↑↓: P<0.05、↑: P<0.01, 傾向検定Armitage法

表 9-3 最終屠殺用動物の主要な非腫瘍性病変 (つづき)

検査 時期	性別	雄				雌			
	用量群 (ppm)	0	800	2400	7000	0	800	2400	7000
	[検査動物数]	50	50	50	50	50	50	50	50
全 動 物	脳								
	鈣質沈着	37	↓26	28	28	15	16	21	17
	脊髄								
	円形細胞浸潤	4	4	7	4	14	10	11	12
	坐骨神経								
	変性	17	21	14	14	36	37	35	32
	肺								
	貪食細胞蓄積	7	3	5	3	6	0	2	1
	無気肺	2	5	7	3	2	2	2	2
	充血/うっ血	3	3	3	1	4	7	3	3
	胃								
	粘膜萎縮	1	0	1	2	4	0	4	5
	胃拡張	1	2	2	2	0	2	1	2
	肝臓								
	肥大	1	2	2	2	1	0	2	3
	壊死	1	5	4	2	6	7	10	9
	円形細胞浸潤	10	12	6	5	11	7	14	12
	グリコーゲン減少	2	4	3	1	5	5	8	9
	腎臓								
	尿細管好塩基性化	38	35	36	39	7	7	8	↑22
	空胞化減少	2	3	↑21	↑50	0	0	0	0
	慢性腎症	1	1	1	↑9	2	2	0	2
	線維化	3	0	2	3	1	2	1	0
	蛋白円柱	2	1	2	2	6	1	1	3
	色素沈着	0	0	0	0	0	1	0	2
	膀胱								
	円形細胞浸潤	5	5	5	7	25	21	27	24
	精巣								
	精細管萎縮	5	5	3	3	/	/	/	/
	前立腺								
	萎縮	4	4	1	4	/	/	/	/
	甲状腺								
	褐色色素沈着	2	0	0	0	5	3	4	9
のう胞	3	1	3	3	7	9	10	6	
副腎									
被膜下細胞過形成	1	3	1	1	1	1	0	2	
皮質細胞過形成	5	13	0	7	2	1	0	0	
皮質細胞肥大	13	6	5	9	5	2	6	5	
脾臓									
髓外造血	5	6	5	3	7	8	4	12	
卵巣									
萎縮	/	/	/	/	21	24	18	25	
のう胞	/	/	/	/	7	7	9	11	
子宮									
のう胞性内膜過形成	/	/	/	/	46	50	47	47	

χ^2 検定(申請者)-↑↓: P < 0.05、↑: 0.01, 傾向検定Armitage法

表 10-1 最終屠殺用動物の腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄				雌			
	用量群 (ppm)	0	800	2400	7000	0	800	2400	7000
	[検査動物数]	4	8	3	2	13	15	7	12
死 亡 ・ 切 迫 屠 殺 動 物	肝臓								
	肝細胞腺腫 (良)	0	0	1	0	1	0	0	0
	肝細胞癌 (悪)	2	0	1	0	0	0	0	0
	血管腫 (良)	0	0	0	0	0	1	0	0
	血管肉腫 (悪)	0	0	0	0	2	0	0	0
	腎臓								
	尿管細胞癌 (悪)	0	0	0	0	0	0	1	0
	肺								
	気管支癌 (悪)	0	0	0	0	1	0	0	0
	脾臓								
	腺腫/島細胞 (良)	1	0	0	0	0	0	0	0
	脾臓								
	血管肉腫 (悪)	0	0	0	0	1	0	0	0
	全身性腫瘍								
	リンパ腫 (悪)	0	3	0	0	7	7	2	4
	組織球性肉腫 (悪)	0	2	1	0	3	2	2	1
	下垂体								
	腺腫/前葉 (良)	0	0	0	0	2	0	0	0
	ハーダー氏腺								
	腺腫 (良)	0	0	0	0	0	1	0	0
	皮膚その他								
	線維肉腫 (悪)	0	0	0	0	0	1	0	2
	乳腺								
	腺癌 (悪)	/	/	/	/	0	1	0	1
	子宮								
	ポリープ/間質 (良)	/	/	/	/	1	0	0	0
	大腿骨								
	血管腫 (良)	0	0	0	0	1	0	0	0
精巣									
ライジッヒ細胞腫 (良)	0	1	0	0	/	/	/	/	
体腔 ^{&}									
中皮腫 (良)	1	0	0	0	0	0	0	0	

χ^2 検定-申請者, 傾向検定peto法, &;肉眼的病変が存在した場合のみ検査

表 10-2 最終屠殺用動物の腫瘍性病変 (つづき)

検査 時期	性別	雄				雌			
	用量群 (ppm)	0	800	2400	7000	0	800	2400	7000
	[検査動物数]	46	42	47	48	37	35	43	38
最 終 屠 殺 動 物	肝臓								
	肝細胞腺腫 (良)	1	3	3	5	1	0	2	4
	肝細胞癌 (悪)	7	3	13	8	1	1	1	1
	血管腫 (良)	0	0	0	0	0	0	1	0
	肺								
	気管支腺腫 (良)	4	0	1	0	0	0	0	2
	気管支癌 (悪)	1	2	3	2	0	0	1	0
	脾臓								
	腺腫/島細胞 (良)	0	0	0	0	1	0	0	0
	脾臓								
	血管肉腫 (悪)	1	0	1	1	0	0	2	0
	リンパ節								
	血管腫 (良)	0	0	0	0	0	0	2	0
	全身性腫瘍								
	リンパ腫 (悪)	5	4	1	1	11	15	11	10
	組織球性肉腫 (悪)	0	1	0	0	4	1	1	4
	線維性組織球腫 (悪)	1	0	0	0	0	0	0	0
	副腎								
	腺腫/皮質 (良)	0	0	0	0	0	0	1	0
	腫瘍/髓質 (良)	0	0	0	1	1	0	0	0
	腫瘍/被膜下細胞 (良)	1	4	2	2	0	0	1	0
	下垂体								
	腺腫/前葉 (良)	0	1	0	1	4	9	5	5
	甲状腺								
	濾胞腺腫 (良)	1	0	0	0	0	0	1	0
	濾胞癌 (悪)	0	0	0	0	0	0	0	1
	ハーダー氏腺								
腺腫 (良)	2	4	2	2	1	1	0	0	
皮膚その他									
顆粒細胞腫瘍 (良)	0	0	0	0	0	1	0	0	
卵巣									
管状腺腫 (良)	/	/	/	/	0	1	0	0	
のう胞状腺腫 (良)	/	/	/	/	0	2	1	1	
黄体腫 (良)	/	/	/	/	0	1	0	1	

χ^2 検定-申請者, 傾向検定peto法

表 10-3 最終屠殺用動物の腫瘍性病変 (つづき)

検査時期	性別	雄				雌			
	用量群 (ppm)	0	800	2400	7000	0	800	2400	7000
	[検査動物数]	46	42	47	48	37	35	43	38
最終屠殺動物	子宮								
	血管腫 (良)	/	/	/	/	0	0	0	1
	線維腫 (良)	/	/	/	/	0	1	0	0
	平滑筋肉腫 (悪)	/	/	/	/	0	0	1	0
	間質肉腫 (悪)	/	/	/	/	0	0	0	1
	シュワン細胞腫 (良)	/	/	/	/	1	0	0	0
	ポリープ/間質 (良)	/	/	/	/	1	1	2	2
	子宮頸部								
	間質腫瘍 (良)	/	/	/	/	1	0	0	0
	胃								
	腺腫 (良)	0	0	0	0	1	0	0	0
	大腿骨								
	骨腫 (良)	0	0	0	0	0	0	0	1
	血管腫 (良)	0	0	0	0	0	0	1	0
	精巣								
	ライジツヒ細胞腫 (良)	0	1	0	0	/	/	/	/
体腔 ^a									
中皮腫 (良)	1	0	0	0	0	0	0	0	
全動物	[検査動物数]	50	50	50	50	50	50	50	50
	肝臓								
	肝細胞腺腫 (良)	1	3	4	5	2	0	2	4
	肝細胞癌 (悪)	9	3	14	8	1	1	1	1
	血管腫 (良)	0	0	0	0	0	1	1	0
	血管肉腫 (悪)	0	0	0	0	2	0	0	0
	腎臓								
	尿細管細胞癌 (悪)	0	0	0	0	0	0	1	0
	肺								
	気管支腺腫 (良)	4	0	1	0	0	0	0	2
	気管支癌 (悪)	1	2	3	2	1	0	1	0
	膵臓								
	腺腫/島細胞 (良)	1	0	0	0	1	0	0	0
	脾臓								
	血管肉腫 (悪)	1	0	1	1	1	0	2	0
	リンパ節								
血管腫 (良)	0	0	0	0	0	0	2	0	

^a χ^2 検定-申請者, 傾向検定peto法

表 10-4 最終屠殺用動物の腫瘍性病変（つづき）

検査 時期	性別	雄				雌			
	用量群 (ppm)	0	800	2400	7000	0	800	2400	7000
	[検査動物数]	50	50	50	50	50	50	50	50
全 動 物	全身性腫瘍								
	リンパ腫（悪）	5	7	1	1	18	22	13	14
	組織球性肉腫（悪）	0	3	1	0	7	3	3	5
	線維性組織球腫（悪）	1	0	0	0	0	0	0	0
	副腎								
	腺腫/皮質（良）	0	0	0	0	0	0	1	0
	腫瘍/髓質（良）	0	0	0	1	1	0	0	0
	腫瘍/被膜下細胞（良）	1	4	2	2	0	0	1	0
	下垂体								
	腺腫/前葉（良）	0	1	0	1	6	9	5	5
	甲状腺								
	濾胞腺腫（良）	1	0	0	0	0	0	1	0
	濾胞癌（悪）	0	0	0	0	0	0	0	1
	ハーダー氏腺								
	腺腫（良）	2	4	2	2	1	2	0	0
	皮膚その他								
	線維肉腫（悪）	2	2	3	4	0	1	0	2
	顆粒細胞腫瘍（良）	0	0	0	0	0	1	0	0
	乳腺								
	腺癌（悪）	/	/	/	/	0	1	0	1
	卵巢								
	管状腺腫（良）	/	/	/	/	0	1	0	0
	のう胞状腺腫（良）	/	/	/	/	0	2	1	1
	黄体腫（良）	/	/	/	/	0	1	0	1
	子宮								
	血管腫（良）	/	/	/	/	0	0	0	1
	線維腫（良）	/	/	/	/	0	1	0	0
	平滑筋肉腫（悪）	/	/	/	/	0	0	1	0
	間質肉腫（悪）	/	/	/	/	0	0	0	1
	シュワン細胞腫（良）	/	/	/	/	1	0	0	0
ポリープ/間質（良）	/	/	/	/	2	1	2	2	
子宮頸部									
間質腫瘍（良）	/	/	/	/	1	0	0	0	
胃									
腺腫（良）	0	0	0	0	1	0	0	0	

χ^2 検定-申請者，傾向検定peto法

表 10-5 最終屠殺用動物の腫瘍性病変 (つづき)

検査 時期	性別	雄				雌			
	用量群 (ppm)	0	800	2400	7000	0	800	2400	7000
	[検査動物数]	50	50	50	50	50	50	50	50
全 動 物	大腿骨								
	骨腫 (良)	0	0	0	0	0	0	0	1
	血管腫 (良)	0	0	0	0	1	0	1	0
	精巣								
	ライジツヒ細胞腫 (良)	0	1	0	1	/	/	/	/
	胸骨								
	骨腫 (良)	0	0	1	0	0	0	0	0
	体腔 ^{&}								
	中皮腫 (良)	1	0	0	0	0	0	0	0

χ^2 検定-申請者, 傾向検定peto法, &;肉眼的病変が存在した場合のみ検査

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

以上の結果から、本剤のマウスに対する 24 ヶ月間飼料混入投与による発がん性試験における影響として、体重増加の抑制（雄 7000ppm）、飲水量の増加（雌雄 7000ppm）、血中クレアチニン量の増加（雄 7000ppm）、腎臓重量の低下（雄 2400, 7000ppm, 雌 7000ppm）、腎臓の病理組織学的所見として、尿細管の好塩基性化（雌 7000ppm）、慢性腎症（雄 7000ppm）、尿細管上皮の空胞化の抑制（雄 2400, 7000ppm）がみられたことから、無毒性量及び無影響量は雄で 800ppm (247mg/kg 体重/日)、雌で 2400ppm (1050mg/kg 体重/日)であると判断される。

また、催腫瘍性はないものと判断される。

フェンヘキサミドのイヌを用いた飼料混入投与による慢性毒性試験

(毒性資料 原体 23)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 1996年11月12日

検体の純度： %

試験動物： ビーグル犬、1群雌雄各4頭

試験開始時平均体重 6.1~9.4kg (16~21週齢)

試験期間： 1994年9月~1995年9月 (投与期間：1年間)

【試験方法】

検体を0 (対照群)、500、3500及び25000ppmの濃度で飼料に混入し、1年間にわたって摂食させた。

用量設定の根拠：

【試験項目及び結果】

1) 臨床症状及び死亡率

1-1) 臨床症状

臨床症状及び生死を少なくとも1日1回観察した。

25000ppmの雌雄群に軽度な栄養状態の不良がみられたことも含め、毒性学的に関連する影響は認められなかった。

1-2) 死亡率

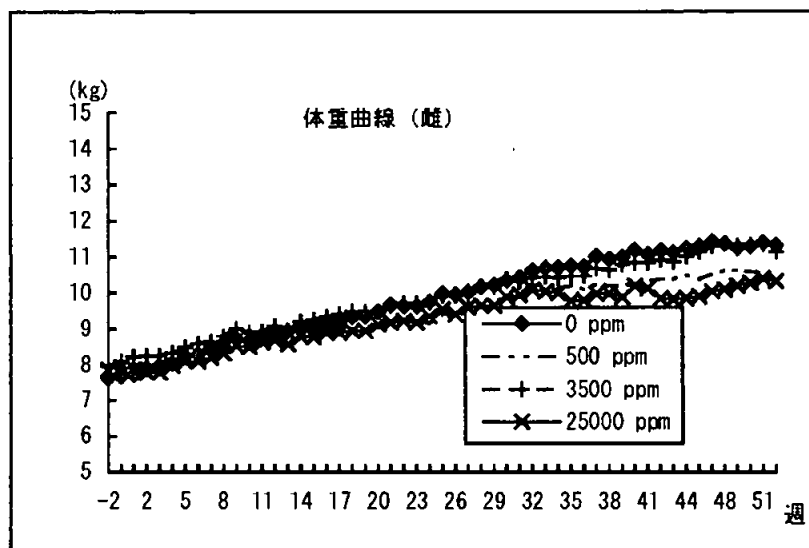
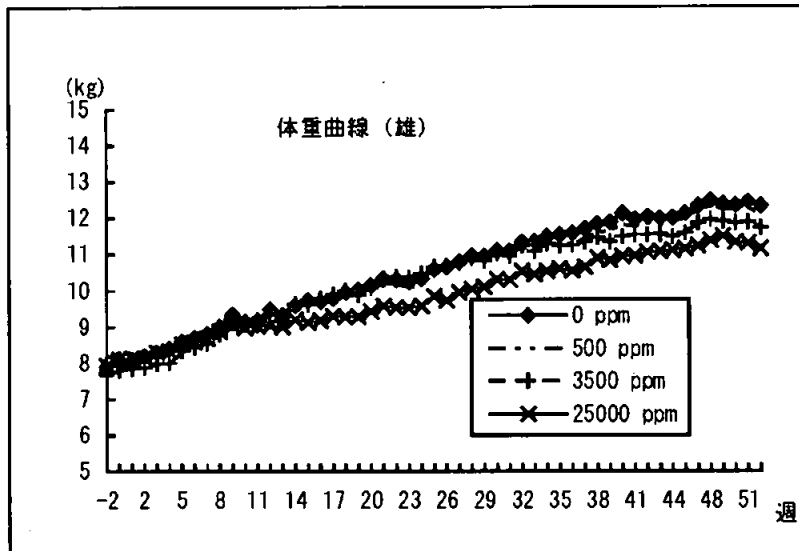
試験期間中動物の死亡は認められなかった。

2) 体重(図1)

体重は、週1回測定した。

25000ppm群の雌雄の体重増加量は、対照群に比較し、わずかな抑制を示した。

図1. 体重曲線



3) 摂餌量及び検体摂取量

摂餌量は、毎日測定した。

25000ppm までの全ての用量群の摂餌量は、対照群と同等であった。

検体摂取量を表 1 に示した。

表 1. 検体摂取量

投与用量 (ppm)		0	500	3500	25000
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	—	17.5	124	918
	雌	—	19.2	132	947

4) 眼科学的検査

眼科学的検査は、全ての動物について試験開始前 (2 週間前)、試験開始 7、13、26、39 及び 52 週時に視診及び間接的方法で行った。また、試験開始前 (2 週間前) と試験 52 週時に眼底検査をした。

25000ppm までの群に、検体投与による所見は認められなかった。

5) 心電図検査及び血圧測定

心電図検査及び血圧測定は、試験開始前 (2 週間前) 及び試験開始 7、13、26、39 及び 52 週時の投与前と投与後 2 時間に行った。

心電図検査では、25000ppm までの群に、検体投与による影響は認められなかった。血圧測定においても、全用量群に検体投与による所見は認められなかった。

6) 臨床検査

6-1) 血液学的検査

血液学的検査は、全ての動物で試験開始前 (2 週間前)、試験開始 7、13、26、39 及び 52 週時に行った。血液試料は、頸静脈より採取し、以下の項目について測定又は算定を行った。

赤血球数、白血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、平均赤血球血色素量 (MCH)、メトヘモグロビン、血小板

数、トロンボプラスチン時間(TPT)、部分トロンボプラスチン時間(PTT)、網状赤血球数、ハインツ小体、赤血球沈降速度(ESR)、白血球百分率

対照群に比較して変動が認められた項目を表2に示した。

表2 血液学的検査

検査週		7週		39週		52週	
用量(ppm)		3500	25000	3500	25000	3500	25000
雄	赤血球数		↓(3)		↓(2)		↓(2)
	ヘマトクリット		↓(2)				↓(2)
	ハインツ小体	↑(4)	↑(4)	↑(3)	↑(2)	↑(2)	
雌	赤血球数		↓(1)		↓(1)		
	ヘモグロビン		↓(1)		↓(1)		
	ヘマトクリット		↓(1)		↓(1)		↓(1)
	ハインツ小体	↑(3)	↑(4)	↑(4)		↑(4)	

↑:わずかに増加, ↓:わずかに減少, ↑:増加, ↓:減少

()内の数値は、変化のみられた動物数を示す。

25000ppm群に赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット値のわずかな減少が認められた。またハインツ小体の増加が、3500及び25000ppmで認められ、検体投与による影響と考えられた。

他の検査項目では、検体投与に起因する変動は認められなかった。

6-2) 血液生化学的検査

血液生化学的検査は、全動物について、試験開始前(3及び2週間前)、試験開始7、13、20、26、39及び52週時に血漿を用いて以下の項目で行った。ただし2週間前の検査は、ASAT、ALAT、Aph及びGLDHについてのみ行った。また電解質は血清を、グルコースは除蛋白した全血をそれぞれ用いた。更に、肝臓試料は、解剖時に肝薬物代謝酵素測定のため採取した。

グルコース、尿素、クレアチニン、アルブミン、総蛋白、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT/GOT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALAT/GPT)、アルカリホスファターゼ(ALP)、乳酸脱水素酵素(LDH)、クレアチンキナーゼ(CK)、ビリルビン(総)、コレステロール、トリグリセリド、γ-グルタミルトランスフェラ

ーゼ(GGT)、グルタミン酸脱水素酵素(GLDH)、鉄、血清電解質：ナトリウム、カリウム、カルシウム、塩素、無機リン及びマグネシウム、甲状腺のパラメーター：チロキシン(T4)、トリヨードチロニン(T3)、及びチロキシン結合能(TBC)、肝臓組織のパラメーター：N-デメチラーゼ、O-デメチラーゼ、チトクロム P450 及びトリグリセリド、チトクロム P450 依存モノオキシゲナーゼ (ECOD, EROD, ALD)、エポキシドヒドラーゼ(EH)及び抱合酵素(GS-T, GLU-T)

変動の認められた項目のアルカリホスファターゼ(ALP)活性を表3に、薬物代謝酵素活性の変動を表4にそれぞれ示した。

アルカリホスファターゼ活性の上昇が、3500ppmの雌群及び25000ppmの雌雄群にそれぞれ認められ、検体投与の影響と考えられた。

薬物代謝酵素の変動では、雄の500ppm群にGS-Tの上昇(78nmol/g/min)や3500ppm群にALDの低下(12.1nmol/g/min)がみられたが、25000ppm群では何ら有意な変動は認められなかった。また雌の500ppm群にALDの低下(10.1nmol/g/min)、3500ppm群にEROD(1.96nmol/g/min)、GS-T(76nmol/g/min)などの上昇、そして25000ppm群にGS-T(86nmol/g/min)の上昇がそれぞれ認められた。これらの有意な変動のうち、雌の3500ppm以上のGS-Tで用量に相関した上昇がみられ、検体の影響が考えられた。しかし、他の項目では、用量相関性がなく、検体に関連した影響とは考えられなかった。

表3 アルカリホスファターゼ活性値の変動

検査週 用量(ppm)		7週	13週	20週	39週	57週
雄	3500					
	25000	↑(1)	↑(1)	↑(1)	↑(1)	↑(1)
雌	3500			↑(1)	↑(1)	↑(1)
	25000	↑(1)	↑(2)	↑(1)	↑(3)	↑(3)

↑；わずかに上昇，↑；上昇，（ ）内の数値は、動物数を示す。

表 4 肝薬物代謝酵素活性 (有意差を認めた項目)

検査項目	ECOD	EROD	ALD	EH	GS-T	GLU-T
雄	500		↓ 82		↑ 122	
	3500	↓ 56	↓ 80			
	25000					
雌	500		↓ 74			
	3500		↑ 200		↑ 153	↑ 133
	25000				↑ 151	↑ 126

↑ ↓ ; P<0.05 ↑ ; P<0.01 (t 検定) , 表中の数値は対照群に対する変動率 (%)

6-3) 尿検査

尿検査は、全ての動物で試験開始前(2週間前)、試験開始 7、13、20、26、39 及び 52 週時に、約 6 時間の蓄尿を用い、以下の項目について調べた。

尿量、比重、pH、蛋白、グルコース、潜血、ビリルビン、ケトン体、ウロビリノーゲン、クレアチニン、ナトリウム量、尿沈渣

半定性的、定量的及び沈渣の検査結果に、検体投与に起因する影響は、認められなかった。

7) 剖検及び臓器重量

投与終了時に、全動物について剖検を行い、以下の臓器の重量を測定し、それらの体重比重量を算出した。

脳、心臓、肝臓、肺、脾臓、腎臓、副腎、膵臓、甲状腺、下垂体、精巣/卵巣、前立腺、子宮、胸腺

7-1) 剖検

25000ppm 群の雌雄各 1 例に、わずかにやせた動物が認められたが、毒性学的に意味のない変化と考えられた。他の群に、検体投与に関連した剖検所見は認められなかった。

7-2) 臓器重量

副腎の体重比重量の増加(27%)が25000ppm群の雌で認められ、この増加は検体投与によるものと考えられた。

他の群に、投与に起因した変動は認められなかった。

8) 病理組織学的検査 (表4)

投与終了時に各群の全動物について以下の臓器を組織学的に検査した。

副腎、大動脈、骨髄、骨(大腿骨、肋骨、胸骨)、精巣上体、食道、眼、胆のう、心臓、腸(十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸)、腎臓、肝臓、肺、乳腺部、リンパ節(腸間膜、咽頭後方)、視神経、卵巣、膵臓、上皮小体、下垂体、前立腺、坐骨神経、骨格筋、皮膚、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、気管、膀胱、子宮、関節(大腿頸骨)、脳(大脳、小脳、脳幹)、脊髄(頸部、胸部、腰部)、喉頭、鼻咽頭、唾液腺及びその他の異常を認めた組織

25000ppmの雌に副腎皮質内帯の細胞質内空胞が3例に認められた。その程度は、中程度であり、副腎体重比重量の増加を伴っていることから、検体投与による変化と考えられたが、この所見の発生機序は明らかではない。一方、3500ppm群以下の雌にも同所見がみられたが、副腎重量の変化を伴わず、また下表に示すようにその程度は対照群と同等であるため、検体による変化とはみなさなかつた。

他の全ての所見は、自然発生的な変化で、毒性学的な関連性は認められなかった。

副腎皮質内帯の細胞質内空胞の頻度

用量(ppm)	0	500	3500	25000
検査動物数	4	4	4	4
程 度	軽微	1	1	0
	軽度	1	0	2
	中程度	0	0	0
	重度	0	0	0
総数	2	1	3	3

表4 主要な病理組織学的所見

臓器 所見 (ppm)	雄				雌			
	0	500	3500	25000	0	500	3500	25000
【検査動物数】	4	4	4	4	4	4	4	4
副腎								
炎症	0	0	0	1	0	0	0	0
萎縮	0	0	0	2	0	1	0	0
皮質内帯空胞化	0	0	0	1	2	1	3	3
心臓								
炎症	0	0	0	0	0	0	0	1
腎臓								
のう胞/髄質	0	0	0	0	1	0	0	1
炎症	1	1	0	0	0	0	1	1
肝臓								
壊死	0	0	0	0	0	0	0	1
うっ血	0	0	0	0	1	0	0	0
褐色色素	0	0	0	1	0	0	0	1
シデロース	4	2	2	2	3	2	4	3
空胞化	3	3	3	0	0	1	3	2
脂肪化	1	1	1	0	1	0	0	0
肺								
炎症	0	2	1	2	0	3	0	1
気腫	1	1	1	0	0	1	0	0
胸腺								
のう胞	1	0	0	1	1	0	2	0
下垂体								
のう胞	0	0	0	1	0	0	0	0
炎症	1	0	0	0	0	1	2	0
皮膚								
炎症	1	0	0	0	0	1	1	1
出血	0	0	0	0	0	1	0	0
脾臓								
うっ血	1	0	1	0	1	0	2	1
シデロース	3	1	3	1	2	2	1	1
甲状腺								
のう胞	0	0	0	1	0	1	0	0
C-細胞集簇	3	2	1	2	3	0	2	1
舌								
円形細胞浸潤	4	2	4	2	0	0	1	1
扁桃								
炎症	0	0	0	1	0	0	0	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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

以上の結果から、本剤のイヌに対する 12 ヶ月飼料混入投与による慢性毒性試験における影響として、増体重抑制(雌雄 25000ppm 群)、血液学的所見(雌雄 25000ppm 群の赤血球数の減少、雌雄 3500ppm 以上の群のハイツ小体の増加など)、血液生化学的所見(雄 25000ppm、雌 3500ppm 以上の群の ALP 活性及び雌 3500ppm 以上の群の GS-T の上昇)、副腎体重比重量の増加(雌 25000ppm 群)、病理組織学的所見(雌 25000ppm 群での副腎皮質内帯空胞の出現)などがみられたことから、無毒性量及び無影響量は 500ppm (雄 : 17.5mg/kg 体重/日、雌 : 19.2mg/kg 体重/日) であると判断される。

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

(12) 繁殖毒性および催奇形性

フェンヘキサミドの繁殖性に及ぼす影響

(毒性資料 原体 24)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：1996年9月30日

- 検体の純度： %
- 試験動物： SD系雌雄ラット，1群雌雄各30匹，投与開始時7週齢
- 世代数： 2世代，第一産児で継代
- 試験期間： 1994年9月～1995年6月
- 投与期間： P世代；投与開始からF₁児離乳時までの約19週間（交配前10週間）
F₁世代：離乳時からF₂児離乳時までの約19週間（交配前10週間）

【投与方法】

検体をラット用標準飼料に0、100、500、5000及び20000ppmの濃度に添加し動物に自由に摂取させた。

【方法及び試験項目】

概要を次頁の表にまとめた。

世代	期間(週間)	作業手順	試験項目
P	生育(10週間) (交配前)		一般状態の観察(毎日) 体重及び摂餌量の測定(週1回) 性周期の判定 生化学検査(雌雄各10匹)
	交配 (最長3週間)	雌雄1対1で交配。 交配は膈栓の存在/膈垢中の精子の確認(妊娠0)	交尾率の算定 交配終了時雄親動物の剖検, 生化学検査, 病理組織学的検査, 臓器重量(腎, 肝, 性腺)
	妊娠(3週間)		<u>雌親動物</u> 体重測定(妊娠0, 6, 13, 20日) 摂餌量測定(週1回)
	出産……………		<u>出産状況の観察</u> 妊娠期間, 妊娠率, 出産率, 新生児数, 死亡児数, 同腹児数, 性比の算定, 新生児の外表及び症状観察
	哺育(3週間)	出産後4日目各同腹児数を雄4匹、雌4匹に調整	<u>雌親動物</u> 体重測定(出産0, 4, 7, 14, 21日) 摂餌量測定(第1週目週2回, 第2週、3週目週1回) <u>新生児</u> 体重測定(出産0, 4, 7, 14, 21日) 新生児の外表及び症状観察, 出産後4日目に淘汰された新生児の異常変化
……………	離乳……………	継代用の各群雌雄30匹ずつ30腹から無作為に選抜	親については病理組織学的検査, 臓器重量測定(腎, 肝, 性腺), 生化学検査(雌雄各10匹) 離乳時、継代用以外の児動物について剖検
F ₁	生育(10週間) 交配 (最長3週間) 妊娠(3週間) 出産…………… 哺育(3週間) …………… 離乳……………	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
F ₂	生育(3週間)		(F ₁ 世代に準ずる)

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

一般観察及び死亡率；試験期間中、毎日観察した。

体重及び摂餌量；P及びF₁世代親動物

交配前期間—週1回

妊娠期間—体重0, 6, 13, 20日, 摂餌量週1回

哺育期間—体重0, 4, 7, 14, 21日

摂餌量第1週目—週2回, 第2, 3週目—週1回

新生児体重

体重測定(出産0, 4, 7, 14, 21日)

交尾の確認；交配前にまず膣スメアを顕微鏡下で観察し、発情期を確かめ、雌雄1対1で同居させ、翌日膣栓あるいは精子を確認することによって交尾の確認を行った(妊娠0日)。

繁殖性に関する指標；次の指標を算出した。

$$\text{交尾率 (\%)} = \frac{\text{精子が確認された雌動物数}^{\text{a)}}}{\text{雄と同居させた雌動物数}} \times 100$$

$$\text{妊娠率 (\%)} = \frac{\text{妊娠した雌動物数}^{\text{b)}}}{\text{精子が確認された雌動物数}} \times 100$$

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

$$\text{出生率 (\%)} = \frac{\text{1腹当たりの産児総数}}{\text{1腹当たりの着床痕総数}} \times 100$$

$$\text{生存産児率 (\%)} = \frac{\text{1腹当たりの生存新生児数}}{\text{1腹当たりの産児総数}} \times 100$$

$$\text{新生児生存率 (\%)} = \frac{\text{4日目の調整前の1腹当たりの生存新生児数}}{\text{1腹当たりの生存産児数}} \times 100$$

$$\text{哺育率 (\%)} = \frac{\text{21日における1腹当たりの生存新生児数}}{\text{4日目の調整後の生存産児数}} \times 100$$

a); 精子が確認されずに、妊娠した雌を含む,

b); 出産又は着床痕を有する雌を含む

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

血液生化学的検査；

性及び群毎にP及びF₁世代親動物 10 匹について、交配前期間 9 週あるいは 10 週と屠殺前に眼窩から血液を採取して以下の項目について測定した。

P 及び F₁ 世代

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ，アラニンアミノトランスフェラーゼ，総ビリルビン，総蛋白，アルブミン，グロブリン，尿素窒素，クレアチニン

P 世代（交配前期間のみ）

ナトリウム，カリウム，クロリド，糖，尿酸，トリグリセリド，コレステロール，クレアチンホスホキナーゼ，乳酸脱水素酵素，γ-グルタミルトランスぺプチダーゼ，無機リン，カルシウム

剖検及び臓器重量；全ての親動物、出産中に死亡した母動物から生まれた新生児を除く全ての新生児（4 日後選抜時、21 日離乳時）について剖検した。

親動物について、肝臓、腎臓、精巣及び卵巣重量を解剖時に測定し、最終体重から体重比重量も求めた。

病理組織学的検査；全ての親動物について以下の組織を採取し、10%緩衝ホルマリン溶液中に固定した。

身体標識部位，子宮頸部，精巣上体，肉眼病変部；肝臓，腎臓，下垂体，前立腺，精囊／凝固腺，子宮，膈

以下の組織はブアン液で固定した。

精巣，卵巣

【結果】

概要を報告の最終頁に示した。

1) 親動物の観察

一般観察

試験期間中、検体投与に起因した中毒症状は、いずれの世代においても認められなかった。また、P 世代の 5000ppm 群雌（出産中）と 20000ppm 群雌（盲腸のねじれ）各 1 例及び F₁ 世代の 100ppm 群雌（出産中）と 5000ppm 群雌（死因不明）各 1 例が死亡し、更に P 世代の 100ppm 群雄 1 例と 500ppm と 5000ppm 群雌各 1 例が切迫屠殺されたが、いずれも検体投与に起因するものではなかった。

体重

交配前期間

統計学的に有意な体重減少がP及びF₁世代 20000ppm群雌雄 (P/雄;7~15%, 雌; 6~10%, F₁/雄;6~16%, 雌; 8~10%) とP世代 5000ppm群雌 (最高; 4~5%) で認められ、検体に関連した変化と考えられた。

妊娠期間

統計学的に有意で検体の影響による体重増加の抑制が、P及びF₁世代の 20000ppm群 (P/7~8%, F₁/7~9%) で認められた。

哺育期間

統計学的に有意な体重増加の抑制がP及びF₁世代 20000ppm群 (P/8~12%, F₁/7~11%) とP世代 5000ppm群 (5%) で認められ、検体に関連した変化と考えられた。

摂餌量

交配前期間

統計学的に有意な増加がP世代雄及びF₁世代雌雄の 20000ppm群 (P/12~16%, F₁/雄;12~21%, 雌 5~11%) で認められ、検体に関連した変化と考えられた。

妊娠期間

検体に起因するような摂餌量への影響は認められなかった。

哺育期間

検体に起因するような摂餌量への影響は認められなかった。

繁殖能

P世代及びF₁世代において性周期、交配期間、交尾率、妊娠率、出産率、妊娠期間、着床数、出生率について、検体による影響は認められなかった。

2) 新生児の観察

一般観察

新生児の検体に関連した臨床症状は認められなかった。

次世代の親となるべきF₁新生児を離乳後から最終選抜時まで飼育した新生児の死亡数は、20000ppm群において対照群に比べ、増加した (下表参照)。この20000ppm群における死亡数の増加は、哺育時に小さかったこと (発育不全) によると考えられた。

群 (ppm)	死亡児数 / 総離乳児数
0	0 / 66
100	2 / 68
500	0 / 68
5000	0 / 68
20000	10 / 78

性比

新生児の性比において、検体に関連した影響は認められなかった。

同腹児数

P世代 20000ppm群において、対照群に比べ有意な減少が認められたが（対照群；13/20000ppm群；11）、F₁世代においては減少が認められず、また着床数や出生率に両世代とも差が認められていないため、本検体の影響とは考えられなかった。

従って同腹児数において、検体に関連した影響は認められなかった。

生存産児率

検体に関連した影響は認められなかった。

新生児生存率

検体に関連した影響は認められなかった。

新生児体重

出産時体重

出産時の新生児体重において、F₂児の 500 及び 5000ppm群で統計学的に有意な減少が認められたが、以下の理由により検体に関連した変化とはみなさなかった。

□ F₁児の出産時において、対照群と検体投与群の間に差がみられていない。

□ F₂児の出産時体重に用量に関連した差が認められなかった。

□ F₂児の出産時体重は、背景データ内(6.1~7.2g)にあった。

□ 検体の 100 から 20000ppm の用量で行われた用量設定予備試験において、出産時体重に差がみられなかった。

□ 検体の 1000mg/kg 体重/日によるラットの催奇形性試験において、生存胎児体重に影響が認められなかった。本繁殖性試験の妊娠期間中の検体摂取量は、0、8.4、40.2、437、1867mg/kg 体重/日に相当した。

4日~21日体重

7日から 21 日目までに 5000 及び 20000ppm の用量で新生児体重の減少が統計学的に有意に認められ、これは検体による影響と考えられた。

有意差のみられた対照群からの減少割合

用量 (ppm)	哺育期間	F ₁ 児 (%)	F ₂ 児 (%)
20000	7 日	15	11
	14 日	25	12
	21 日	30	19
5000	7 日	-	10
	14 日	6	9
	21 日	11	11

ANOVA-Dunnett's test

上記に示した 7 から 21 日まで認められた低体重は、検体に対するラットの素因によるものと考えられた。すなわち、検体は最初に肝臓で UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ (UDP-GT) によるグルクロン酸抱合による代謝をうける。一般的にラットにおける UDP-GT の体内合成において、UDP-GT は出産 1 日前にかなり高い値を示し (胎児期)、更に哺育期間 4 日まで増加する。その後 7 日から 21 日において、UDP-GT 活性の顕著な減少が認められ、28 日に 4 日目の値までもどり、56 日目に親のレベルまで増加することが知られている。このように、7 日から 21 日の間にグルクロン酸抱合能力が飽和状態になったため、高用量で一般毒性を示したものと結論された。従って、この新生児の体重減少は、新生児における最大耐量 (MTD) を越える量で起こったもので、この所見は重要な新生児毒性を示すものではないと考えられた。

3) 生化学検査

尿素窒素が最終採血時 (新生児の離乳時) に両世代 20000ppm 群の雌ラットで増加した。このなかで尿素窒素において有意差が認められたのは、F₁ 世代雌の最終測定時のみであった。クレアチニンについては、20000ppm 群では、P 世代雄群両測定時と F₁ 世代雌最終測定時に、5000ppm 群では P 世代雄の交配前期間に有意な増加がみられた。これらの変化が、本検体の腎臓への直接作用によるものか、脱水や高蛋白/窒素代謝による二次的な変化であるかは不明であった。

アルカリホスファターゼは、F₁ 世代の 5000 及び 20000ppm 群の雌で、交配前及び最終測定時に有意に増加した。γ-グルタミルトランスペプチターゼは、交配前期間の P 世代雌雄で有意に増加した。アルカリホスファターゼ及び γ-グルタミルトランスペプチターゼの変化は、検体に起因した変化と考えられた。

生化学検査 (有意差のみられた所見)

世代		雄				雌			
		100	500	5000	20000	100	500	5000	20000
尿素窒素									
F ₁	最終								↑ 155
クレアチニン									
P	交配前			↑ 120	↑ 120				
	最終				↑ 120				
F ₁	最終								↑ 117
アルカリホスファターゼ									
F ₁	交配前							↑ 143	↑ 156
	最終							↑ 163 [#]	↑ 187 [#]
γ-グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT)									
P	交配前				↑ 4			↑ 300 [#]	↑ 400 [#]

↑; P<0.05 (ANOVA+Dunnetts test)

↑[#]; P<0.05 (Kruskal-Wallis ANOVA+Mann-Whitney U-test)

表中の数値は対照群に対する変動率(%) (但し、雄の GGT については、対照群の値が 0U/L のため実測値を記載)

4) 新生児の剖検

4日淘汰新生児及び21日離乳児について剖検した結果、検体に起因した所見は認められなかった。

5) 親動物の剖検及び臓器重量

剖検の結果、両世代共に検体に起因した肉眼的変化は認められなかった。

最終体重と臓器重量を全ての親動物について測定した結果、20000ppm群のP世代雌雄及びF₁世代雌で最終体重の減少が有意に認められた。同群F₁世代雄においても最終体重の減少が認められたが、この変化は、統計学的に有意な差ではなかった。臓器重量については、肝臓で検体に関連した影響がみられた。P世代では雄20000ppm及び5000ppm群で、肝臓実重量及び体重比重量の有意な減少が認められた。一方、雌20000ppm群で肝臓実重量の有意な減少が認められたが、これは最終体重の減少に伴った変化と推察された。F₁世代では雄5000ppm群で肝臓実重量の有意な減少が認められたが、雄20000ppm群では認められなかった。P世代の雄500及び100ppm群で肝臓体重比重量の有意な減少が認められたが、F₁世代では、これらの用量において変化は認められず、また、他のラットの亜急性及び慢性毒性試験においても、検体に関連した肝臓重量の減少は認められていなかったため、本検体の影響とはみなさなかった。しかし、雄の20000ppm及び5000ppmでみられた肝臓重量の減少は、生化学検査結果などを考え合わせると、検体の肝臓への影響であることが疑われた。

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

腎臓への影響は、P世代の20000ppm群の雌、F₁世代の5000ppm及び20000ppm群の雄で実重量と体重比重量の減少で示唆された。F₁世代の20000ppm群の雌では実重量の減少が認められたが、体重比重量の減少が伴っていなかった。これらの変化と臨床検査で得られた所見を考え合わせると、原因は不明であるが、検体の腎臓に対する影響が示唆された。

このほか、精巣体重比重量の増加及び卵巣実重量の有意な減少が認められたが、これらの変化は、それぞれ実重量（精巣）及び体重比重量（卵巣）で、共に同様な変動が認められていないことから、本検体の影響とは考えられなかった。

以上のことから、5000及び20000ppmで認められた肝臓及び腎臓重量の変動を本検体の影響としてとらえた。

有意差の認められた臓器重量

項目	性別	雄				雌			
		用量(ppm)	100	500	5000	20000	100	500	5000
[P世代]									
最終体重					↓ 92				↓ 87
肝臓	実重量			↓ 81	↓ 89				↓ 85
	体重比重量	↓ 92*	↓ 95*	↓ 92*	↓ 89*				
腎臓	実重量								↓ 81
	体重比重量								↓ 93
精巣	体重比重量				↑ 109				
卵巣	実重量							↓ 85	↓ 85
[F₁世代]									
最終体重									↓ 90
肝臓	実重量			↓ 88					
腎臓	実重量			↓ 88	↓ 87				↓ 85
	体重比重量			↓ 92	↓ 92				
卵巣	実重量								↓ 80

↑ ↓ ; P<0.05 (Anova+Dunnetts tests, Kruskal-Wallis Anova+Mann-Whitney u-tests*)
表中の数値は対照群に対する変動率(%)

6) 病理組織学的検査

検体に起因した組織学的所見は、両世代共に認められなかった。また発生頻度において、対照群と比べ有意差のない自然発生病変と考えられるいくつかの所見が各臓器で散見された。これらの所見について以下に示す。

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

主な病理組織学的所見とその頻度

所見	雄					雌				
	0	100	500	5000	20000	0	100	500	5000	20000
[P世代]										
腎臓／										
慢性腎症	2	3	2	4	1	0	0	0	0	0
尿細管再生	4	3	4	3	6	0	0	0	0	0
尿細管拡張	7	7	6	5	5	0	2	0	2	3
腎盂拡張	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
肝臓／										
慢性炎症	7	4	8	3	4	4	4	2	0	2
細胞質空胞化	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0
下垂体／のう胞	2	5	5	4	5	1	2	1	3	2
前立腺／										
慢性炎症	0	2	0	1	1	-	-	-	-	-
子宮／拡張	-	-	-	-	-	3	1	4	1	2
唾液腺／										
周囲部浮腫	6	0	0	2	0	0	0	0	0	0
[F ₁ 世代]										
腎臓／										
慢性腎症	9	5	7	3	4	0	0	0	1	0
尿細管再生	7	7	7	14	5	1	1	3	1	0
尿細管拡張	8	8	11	10	6	5	7	3	5	7
腎盂拡張	1	2	1	4	1	1	0	2	1	2
肝臓／										
慢性炎症	11	4	4	9	10	7	4	3	3	5
細胞質空胞化	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
下垂体／のう胞	3	2	5	3	5	2	1	3	5	3
前立腺／										
慢性炎症	7	9	7	11	7	-	-	-	-	-
子宮／拡張	-	-	-	-	-	3	5	3	3	0
唾液腺／										
周囲部浮腫	2	1	3	2	1	1	0	0	0	0

χ^2 検定-申請者

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

以上の結果より、2世代にわたって本剤を飼料中に混入して投与した場合、親動物では、5000及び20000ppm群において、親動物雄あるいは雌の交配前の体重が低下、20000ppm群において、妊娠時の体重が低下、5000及び20000ppm群において、哺育時体重の減少、そして肝、腎を指標とした臨床化学検査項目、最終体重及び臓器重量が5000及び/あるいは20000ppm群で統計学的有意差がみられ、新生児では、5000及び20000ppm群で体重減少が認められた。繁殖能に対しては何ら影響がみられなかった。

従って、無毒性量及び無影響量は、親動物及び児動物に対しては、500ppm(雄; 37.2mg/kg体重/日, 雌; 44.2mg/kg体重/日)、繁殖性に対しては20000ppm(雄; 1768mg/kg体重/日, 雌; 2025mg/kg体重/日)と判断される。

このように、本検体は、親動物に対する毒性量で新生児毒性を示した。更にこの新生児毒性は、用量が新生児に対しMTDを越える量であることに起因したものと推察された。

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

試験結果

世代	親 : P, 児 : F ₁					親 : F ₁ , 児 : F ₂				
	0	100	500	5000	20000	0	100	500	5000	20000
投与用量 (ppm)	0	100	500	5000	20000	0	100	500	5000	20000
検体摂取量 [#] ♂	-	7.8	39.1	412	1770	-	7.4	37.2	400	1860
(mg/kg体重/日) ♀	-	9.1	45.4	488	2030	-	8.8	44.2	466	2060
動物数 ♂	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
♀	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
死亡 (屠殺動物) ♂		(1)								
♀			(1)	1(1)	1		1		1	
一般観察										
体重 ♂					↓					↓
♀				↓	↓					↓
摂餌量 ♂					↑					↑
♀										↑
性周期										
交尾率 (%)	100 (30/30)	100 (30/30)	96.7 (29/30)	100 (29/29)	96.7 (29/30)	100 (30/30)	96.7 (29/30)	100 (30/30)	100 (30/30)	100 (30/30)
妊娠率 (%)	100 (30/30)	100 (30/30)	93.1 (27/29)	96.6 (28/29)	89.7 (26/29)	96.7 (29/30)	93.1 (27/29)	86.7 (26/30)	93.3 (28/30)	96.7 (29/30)
出産率 (%)	96.7 (29/30)	100 (30/30)	100 (27/27)	96.4 (27/28)	100 (26/29)	96.6 (28/29)	92.6 (25/27)	100 (26/26)	96.4 (27/28)	96.6 (28/29)
妊娠期間 (日)	21.8	22.1	21.9	22.0	21.9	22.1	22.0	22.0	22.1	21.9
剖検										
臓器重量	実	比	実	比	実	比	実	比	実	比
肝臓 ♂				↓		↓				
♀						↓				
腎臓 ♂									↓	↓
♀									↓	↓
精巣 ♂										↑
卵巣 ♀					↓					↓
病理組織所見										
新生児数 (出生時)	356	378	299	312	278	342	309	293	319	304
死亡児数 (出生時)	6	8	20	6	8	8	8	7	10	8
平均同腹児数 (出生時)	12.5	12.9	11.8	11.8	11.0	12.5	12.7	11.5	12.2	11.1
出生率 (%)	88.5	93.1	91.4	90.0	89.9	87.0	90.3	88.7	89.0	86.9
生存産児率 (%)	98.4	97.9	93.9	98.1	97.4	97.6	96.5	97.5	97.5	98.9
新生児生存率 (%)	97.3	98.3	99.3	99.4	98.3	99.8	96.0	98.9	96.2	95.3
哺育率 (%)	99.6	99.6	98.5	99.5	98.4	98.8	99.0	96.2	100.0	94.9
性別 (%) 雄	49.4	50.8	50.0	45.9	50.3	54.2	47.8	47.2	45.0	49.0
哺育児体重										
0日	6.6	6.6	6.5	6.5	6.4	6.7	6.7	6.4*	6.2*	6.5
4日 (選抜前)	9.7	9.5	9.4	9.5	9.0	9.8	9.9	9.4	9.0	9.3
4日 (選抜後)	9.7	9.5	9.4	9.8	9.0	9.8	9.9	9.4	9.0	9.3
7日	14.9	14.4	14.2	14.3	12.6**	15.6	15.9	15.0	14.0*	13.9**
14日	28.0	26.5	26.8	26.2*	21.1**	30.2	30.2	28.6	27.5*	26.5**
21日	43.8	42.6	42.0	39.0**	30.7**	47.7	47.9	46.0	42.4**	38.8**
剖検 ♂♀										

#: 交配前期間の平均摂取量, *: P<0.05, **: P<0.01 (Dunnett's test), ↑ ↓ : P<0.05 (ANOVA+Dunnett's 検定)

フェンヘキサミドのSD系ラットを用いた催奇形性試験

(毒性資料 原体 25)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日： 1994年11月30日

検体の純度 : %
試験動物 : SD系ラット 1群交尾雌 30匹
(試験開始時雌 12週齢)
試験期間 : 1993年11月～12月
投与期間；10日間(妊娠6～15日)

【試験方法】：

検体を、0.4%Tween80添加の0.5%カルボキシメチルセルロース(CMC)水溶液に懸濁し、動物に10ml/kg体重の容量で0(対照群)、1000mg/kg体重の投与量を、妊娠6日目から15日目までの10日間毎日1回経口投与した。無処理の雌雄各1匹のラットを終夜同居させ、翌朝膈垢中の精子について検査した。精子が認められた雌は、無作為に対照群と投与群に配分された。交尾が確認された日を妊娠0日とし、妊娠20日目に動物を屠殺し、検査した。

投与用量設定の理由：

試験項目：

妊娠動物：

妊娠動物について、交配後から屠殺までの間、一般症状を毎日観察した。体重を妊娠0日、6～16日までの毎日及び妊娠20日に測定し、摂餌量を妊娠0～6、6～11、11～16、16～20日に測定した。

屠殺時には、内臓の肉眼的検査、黄体数、着床数、吸収胚数・死亡胎児数、生存胎児数及び胎盤重量について検査した。

生存胎児：

摘出時に、生存胎児については性別、体重、外表奇形を観察し、その後各腹あたり各々約半数の胎児をブアン液と70%エタノール液に固定した。前者はWILSON法により内臓検査を実施し、後者はアリザリンレッドSで染色後骨格検査に供した。

【試験結果】

試験結果の概要については、次頁の表に示した。

妊娠動物の臨床所見は、いずれの時期にも、いずれの動物にも観察されなかった。妊娠動物の体重増加についても対照群と投与群との間に有意な差は認められなかった。

摂餌量において、1000mg/kg 体重群の妊娠 6～11 日に減少が、妊娠 16～20 日に増加が認められた。減少がみられた上記の期間の対照群と 1000mg/kg 体重群の摂餌量の範囲は、それぞれ 64.6～127.9mg/kg 体重/日と 54.3～123.4mg/kg 体重/日であり、この 2 群間の相対摂餌量に約 10%の差がみられた。しかし、この差は 0～6 日の 9%、11～16 日の 6%、16～20 日の 10%と同等であった。これらのことから、この減少は検体投与に関連しないものと考えられた。

剖検において投与に関連した内臓所見は認められなかった。

肝臓と甲状腺の重量には対照群と 1000mg/kg 体重群で有意な差はみられなかった。子宮重量については、1000mg/kg 体重群 (77.2g) で対照群 (89.5g) よりも有意な低値であった。しかし、1000mg/kg 体重群の 1 匹の子宮重量 (5.4g) が低値であったことが有意な減少となったと考えられ、この数値を除外して再計算すると、有意差はなくなった。この 1 匹の子宮重量の低値は、同腹児数が少なかったことによるものであった。

繁殖指数 (交尾率、受胎率、妊娠率) には検体による影響は認められなかった。

黄体数、着床数、着床前死胚率、着床後死胚率、吸収胚数、同腹児数、性比、胎児体重、胎盤重量には対照群と 1000mg/kg 体重群で有意な差は認められなかった。

外表奇形として「ドーム型頭」と眼瞼開裂が 1000mg/kg 体重で 1 母動物からそれぞれ 16 胎児と 15 胎児で認められたが、母動物による偏りをもって出現していることから、検体に起因したものとは考えられなかった。

骨格検査では、奇形は全く認められなかった。骨格変異は「化骨遅延 (全身の骨格)」が 1000mg/kg 体重群で有意に増加した。しかし、1 母動物から 9 例でこの所見がみられているが、同時にこの同腹児の体重の平均値が 0.9g (対照群の平均値は 3.7g) という低発育であったことから、検体に起因したものとは考えられなかった。

内臓検査では奇形として、脳奇形は 1000mg/kg 体重群で、脳室拡張は対照群と 1000mg/kg 体重群で認められたが、統計的に有意な増加ではなかった。変異の所見にも検体の投与に起因した増加は認められなかった。

以上の結果より、本剤を妊娠ラットに投与したときの母体及び胎児における無毒性量及び無影響量は、1000mg/kg 体重/日であり、妊娠動物に対する毒性及び胎児に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。

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

投与量 mg/kg 体重		0	1000	
交尾動物数		30	30	
受胎動物数		27	22	
妊娠維持動物数		26(1)	22	
母動物	一般症状			
	死亡			
	出産	1	0	
	体重			
	摂餌量		妊娠 6-11 ↓	
	剖検所見			
	子宮重量(g)	89.5	77.2 ↓	
	着床	黄体数 ★	17.8	16.7
		着床数 ★	17.0	15.3
	床	着床前死胚 ★	0.9	1.4
		着床後死胚 ★	1.0	1.4
	所見	吸収胚数 ★	1.0	1.4
		死亡胎児数	0	0
		生存胎児数 ★	16.0	14.0
雌/雄		191/226	145/162	
	生存胎児体重(g)	3.7	3.7	
胎児	胎盤重量(g)	0.52	0.54	
	外表奇形 / ドーム型頭		0	16** [1]
		眼瞼開裂	0	15** [1]
		無眼球症	1 [1]	0
	骨格検査胎児数	215	160	
	奇形 / 肋骨癒合		0	1
		変異 / 波状肋骨	15 [8]	5 [5]
		肋骨 / 痕跡	7 [2]	2 [1]
		過剰肋骨	1 [1]	0
	化骨遅延 / 腰椎弓化骨遅延		1 [1]	1 [1]
		座骨化骨遅延	6 [3]	2 [2]
		仙椎弓未骨化	1 [1]	0
		仙椎弓化骨遅延	143 [25]	91 [20]
		尾椎弓未骨化	21 [12]	6* [5]
		尾椎弓化骨遅延	186 [26]	137 [20]
		中手骨未骨化	12 [9]	5 [4]
		中足骨未骨化	1 [1]	1 [1]
		中手骨化骨遅延	118 [25]	66* [15]
		中足骨化骨遅延	2 [2]	1 [1]
		第5胸骨未骨化	48 [17]	37 [16]
		第5胸骨化骨遅延	162 [26]	111 [20]
		化骨遅延 (全身の骨格)	0	9* [1]
	内臓検査胎児数	202	147	
	奇形 / 脳奇形		0	2 [1]
		脳室拡張	4 [3]	5 [1]
	変異 / 動脈の左側		5 [4]	2 [2]
		腎盂拡張	1 [1]	0
	尿管	1 [1]	1 [1]	

* : P<0.05 ** : P<0.01 [フィッシャー検定] ↓ : P<0.05 [ANOVA+t-検定]

★ : 1匹の妊娠動物あたり 空欄 : 異常なし () ; 出産した雌 [] : 母動物数

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

フェンヘキサミドのSD系ラットを用いた催奇形性試験の追加試験

(毒性資料 原体 26)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日： 1998年7月21日

検体の純度 : %
試験動物 : SD系ラット 1群交尾雌 30匹
(試験開始時雌 15週齢)
試験期間 : 1998年4月～7月
投与期間；10日間(妊娠6～15日)

【試験方法】：

検体を、0.4%Tween80添加の0.5%カルボキシメチルセルロース(CMC)水溶液に懸濁し、動物に10ml/kg体重の容量で0(対照群)、300、1000、2000 mg/kg体重の投与量を、妊娠6日目から15日目までの10日間毎日1回経口投与した。無処理の雌2匹と雄1匹のラットを終夜同居させ、翌朝膣垢中の精子について検査した。精子が認められた雌は、無作為に対照群と投与群に配分された。交尾が確認された日を妊娠0日とし、妊娠20日目に動物を屠殺し、検査した。

投与用量設定の理由：

試験項目：

妊娠動物：

妊娠動物について、交配後から屠殺までの間、一般症状を毎日観察した。体重を妊娠0日、6～16日までの毎日及び妊娠20日に測定し、摂餌量を妊娠0～6、6～11、11～16、16～20日に測定した。

屠殺時には、内臓の肉眼的検査、黄体数、着床数、吸収胚数・死亡胎児数、生存胎児数及び胎盤重量について検査した。

生存胎児：

摘出時に、生存胎児については性別、体重、外表奇形を観察し、その後各腹あたり各々約半数の胎児をブアン液と70%エタノール液に固定した。前者はWILSON法により内臓検査を実施し、後者はアリザリンレッドSで染色後骨格検査に供した。

【試験結果】

試験結果の概要については、次頁の表に示した。

妊娠動物に毒性学的に意味のある臨床所見は全投与群で認められなかった。しかし、検体投与群のみに褐色便が低頻度ながら観察された。褐色便の所見は、用量と出現頻度に明瞭な関連性がなかったこととこの所見が他の作用と直接的には関連していなかったことから、有害作用とは考えられなかった。また、褐色便は、検体が褐色であることとの関連性も推察された。

妊娠動物の体重増加の抑制は 1000mg/kg 体重と 2000mg/kg 体重群でそれぞれ、妊娠 7-16 日及び妊娠 7-14 日に観察された。しかし、これらの低下は対照群と比較して 4~5%の範囲とわずかであったことと、妊娠期間中の増体重が 2000 mg/kg 体重群でも対照群とほぼ同じであったことから、毒性学的な意義としては疑問がある。300 mg/kg 体重群では体重の増加抑制は認められなかった。従って、母動物の体重に対する無影響量は 300 mg/kg 体重であったが、無毒性量は 2000 mg/kg 体重とも考えられる。

摂餌量の有意な低下はどの投与群でもみられなかった。しかし、摂餌量の増加が、妊娠 16~20 日に 300 mg/kg 体重群と 2000mg/kg 体重群で統計的に有意に観察された。1000 mg/kg 体重群では有意な差ではなかった。摂餌量は発生毒性試験を通して最も変動するパラメータの一つであり、本試験での摂餌量は、全投与群で統計的な有意差も含めて、妊娠期間を通じて変動している。投与量と反応との関連性がなかったことから、摂餌量の変化は検体投与に起因しているとは考えられなかった。

剖検において投与に関連した内臓所見は認められなかった。

肝臓と甲状腺の重量には対照群と全投与群間で有意な差はみられなかった。

繁殖指数(交尾率、受胎率、妊娠率)には検体による影響は認められなかった。

黄体数、着床数、着床前死胚率、着床後死胚率、吸収胚数、同腹児数、胎児体重、胎盤重量には対照群と全投与群間で有意な差は認められなかった。2000 mg/kg 体重群の雄胎児割合(40.8%)は対照群(47.4%)と統計的に有意な差であった。しかし、2000 mg/kg 体重群の雄胎児の割合のメディアン(46%)は対照群の 50%と比較して統計的に有意ではなかった。さらに、2000 mg/kg 体重群で観察された 40.8%の雄胎児の割合はSD系ラットでは背景データ(38.2~56.5%)の範囲内であった。これら

のことから、雄胎児割合の変化は検体に起因するのではなく、本試験系での正常の範囲内と考えられる。

外表奇形は対照群を含め低頻度で出現したが、母動物単位及び胎児単位の頻度に統計的に有意な差はなかった。なお、毒性資料 No. 25 のラット催奇形性試験で観察された「ドーム型頭」と「眼瞼開裂」は本試験では認められなかった。

骨格検査では、骨格奇形は散見されたが、その出現頻度に母動物単位及び胎児単位の頻度に統計的に有意な差はなかった。全群の全ての胎児に骨格変異が観察された。統計的に有意な所見は、頭頂骨、剣状骨、舌骨の骨化遅延と矢状縫合、小泉門の拡張であった。しかし、統計的に有意な所見を含むすべての骨格変異は背景データの範囲内にあるか、または投与量との関連性はみられなかった。

内臓検査では、内臓奇形及び変異は散見されたが、その出現頻度に母動物単位及び胎児単位の頻度に統計的に有意な差はなかった。

以上の結果より、本剤を妊娠ラットに投与したときの母体における無影響量は、300 mg/kg 体重/日であったが、無毒性量は 2000 mg/kg 体重とも考えられる。胎児における無毒性量及び無影響量は、2000 mg/kg 体重/日であり、催奇形性を示さないと判断される。

本試験の目的であった、毒性資料 No. 25 のラット催奇形性試験で観察された摂餌量の変化および胎児の奇形が検体によるものかどうかについては、前の試験の 2 倍の投与量を含む本試験の所見に基づいて、元の試験での摂餌量と胎児の変化は検体によるものではなかったと考えられた。

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

投与量 mg/kg 体重		0	300	1000	2000	
交尾動物数		30	30	30	30	
受胎動物数		24	26	27	27	
妊娠維持動物数		24	26	27	27	
母動物	一般症状					
	褐色便		5	2	6	
	切迫屠殺(投与ミス)			1		
	体重(妊娠日)			抑制(7-16)	抑制(7-14)	
	摂餌量(妊娠日)		増加(16-20)		増加(16-20)	
	剖検所見					
	子宮重量(g)	73.1	78.8	74.7	76.0	
	着床所見	黄体数 ★	16.3	16.6	16.4	16.5
		着床数 ★	14.1	15.5	14.9	15.3
		着床前死胚 ★	2.2	1.2	1.5	1.3
		着床後死胚 ★	0.8	0.9	0.9	1.1
		吸収胚数 ★	0.8	0.9	0.3	1.1
		死亡胎児数	0	0	0	0
生存胎児数 ★		13.3	14.5	14.0	14.2	
雄胎児の割合(%) / 平均値 / メディアン		47.4 / 50	48.5 / 53	51.3 / 54	40.8* / 46	
生存胎児体重(g)	3.6	3.6	3.5	3.5		
胎児	胎盤重量(g)	0.55	0.50	0.49	0.51	
	外表奇形					
	短尾	1				
	胃壁裂		1			
	重複奇形 ^a			1		
	骨格検査					
	奇形					
	肋骨欠損	1	2[2]		3[3]	
	胸骨弓又は核・過剰	1				
	胸骨弓・癒合				1	
	胸骨弓又は核・欠損				1	
	腰椎弓又は核・欠損	1	2[1]		1	
	変異					
	矢状縫合の拡張		1	8*[6]	2[2]	
	小泉門の拡張	2[2]	3[2]	19**[10]	5[5]	
	化骨遅延					
	頭頂骨	3[3]	4[3]	19**[9]	5[5]	
舌骨	30[14]	32[12]	38[14]	17*[11]		
剣状骨	139[24]	185**[26]	175[26]	179[27]		
内臓検査						
奇形						
大血管転位			1			
心臓矮小化	2[2]		4[3]			
無眼球症		1				
変異						
左側位臍動脈	4[4]	3[3]	3[3]	1*		
水尿管	8[6]	3[2]	5[4]	4[4]		

*: P<0.05 ** : P<0.01 [フィッシャー検定]

★ : 1匹の妊娠動物あたり

空欄 : 異常なし [] : 母動物数

: 外脳症、舌突出、脊椎裂、曲尾

フェンヘキサミドのウサギを用いた経口投与による催奇形性試験

(毒性資料 原体 27)

試験機関

[GLP 対応]

報告書作成年月日 : 1995年2月10日

検体の純度 : %

試験動物 : SPF ロシア系ウサギ 交尾雌 1群 16匹
(試験開始時体重 2040~3232g)

試験期間 : 1993年10月~12月
投与期間 ; 13日間(妊娠 6~18日)

【試験方法】

検体を0.5%Tylose水溶液に懸濁し、動物には12.5ml/kg体重の容量で0(対照群)、100、300、1000mg/kg体重の投与量を、妊娠6日目から18日目までの13日間毎日1回経口投与した。交配は雄と雌の各1匹をケージに入れて行い、交尾を観察できたものを交尾雌とした。交尾の観察日を妊娠0日とし、妊娠29日目に動物を屠殺し、検査した。

試験項目 :

妊娠動物

受精から屠殺までの間、母動物の一般症状を毎日観察した。

体重を妊娠0日、6~18日及び29日に測定し、投与期間中と妊娠期間中の増加を求めた。

摂餌量は妊娠0~6日、6~10日、10~14日、14~19日、19~24日、24~29日に測定した。

妊娠動物の屠殺時には、内臓の肉眼的検査、黄体数、着床数、死亡胚・死亡胎児数、生存胎児数について検査した。

生存胎児

生存胎児については、摘出時に性別、体重、外表奇形を観察した。半数の胎児の脳をWilsonの変法により脳の異常及び内臓を検査した。この残体と残りの半数の胎児をDawson法により骨格標本を作製して骨格検査に供した。胎盤重量も測定した。

【試験結果】

試験結果の概要については次頁の表に示した。

妊娠動物において死亡例は認められなかった。臨床観察において自然発生と考えられるいくつかの所見が認められたが、これらは対照群と統計学的な有意差を示さず、本検体に起因するような臨床所見は認められなかった。

300mg/kg 体重と 1000mg/kg 体重群で投与期間中の増体重が、統計的に有意ではないが、抑制され、検体に起因する作用と考えられた。しかし、1000mg/kg 体重群では試験終了時までには体重増加の抑制は代償され、逆に高値となった。

妊娠動物の摂餌量についても対照群と 1000mg/kg 体重群との間に全期間中有意な差は認められなかったが、300mg/kg 体重と 1000mg/kg 体重群で投与期間中の妊娠 6～10 日まで、対照群に比較して、有意な減少がみられ、検体の影響と考えられた。しかし、投与終了後から屠殺までの間には逆に摂餌量の増加を示し、代償作用と考えられた。この摂餌量の減少に関連して、300mg/kg 体重と 1000mg/kg 体重群で糞の減少や小糞塊等が観察された。

300mg/kg 体重と 1000mg/kg 体重群の妊娠率は両群各 1 例ずつの流産及び 1000mg/kg 体重群の 2 例の総吸収胚のために低下した。

剖検において検体投与に起因した所見はみられなかった。

受胎率、黄体数、着床数、一腹胎児数、着床前死胚数は正常と考えられた。妊娠率は、1000mg/kg 体重群で 1 匹の流産と 2 匹の全吸収のために、低下した。

生存胎児数及び性比は全用量群で対照群と有意差を示さなかった。しかし、胎盤重量は 300mg/kg 体重と 1000mg/kg 体重群で有意に減少した。生存胎児体重も、1000mg/kg 体重群で減少傾向にあり、投与の軽度の影響が推察された。

外表、内臓及び骨格検査において散発的に奇形がみられたが、検体に起因するものではなかった。

以上の結果より、本剤を妊娠ウサギに投与したときの母体及び胎児における影響として、1000mg/kg 体重群で投与期間中の摂餌量の減少、体重増加の抑制傾向、胎児体重の減少傾向、胎盤重量の低下がみられ、300mg/kg 体重群で投与期間中の摂餌量の減少、体重増加の抑制傾向、胎盤重量の低下がみられたことから、母体及び胎児における無毒性量及び無影響量は、いずれも 100mg/kg 体重/日と判断される。また、胎児に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。

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

投与量 mg/kg体重		0	100	300	1000	
交尾動物数		16	15(1 ^a)	15(1 ^a)	16	
受胎動物数		16	15	14	16	
妊娠動物数		16	15	14	13	
母動物	一般症状/糞;軟化	0	0	1	1	
	;少量化	8	9	9	16	
	;小形化	1	2	2	5	
	赤色液体	0	1	0	0	
	外傷(のど)	0	0	0	1	
	死亡					
	流産	0	0	1	1	
	総吸収胚	0	0	0	2	
	体重			減少傾向	減少傾向	
	摂餌量			↓(投与期間)	↓(投与期間)	
剖検所見/子宮異常 ^{a)}		0	1	1	0	
着床所見	黄体数 ★	8.2	8.1	8.3	7.7	
	着床数 ★	7.3	6.9	7.0	7.5	
	着床前死胚(%)	0.9	1.1	1.3	0.2	
	吸収胚数 ★	0.6	0.9	0.5	0.9	
	生存胎児数 ★	6.6	6.0	6.5	6.5	
	性比(雄胎児の割合)	43.2	39.7	44.6	42.9	
	平均生存胎児体重(g)	39.10	38.58	38.56	37.57(↓)	
胎児	胎盤重量(g)		4.48	4.28	↓4.09	↓4.04
	骨格検査胎児数		106	90	91	85
	奇形/関節拘縮症		1[1]	1[1]	3[3]	4[2]
	椎骨					
	-過剰腰椎		1[1]	0	0	0
	-胸椎欠損		0	0	0	1[1]
	肋骨					
	-ゆ合		1[1]	0	0	0
	-軟骨部でゆ合		0	0	1[1]	0
	-遠位端肥厚		0	1[1]	0	0
	内臓検査					
	奇形/心臓					
	-中隔奇形		1[1]	0	0	0
-総動脈幹		1[1]	0	0	0	
口蓋裂		1[1]	0	0	0	

↓ : p<0.05 (F検定+t検定) ↓↓ : p<0.01 (F検定+t検定) (↓) : 統計学的に有意ではない

★ : 1匹の妊娠動物あたり

空欄 : 異常なし

a) : 評価から除外された

[] : 母動物数

(13) 変異原性

フェンヘキサミドの細菌を用いた復帰突然変異試験

(毒性資料 原体 28)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日 : 1995 年 7 月 12 日

検体の純度 : %

試験系 : 細菌(サルモネラ菌〈TA98 株、TA100 株、TA1535 株、TA1537 株〉、
大腸菌〈WP2uvrA 株〉)

【試験方法】

試験用量設定の理由及び試験液の調製方法

Ames 試験(プレインキュベーション法)

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌(*Salmonella typhimurium*)の4株およびトリプトファン要求性の大腸菌(*Escherichia coli*)の1株を用い、フェノバルビタールと5,6-ベンソフラボンで酵素誘導したラット肝から調製した薬物代謝酵素系(S9-Mix)の非存在下及び存在下でAmesらの方法により変異原性を検定した。

各濃度とも3プレートを用いた。試験は再現性をみるために2回行った。

各菌株及び各濃度毎の平均復帰変異コロニー数が、溶媒対照の平均復帰コロニー数の2倍以上で用量相関性のある増加を示した場合を変異原性陽性と判定した。

【結果及び考察】

表 1、2 に示したように、2 回の試験とも代謝活性化の有無にかかわらず、どの菌株においても $700 \mu\text{g}/\text{プレート}$ で生育阻害がみられたが、復帰変異コロニー数は溶媒対照の 2 倍以上で、かつ用量相関性のある増加は認められなかった。

一方、2 回の試験とも、陽性対照として用いた AF-2 (2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide)、 NaN_3 (Sodium azide)、9-AA (9-Aminoacridine) では溶媒対照と比較して著明な復帰変異コロニー数の増加が認められ、また、2-AA (2-Aminoanthracene) は S-9 Mix を加えることにより代謝活性化され、試験に用いたすべての株に著明な復帰変異を誘起した。

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を有さないものと判断される。

表 1. 復帰変異試験成績 (第 1 回目)

物質	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数 / プレート					S-9 Mix	復帰変異コロニー数 / プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537		TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537
DMSO (溶媒対照)	0	-	86	8	14	24	6	+	93	16	21	32	16
			96	6	21	29	7		95	13	20	35	14
			87 (90)	9 (8)	15 (17)	27 (27)	12 (8)		103 (97)	19 (16)	22 (21)	45 (37)	14 (15)
検体	43.8	-	78	9	16	33	9	+	107	16	18	29	19
			86	6	16	28	7		112	13	21	34	13
			83 (82)	10 (8)	15 (16)	32 (31)	12 (9)		102 (107)	14 (14)	24 (21)	41 (35)	17 (16)
	87.5	-	77	10	12	32	8	+	99	16	25	30	12
			73	7	13	29	7		113	14	25	38	13
			78 (76)	8 (8)	15 (16)	31 (31)	6 (7)		133 (115)	16 (15)	27 (26)	30 (33)	12 (12)
	175	-	79	7	15	25	12	+	101	13	29	40	14
			78	11	14	23	6		100	16	19	27	13
			97 (85)	11 (10)	17 (15)	29 (26)	7 (8)		105 (102)	9 (13)	25 (24)	30 (32)	17 (15)
	350	-	80	10	10	26	4	+	90	6	21	35	7
			77	7	16	29	6		80	11	21	36	17
			70 (76)	9 (9)	14 (13)	31 (29)	10 (7)		86 (85)	9 (9)	21 (21)	30 (34)	14 (13)
700	-	K	K	K	K	K	+	K	K	K	K	K	
		K	K	K	K	K		K	K	K	K	K	
		(K)	(K)	(K)	(K)	(K)		(K)	(K)	(K)	(K)	(K)	
陽性対照		-	a)	b)	a)	c)	d)	+	e)	f)	g)	h)	f)
			381	133	184	442	454		458	96	398	210	94
			390	134	173	435	487		481	135	377	170	73
			402 (391)	144 (137)	184 (180)	417 (431)	519 (487)		494 (478)	117 (116)	404 (393)	175 (185)	91 (86)

K : 生育阻害

a) AF-2 : 0.01 $\mu\text{g}/$ プレート

b) NaN₃ : 0.5 $\mu\text{g}/$ プレート

c) AF-2 : 0.1 $\mu\text{g}/$ プレート

d) 9-AA : 80.0 $\mu\text{g}/$ プレート

e) 2-AA : 1.0 $\mu\text{g}/$ プレート

f) 2-AA : 2.0 $\mu\text{g}/$ プレート

g) 2-AA : 10 $\mu\text{g}/$ プレート

h) 2-AA : 0.5 $\mu\text{g}/$ プレート

表 2. 復帰変異試験成績 (第 2 回目)

物質	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート					S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537		TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537	
DMSO (溶媒対照)	0	-	77	9	16	23	12	+	79	14	13	30	13	
			83	8	17	21	8		90	12	15	34	15	
			87	8	15	26	11		89	10	12	35	12	
			(82)	(8)	(16)	(23)	(10)		(86)	(12)	(13)	(33)	(13)	
検体	43.8	-	75	6	15	19	13	+	90	12	10	30	10	
			78	5	12	21	9		84	15	13	38	13	
			75	9	15	26	8		97	13	13	34	13	
				(76)	(7)	(14)	(22)	(10)		(90)	(13)	(12)	(34)	(12)
	87.5	-	83	7	14	28	12	+	97	13	15	36	15	
			81	6	12	20	12		103	13	11	41	11	
			77	5	14	24	9		92	12	12	40	12	
				(80)	(6)	(13)	(24)	(11)		(97)	(13)	(13)	(39)	(13)
	175	-	70	6	12	28	10	+	86	8	11	36	11	
			80	6	11	25	7		76	9	14	37	14	
			83	8	11	27	9		103	13	15	30	15	
				(78)	(7)	(11)	(27)	(9)		(88)	(10)	(13)	(34)	(13)
350	-	83	5	10	15	4	+	83	11	12	20	12		
		80	7	7	25	7		80	8	7	26	7		
		83	6	13	27	7		77	8	10	24	10		
			(82)	(6)	(10)	(22)	(6)		(80)	(9)	(10)	(23)	(10)	
700	-	K	K	K	K	K	+	K	K	K	K	K		
		K	K	K	K	K		K	K	K	K	K	K	
		K	K	K	K	K		K	K	K	K	K	K	
			(K)	(K)	(K)	(K)	(K)		(K)	(K)	(K)	(K)	(K)	
陽性対照		-	a)	b)	a)	c)	d)	+	e)	f)	g)	h)	f)	
			431	148	177	381	429		471	124	346	210	100	
			452	151	175	378	423		469	126	317	180	112	
			439	164	174	361	489		466	143	401	181	129	
			(441)	(154)	(175)	(373)	(447)		(469)	(131)	(355)	(190)	(114)	

K : 生育阻害

a) AF-2 : 0.01 $\mu\text{g}/$ プレート

b) Na₃ : 0.5 $\mu\text{g}/$ プレート

c) AF-2 : 0.1 $\mu\text{g}/$ プレート

d) 9-AA : 80.0 $\mu\text{g}/$ プレート

e) 2-AA : 1.0 $\mu\text{g}/$ プレート

f) 2-AA : 2.0 $\mu\text{g}/$ プレート

g) 2-AA : 10 $\mu\text{g}/$ プレート

h) 2-AA : 0.5 $\mu\text{g}/$ プレート

フェンヘキサミドの細菌を用いた復帰突然変異試験 (2)

(毒性資料 原体 29)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日 : 1991年5月29日

検体の純度 : %

試験系 : 細菌(サルモネラ菌 (TA98 株、TA100 株、TA1535 株、TA1537 株))

【試験方法】

試験用量設定の理由及び試験液の調製方法

Ames 試験(プレインキュベーション法)

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌(*Salmonella typhimurium*)の4株を用い、Aroclor1254で酵素誘導したラット肝から調製した薬物代謝酵素系(S9-Mix)の非存在下及び存在下でAmesらの方法により変異原性を検定した。細胞毒性はS9-Mixの存在下で評価した。

各濃度とも4プレートを用いた。試験は1回目試験を含め3回(3回目はS9-Mix存在下のみ)行った。

各菌株及び各濃度毎の平均復帰変異コロニー数が、溶媒対照の平均復帰コロニー数の2倍以上で用量相関性のある増加を示した場合を変異原性陽性と判定した。

S9-Mix非存在下においては、TA1535株についてはNaN₃(Sodium azide)、TA100株についてはNF(Nitrofurantoin)、TA1537株並びにTA98株については4-NPDA(4-nitro-1,2-phenylene diamine)を陽性対照とした。S9-Mix存在下において全ての株について2-AA(2-aminoanthracene)を陽性対照とした。

【結果及び考察】

125 μ g/プレート以上で細胞の生育阻害が認められた。2000 μ g/プレート以上では検体沈殿が認められたため、評価には使用しなかった。表1、2および3に示したように、何れの試験とも代謝活性化の有無にかかわらず、どの菌株においても、復帰変異コロニー数が溶媒対照の2倍以上でかつ用量相関性のある増加は認められなかった。

一方、陽性対照は何れの場合も溶媒対照と比較して著明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さないものと判断される。

表1. 復帰変異試験成績（第1回目）

物質	濃度 (μ g/ プレート)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート			
			塩基対置換型		フレームシフト型			塩基対置換型		フレームシフト型	
			TA100	TA1535	TA98	TA1537		TA100	TA1535	TA98	TA1537
溶媒対照	0	—	105	16	23	7	+	152	17	30	8
検体	8	—	110	17	25	10	+	146	17	36	9
	40	—	132	11	30	11	+	146	18	41	11
	200	—	116	16	33	10	+	160	16 K	41	8
	1000	—	90	8	25	4	+	123 K	15 K	49 K	10 B
	5000	—	N, P	6	N	N	+	N, P	8 P	N P	N P
陽性対照		—	NF	NaN ₃	4-NPDA	4-NPDA		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
			431	919	84	47	+	1543	284	959	221

N：細胞毒性のため評価せず、P：沈殿、K：生育阻害

表 2. 復帰変異試験成績 (第 2 回目)

物質	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート			
			塩基対置換型		フレームシフト型			塩基対置換型		フレームシフト型	
			TA100	TA1535	TA98	TA1537		TA100	TA1535	TA98	TA1537
溶媒対照	0	-	84	21	22	10	+	93	12	19	9
検体	62.5	-	86	19	19	8	+	97	17	25	7
	125	-	112	22	20	6	+	100	21	19	7
	250	-	93	15	22	8	+	91	20	24	8
	500	-	49	11	25	7	+	92	19 K	24 K	7 K
	1000	-	N	6	11	N	+	65 K	7 K	21 K	2 K
	2000	-	N	N	N	N	+	N, K	N, K	N, K	N, K
陽性対照		-	NF	NaN ₃	4-NPDA	4-NPDA		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
			398	793	97	63	+	704	81	626	98

K : 生育阻害

表 3. 復帰変異試験成績 (第 3 回目)

物質	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート			
			塩基対置換型		フレームシフト型	
			TA100	TA1535	TA98	TA1537
DMSO (溶媒対照)	0	+	113	13	33	8
検体	62.5	+	107	13	26	8
	125	+	118	16	32 K	8 K
	250	+	109	15 K	34 K	10 K
	500	+	104	15 K	42 K	7 K
	1000	+	81	12 K	26 K	8 K
	2000	+	N, K	N, K	N, K	N, K
陽性対照			2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		+	1294	122	1424	869

K : 生育阻害

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

チャイニーズハムスター卵巣由来培養細胞を用いた in vitro 染色体異常試験
(毒性資料 原体 30)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日 : 1995 年 10 月 24 日

検体の純度 : %
供試生物 : チャイニーズハムスター卵巣由来培養細胞
試験期間 : 処理開始 8、24 及び 30 時間後観察

【試験方法】

チャイニーズハムスターの継代培養した卵巣由来培養細胞(CHO)を用い、代謝活性化、非代謝活性化によって染色体異常誘発性を検定した。

投与用量の決定

検体の調製

検体を所定量の DMSO に溶解し、2 種の陽性対照物質をハンクス液に溶解した。

標本の作成

フラスコに牛胎仔血清を含む培地 20ml を入れ、そこに 1×10^6 個の CHO 細胞を播種した。これを一定時間炭酸ガス恒温器内で培養した。その後培養液を捨て、S9-Mix 非存在下では 20ml の新鮮な培地と 0.2ml の検体液を、S9-Mix 存在下では 19ml の新鮮な培地、1ml の S9-Mix、0.2ml の検体液を加えて 4 時間炭酸ガス恒温器内で処理した。その後さらに新鮮な培地と交換し、所定の時間培養した。各培養の終了 2 時間前にコルセミドを中期分裂細胞を集めるために添加した。なお、S9 分画は Aroclor 1254 を投与したラット肝から調製された。各濃度とも 2 連で培養した。

S9-Mix 非存在下で、培養後 8 時間(溶媒対照、150 μ g/ml)、24 時間(溶媒対照、陰性対照<無処理>、6、30、150 μ g/ml)、30 時間(溶媒対照、150 μ g/ml)、S9-Mix 存在下で、

培養後 8 時間(溶媒対照、120 μ g/ml)、24 時間(溶媒対照、陰性対照<無処理>、2、20、120 μ g/ml)、30 時間(溶媒対照、120 μ g/ml)の各標本作成時点で細胞を低張液(0.56%KCl 液)で低張処理をした後に、細胞を無水エタノール/氷酢酸混液(3:1)で固定した。この液を冷却した水に浸したスライドガラス上に滴下し乾燥後、ギムザ液で染色した。1 培養当たり 2 枚のスライド標本(1 枚はバックアップ用で通常評価には使用せず)を作製した。陽性対照では培養 24 時間後にのみ標本を同様に作成した。陽性対照物質として、S9-Mix 非存在下の場合はマイトマイシン C(1 μ g/ml)、S9-Mix 存在下の場合はシクロホスファミド(10 μ g/ml)を用いた。

有糸分裂指数

1 培養あたり、1000 個の細胞を算定することにより求めた。

中期分裂細胞の検査

2 連の培養後、原則として 1 培養あたり 2 枚のスライド(1 枚はバックアップ用で通常評価には使用せず)を作製し、光学顕微鏡を用いてスライドあたり 100 個の中期分裂細胞の染色体と染色分体についてギャップ、切断、断片、欠失、交換、重複異常などの構造異常を検査した。従って、各濃度当たり 200 個の中期分裂細胞の染色体を観察した。

【結 果】

1)細胞分裂頻度

S9-Mix 非存在下では、150 μ g/ml における 8 時間、24 時間と 30 時間の標本では、有糸分裂指数は、溶媒対照に対してそれぞれ 48.1%、69.8%、64.3%の抑制がみられた。一方、S9-Mix 存在下においては、120 μ g/ml では 8 時間と 30 時間で明らかな抑制(それぞれ 30.6%と 24.3%)がみられたが、24 時間では、88%と比較的軽度な抑制がみられた。

2)染色体異常

検査結果は、表 1 に示した。

検体は S9-Mix の存在下及び非存在下の両者において、いずれの調製時間においても染色体異常を示す中期分裂細胞数の増加を示さなかった。

陽性対照として使用したマイトマイシン C(1 μ g/ml)、シクロホスファミド(10 μ g/ml)では染色体異常を示す中期分裂細胞が明らかに増加した。

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卵巣由来培養細胞系に染色体異常を誘発しないものと判断される。

表 1. 染色体異常検査結果

実験群 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S9- Mix	回収 時間	観察 細胞数	ギャップ*		異常の分類									異常中期分裂細胞 (%)		
				染色体型			染色体型			その他			含 ギャップ	除 ギャップ	交換		
				g	ig	b	f	d	ib	if	id	ex				ma	cd
溶媒対照	-	8	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0
検体150			12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0
溶媒対照	+	8	200	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.0	0.0
検体120			103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0
溶媒対照	-	24	200	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	0.0
陰性対照			200	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0	0.5	0.0
検体 6			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0
検体 30			200	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	0.0
検体150			200	3	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	2.5	1.5	0.0
陽性対照 ^A			200	1	1	7	0	0	0	13	0	9	2	0	12.0**	12.0**	5.0**
溶媒対照			200	0	0	0	1	0	1	3	1	0	0	0	3.0	3.0	0.0
陰性対照			200	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1.0	0.5	0.5
検体 2			200	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1.0	1.0	0.0
検体 20			200	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1.0	1.0	0.0
検体120	200	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	0.0		
陽性対照 ^B	200	1	2	8	0	0	2	13	0	4	1	0	13.0**	11.5**	2.0**		
溶媒対照	-	30	200	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1.0	1.0	0.0	
検体150			200	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1.0	0.5	0.0	
溶媒対照	+	30	200	3	0	1	0	0	0	2	0	0	0	3.0	1.5	0.0	
検体120			114	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	

** : $P \leq 0.01$ (Fisher の直接確率法), A : マイトマイシン C (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), B : シクロホスファミド (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

処理時間 ; 4 時間

g: 染色体型ギャップ

ig: 染色体型ギャップ

b: 染色体型切断

ib: 染色体型切断

f: 染色体型断片

if: 染色体型断片

d: 染色体型欠失

id: 染色体型欠失

ex: 交換

ma: 重複異常

cd: 染色体破損

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

フェンヘキサミドのマウスにおける小核試験

(毒性資料 原体 31)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1993年10月21日

検体の純度：%

試験系：NMRI系マウス、1群雌雄各5匹

(試験開始時：6～12週齢、体重 雌 28～33g 雄 36～42g)

【試験方法】

検体を0.5% Cremophor水溶液に懸濁させ、腹腔内投与を行った。なお、陰性対照群には0.5% Cremophor水溶液を、陽性対照群にはシクロホスファミドを脱イオン水に溶解させたものを同様に投与した。検体及び陽性対照のシクロホスファミドの用量はそれぞれ750及び20mg/kg体重とした。投与容量は10mL/kgとした。

検体投与群については投与から16時間後、24時間後及び48時間後に屠殺した。陰性対照群及び陽性対照群のマウスはすべて24時間後に屠殺した。検体投与群については、大腿骨髄標本作製をすべての群でいずれも投与後、16時間、24時間及び48時間で動物を屠殺し、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滴下し均一に広げ、一晚乾燥させた。この塗抹標本をギムザ染色し、メタノールで脱染色し、脱イオン水で洗浄し乾燥し、骨髄標本作製した。

各標本について、1000個の多染性赤血球を数えると同時に、正染性赤血球の数、小核を有する多染性、正染性赤血球についても計数した。

【用量設定の根拠】

5匹の動物を用いた予備試験に基づいて選択した。1群5匹からなるマウスに検体の250、500、750及び1000mg/kg体重をそれぞれ腹腔内投与した予備試験に基づいた。以下に示す症状が250mg/kg体重以上で48時間後まで記録された。無関心、被毛粗剛、よろめき歩行、腹臥、痙攣及び呼吸困難。さらに、1000mg/kg体重群では5例中4例が死亡した。

これらの所見に基づき、検体の750mg/kg体重を最大耐量として選択した。

【試験結果】

1) 一般症状

検体投与により、無関心、被毛粗剛、よろめき歩行、腹臥、痙攣及び呼吸困難などの症状が投与後 48 時間の観察期間中に認められた。摂餌行動は正常であった。1 例に死亡がみられた。雌雄に差は認められなかった。

対照群では症状及び死亡は認められなかった。

2) 結果

以下の表に結果を示す。

陰性対照に比較して、小核を有する多染性赤血球数が毒性学的に意味のあるまた統計学的に有意に増加している場合には、検査は陽性であると判断した。

尚、染色体異常誘発作用の評価については、雄と雌の結果の間に意味のある差はなかったため、雌雄をあわせて評価した。

投与群 (mg/kg体重) (検査時間 [#])	評価した多染性赤血球総数	1000個の多染性赤血球あたりの正染性赤血球数	小核を有する細胞数	
			1000個の正染性赤血球あたり	1000個の多染性赤血球あたり
陰性対照群 (24時間)	10000	736±251	1.9±1.4	1.5±1.3
750 (16時間)	10000	1782±625*	1.0±0.8	1.1±1.0
750 (24時間)	10000	1583±644	1.1±1.1	2.3±1.1
750 (48時間)	10000	1116±522	1.6±1.7	1.3±1.2
陽性対照群 シクロホスファミド [△] 20 (24時間)	10000	575±121	0.8±1.3	14.5*±6.5

平均±SD, [#]:投与後

Wilcoxonの順位和検定で有意差あり (*:p<0.01)

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

その結果、上表に示されるように、陰性対照と検体 750mg/kg 体重群間には、小核を有する多染性赤血球の発現率に関する生物学的に重要な差も統計学的に有意な差も認められなかった。

陽性対照のシクロホスファミドは小核を有する多染性赤血球数の明瞭な増加を誘発した。

結論として、本試験条件下において、検体は骨髄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。

フェンヘキサミドの細菌を用いた DNA 修復試験 (Rec-Assay)

(毒性資料 原体 32)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日 : 1997 年 1 月 20 日

検体の純度 : %
試験系 : 細菌(枯草菌 (H17 株、M45 株))

【試験方法】

試験用量設定の理由及び試験液の調製方法

Rec-assay (孢子法)

DNA 損傷の誘起作用を調べるために、*B. subtilis* の野生株である組み換え修復機構保持株 (H17) とその変異株である欠損株 (M45) の孢子を用いた。

両菌株の孢子は、孢子浮遊液として 4°C で保持しているものを使用した。約 45°C に保った孢子法用のニュートリエントアガー 1L あたり 10mL の割合で孢子浮遊液を加え、攪拌後シャーレに 10mL ずつ分注し、室温で固化させた。代謝活性化させる場合は、S-9 *0.1mL をシャーレに分注してから孢子法用のニュートリエントアガーをシャーレに 10mL ずつ分注し、冷蔵庫で固化させた。

次に検体あるいは対照物質を含む試料 20 μ L をしみ込ませたディスク (直径 8mm の円形濾紙) を 1 プレートに 2 枚置き、37°C の孵卵器で 24 時間培養した。代謝活性化させる場合は、ディスクに補酵素液 20 μ L、検体あるいは対照物質を含む試料 20 μ L をしみ込ませ同様な操作を行った。そして、両菌株の生育阻止円の直径を差し引いたものを生育阻止円 (mm) の直径とした。その結果、両菌株の生育阻止円の直径の差が 5mm 以上の場合を陽性と判定した。

S-9* ; 7 週齢雄の SD 系ラット肝ホモジネートから得た。誘導物質としてフェノバルビタール及び 5, 6-ベンゾフロボンを使用

【結果】

物質	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ディスク}$)	-S-9			+S-9		
		阻止円 (mm)		差 (mm)	阻止円 (mm)		差 (mm)
		H17	M45		H17	M45	
検体	6.25	0	0	0	0	0	0
	12.5	0	0	0	0	0	0
	25	0	0	0	0	0	0
	50	0	0	0	0	0	0
	100	3	4	1	6	6	0
	200	4	4	0	5	6	1
マイトマイシン C (MMC)	0.005	0	14	14			
	0.01	1	18	17			
2-アミノアントラセン (2-AA)	5	0	0	0	0	10	10
	20	0	0	0	0	12	12
硫酸カナマイシン (KM)	0.5	10	11	1			
	1.0	12	15	3			
ジメチルスルホキシド (DMSO)	(20 μL)	0	0	0	0	0	0

表にみられるように、検体 100~200 $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ の濃度においては、代謝活性化の有無にかかわらず、両菌株に対しわずかな生育阻害が認められたが、生育阻止円の直径の差は、5mm 以内であった。検体 6.25~50 $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ の濃度では、代謝活性化の有無にかかわらず、両菌株ともに生育阻害が認められなかった。

一方、陽性対照物質である MMC (S-9 非存在下) 及び 2-AA (S-9 存在下) では H17 株に比べ、M45 株でも明らかな生育阻害が認められ、判定は陽性であった。陰性対照物質の KM (S-9 非存在下) では両菌株に対し生育阻害が認められたが、両菌株の差が 5mm 以内であり、また、2-AA (S-9 非存在下) では、両菌株共に生育阻害は認められず、いずれも陰性であった。

この対照物質の成績は、本試験が検体の結果を評価するに十分な試験条件で実施されたことを保証するものであった。

以上の結果より、検体は比較的低濃度で殺菌作用を示すものの、代謝活性化を含む本試験条件下で DNA 損傷の誘発性を有さないものと判断される。

ラット肝臓初代培養細胞を用いた in vitro 不定期DNA合成 (UDS) 試験

(毒性資料 原体 33)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年月日 : 1992年4月29日

検体の純度 : %
供試生物 : ラット初代培養肝細胞
試験期間 : 処理開始後 24 時間培養

【試験方法】

ラットの初代培養肝細胞を用い、in vitro系の変異原性試験を実施した。通常、in vitro系の変異原性試験ではS9-Mixを代表とする外因的な代謝活性化系が検体及びその代謝物の変異原性を検定するのに必須である。これに対して、肝初代培養細胞ではそれ自身が高い内因性の代謝能を有している点が特徴となっており、ここで使用されている陽性対照物質の 2-アセチルアミノフルオレン (2-AAF) は代謝を受けて実際に変異原性を示すことが知られているものである。

1. 供試液の調製

検体及び陽性対照の 2-アセチルアミノフルオレン (2-AAF) は DMSO に溶解した。

2. 肝細胞の単離

無処理の雄の SD 系ラットをネンブタール麻酔下でコラゲナーゼ液等で生体位灌流し、肝を摘出してから肝細胞を単離調製した。

3. 肝細胞毒性と用量設定

単離した肝細胞は、L-グルタミン、硫酸ゲンタマイシン、不活化牛胎児血清を添加した Williams E 培養液で培養した。

まず、単層細胞を得るために、ペトリ皿に 7.5×10^5 個の肝細胞を加え、90~150 分間 5%炭酸ガス下の加湿された空気中で 37°C で培養した。その後ハンクス液での洗浄により未接着の細胞を除去してから、所定の検体液を添加して 18~24 時間培養した。生存細胞の検査は、トリパンブルー色素排除法で行った。対照群の生存細胞数に対する検体処理群の生存細胞数から、相対的生存率を求めた。

4. UDS 検査用標本の作製と観察

肝細胞毒性試験と同様に、単層細胞を得てから、所定の検体液とともに $10\mu\text{Ci}/\text{mL}$ の ^3H -チミジンを含む培養液で 18~24 時間培養した。その後、1%クエン酸ナトリウムでの核の膨化処理に続いて、氷酢酸と純エタノール混液(1:3)での細胞の固定を行い、水洗後に風乾した。

オートラジオグラフィ処理のために、スライドガラスの NTB-2 写真用乳剤での処理を行い、暗箱中において 4°C で 4~10 日間の保持後に定着固定した。さらに、スライドガラスをヘマトキシリンエオシンで染色した。

各濃度あたり 3 枚のスライドガラスを作製し、各スライドガラスごとに 50 細胞を観察した。従って、各濃度あたり 150 細胞を評価した。 ^3H -チミジンの取り込みを反映する細胞中の粒子を、ZEISS 顕微鏡に接続した TV カラーモニターを用いて計測した。

5. 観察結果の表示

補正した核粒子数 = 3 枚のスライドガラス(計 150 細胞)における補正した核粒子数の平均値

細胞質粒子数の平均値 = 3 枚のスライドガラス(1 細胞あたり 3 カ所)での細胞質粒子数の平均値

5 個以上の粒子を有する核(%) = 検査細胞数(150 細胞)に対する 3 枚のスライドガラスにおける 5 個以上の補正した粒子を有する細胞数の百分率

生存率(%) = 溶媒対照区と比較した生存細胞数

6. 試験の評価

試験の信頼性については、主に下記の項目について観察した。

1. 溶媒対照区の生存細胞数は 16~24 時間後に 60%以上であること。
2. 溶媒対照区の平均補正核粒子数は「-8~+1 個」の範囲にあり、修復期の細胞が 10%を越えないこと。
3. 陽性対照物質の 2-AAF($0.5\mu\text{g}/\text{mL}$)において、補正粒子数を 5 以上有する細胞の割合が、60~100%であって、補正粒子数が 7~25 個の範囲にあること。
4. 5 個以上の補正粒子数を有する細胞の割合が 20%以上のときに、検体は陽性と判断される。

【結果】

陰性対照群での肝初代培養細胞の生存率は75.8%であった。

本試験で得られた、補正した核粒子数、細胞質中の粒子数、5個以上の粒子を有する核(修復中の細胞)の要約を次の表に示した。

試験群	核当たりの補正 粒子数 ± SD	細胞質中の平均 粒子数 ± SD	修復中の細 胞割合(%)	生存率 (%)
溶媒対照群 (DMSO; 1.0%)	-0.76 ± 0.30	2.31 ± 0.28	0	100.0
検体群 (µg/mL)				
2.5 [#]	-0.59 ± 0.21	2.25 ± 0.37	0	87.2
5.0	-0.65 ± 0.47	2.77 ± 1.45	1.3	79.7
10.0	-0.77 ± 0.22	2.99 ± 1.51	0	87.7
15.0	0.28 ± 0.56	2.91 ± 0.60	4.7*	75.9
30.0 [#]	-0.48 ± 1.22	2.18 ± 0.88	0	60.4
40.0	—	—	—	16.5
陽性対照群 2-AAF 0.5µg/mL	7.17 ± 0.16	2.21 ± 0.51	75.3*	84.2

DMSO : ジメチルスルホキシド, 2-AAF : 2-アセチルアミノフルオレン

* : $P \leq 0.05$ (χ^2 検定), # : 2スライドガラスで評価

40µg/mLの濃度はきわめて細胞毒性が強く(生存率: 16.5%)、スライド上の細胞数が少なく評価できなかった。30、15、5µg/mLでは中程度の細胞毒性がみられたが、その他の濃度では細胞毒性はみられなかった。従って、UDSを指標とする評価には、40µg/mLを除いた良好な生存率の幅(60.4~87.7%)が得られた5用量を核標識のための分析に用いた。一方、陽性対照物質(2-AAF; 0.5µg/mL)は、本試験において細胞毒性を示さなかった。

2.5、5.0、10.0、30µg/mLの濃度の検体処理群では、溶媒対照群に比較して、核当たりの補正粒子数に増加傾向や修復中の細胞の割合について統計学的に有意な増加は認められなかった。一方15µg/mLの濃度で核当たりの補正粒子数が0.28とわずかな増加が認められた。これは、評価基準により反応を示したとは考えられず、さらに、30µg/mLの濃度で対照群と同等であったことから、陽性を示すとは考えられなかった。陽性対照群では核当たりの補正粒子数に増加傾向をそして修復中の細胞の割合について有意な増加を示した。

修復細胞の出現率(%)については、15µg/mLの濃度でのみ、統計学的に有意な増加(4.7%)が認められた。しかし、この増加は、3枚のスライドガラスのうち1枚で10%増加したもので、他の2枚では修復細胞が2%みられたことに由来したことから、この増加に生物学的な意味はないと判断した。

以上の結果より、検体は、ラット肝臓の初代培養細胞におけるUDSを指標としたDNA損傷の誘発性を有さないものと判断される。

V79-HGPRT を用いた前進突然変異試験

(毒性資料 原体 34)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日 : 1994 年 12 月 7 日

検体の純度 : %

試験系 : 雄チャイニーズハムスター肺細胞 (V79)

【試験方法】

試験の原理：

本試験は V79 細胞の HGPRT 遺伝子の突然変異を、6-TG (6-チオグアニン) 耐性細胞の出現頻度を指標として変異原性を評価する。HGPRT (ヒポキサンチンフォスホリボシルトランスフェラーゼ) は細胞の生存に必須の酵素ではないが核酸の分解産から DNA を再合成するときに使用される。6TG はグアニンの類似体であるが、培地に 6TG を加えると野生株では HGPRT の作用で 6TG が細胞に取り込まれ、その結果として正しい DNA が合成されずに細胞は死亡する。検体により HGPRT 座に変異が起こると 6TG は細胞に取り込まれなくなるため細胞は増殖することが出来、その 6TG 耐性細胞のコロニー数をカウントすることで、検体の突然変異誘導能を定量的に検索することが出来る。

試験用量設定の理由および検体の調製方法：

変異原性試験：

V79 細胞を各試験濃度あたり 2 フラスコに播種し (試験 0 日目)、16-24 時間後に S-9Mix の存在下および非存在下で所定濃度の検体に 5 時間暴露させた。対照、溶媒対照および陽性対照も同様に処理した。その後単層細胞を洗浄しトリプリン処理後フラスコに再播種した。この時点で、ペトリ皿にフラスコより 200 細胞/皿で播種、7 日間

培養し検体投与直後の細胞生存率を評価した。もとのフラスコは6日間培養した(4日目に再度 1.5×10^6 の密度で継代培養した)(発現培養期間)。発現培養期間終了後、変異株の選抜のためにヒポキサンチンを含まず、代わりに6-TGを含む培地中 3×10^5 の密度でペトリ皿に播種し培養した。加えて、発現培養終了時の培地をペトリ皿に200細胞/皿で播種、7日間培養し細胞毒性を評価した。培養終了時にコロニーを固定、染色し、50細胞以上のコロニーを計数した。

また、以下の指標を計算した。

発現期間中の増殖速度 = 4日目細胞数 \times 7日目細胞数

発現期間中の相対増殖速度 = (処理群の発現期間中増殖速度 / 溶媒対照の発現期間中増殖速度) \times 100

コロニー形成能(CE)(%) = (発現期間終了後の平均生長コロニー数 / 皿 / 200) \times 100

変異の頻度 = 総変異コロニー数(耐6-TGコロニー数) / 播種数 \times CE / 10^6

【結果及び考察】

非代謝活性化条件下では、検体による細胞毒性が認められた。150 μ g/プレートでは投与直後の細胞の生存率は実質的に0となった。検体による突然変異の頻度の変化は認められなかった。一方、陽性対照のEMSでは明らかな突然変異性が認められた。

代謝活性化条件下では、濃度に依存した細胞毒性が認められた。150 μ g/mlでは投与直後の細胞の生存率は実質的に0となった。検体による生物学的に意義のある変化は認められなかった。一方、陽性対照のDMBAでは明らかな突然変異が認められた。

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変異原性を有さないものと判断される。

表 1 -S-9Mix 試験 1

	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	投与直後の 細胞生存率 (対対照%)	発現期間中の 相対細胞増殖率	コロニー 形成能	耐 6-TG コロニー総数	変異の 頻度
対照	0	95	93	77	1	0.5
溶媒対照 (DMSO)	0	100	100	78	3.5	1.9
検体	25	102	101	74	6	3.6
	50	88	118	57	7	5.1
	75	106	94	82	5	2.6
	100	57	80	80	5.5	2.9
	125	57	68	84	3	1.6
	150	0.9	-	-	-	-
陽性対照 (EMS)	900	85	48	60	1112	783

表 2 -S-9Mix 試験 2

	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	投与直後の 細胞生存率 (対対照%)	発現期間中の 相対細胞増殖率	コロニー 形成能	耐 6-TG コロニー総数	変異の 頻度
対照	0	105	108	65	4.5	2.8
溶媒対照 (DMSO)	0	100	100	78	6	33
検体	25	92	80	78	16	7.9
	50	77	90	70	9.5	5.6
	75	58	81	81	11	5.6
	100	65	97	84	5	2.5
	125	0	2.4	84	38	20
	150	0	-	-	-	-
陽性対照 (EMS)	900	37	23	67	1160	730

表 3 +S-9Mix 試験 2

	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	投与直後の 細胞生存率 (対対照%)	発現期間中の 相対細胞増殖率	コロニー 形成能	耐 6-TG コロニー総数	変異の 頻度
対照	0	73	119	83	7.5	3.8
溶媒対照 (DMSO)	0	100	100	86	4	1.8
検体	25	61	90	77	7	4.2
	50	72	135	72	11	6.1
	75	73	89	69	9	5.5
	100	65	74	71	24	13
	125	37	38	51	3.5	2.8
	150	4.3	11	64	12	7.8
陽性対照 (DMBA)	20	61	56	65	126	78

表 4 +S-9Mix 試験 2

	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	投与直後の 細胞生存率 (対対照%)	発現期間中の 相対細胞増殖率	コロニー 形成能	耐 6-TG コロニー総数	変異の 頻度
対照	0	91	106	6.7	9.5	5.7
溶媒対照 (DMSO)	0	100	100	11	18	8.7
検体	25	89	78	3.6	19	8.2
	50	74	64	4.0	10	6.7
	75	80	41	9.2	9.5	6.6
	100	104	80	6.5	18	10
	125	37	49	6.6	22	14
	150	0.4	-	-	-	-
陽性対照 (DMBA)	20	59	56	6.7	149	96