

I. 原体

(1) 急性毒性

1) ジベレリン原体のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 1)

試験機関：Merck Institute for Therapeutic Research
報告書作成年：1959年

検体の純度：

供試動物：Charles River 系ラット、1検体当り 10~30 匹（雌雄不明）、週齢不明、体重 85~140 g

観察期間：7日間

投与方法：ジベレリン酸¹⁾は 1.0%カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液に懸濁又は希水酸化ナトリウムに溶解し、ジベレリン酸カリウム²⁾は蒸留水に溶解して、金属カテーテルを用いて単回強制経口投与した。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を 7日間観察した。

結果：

投与方法	経口		
	ジベレリン酸 1.0%CMC懸濁液	ジベレリン酸希水酸化 ナトリウム溶液	ジベレリン酸 カリウム水溶液
検体			
供試動物数	20	10	30
投与量 (mg/kg)	15000	15000	15000
LD ₅₀ (mg/kg)	> 15000	> 15000	> 15000
死亡開始時間 及び終了時間	死亡例なし	死亡例なし	約 24 時間後
症状発現時間 及び消失時間	不明	不明	不明
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	不明	不明	不明
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	15000	15000	—

CMC 懸濁液及び希水酸化ナトリウム溶液では、死亡は認められず、特異的な中毒症状もみられなかった。ジベレリン酸カリウム水溶液では、興奮状態、呼吸不規則、嗜眠、虚脱及び痙攣が認められたが、これは塩であるカリウムによる影響と考えられた。

申請者注¹⁾ ジベレリン酸 (gibberellic acid) は、ジベレリン A₃ (gibberellin A₃) の別名

申請者注²⁾ ジベレリン酸カリウムは、FDA によりジベレリンと同様に食品添加物として認められている。
ナトリウム塩の比較として、カリウム塩を用いた。

1) -1 ジベレリン原体のラットにおける急性経口毒性試験 (TLT-0026)

(資料 45)

試験機関：ICI Central Toxicology Laboratory

[GLP 対応]

報告書作成年：1991 年

検体の純度：

供試動物：Alpk:APfSD 系ラット、若齢成体、体重 雄 244～276g、雌 200～224g、1 群 5 匹

観察期間：14 日間

投与方法：ジベレリン原体はヒドロキシプロピルメチルセルロースに懸濁して、プラスチックカテーテルを用いて単回強制経口投与した。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 14 日間観察した。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	0、5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄雌共 > 5000
死亡開始時間 および終了時間	死亡例なし
症状発現時間 および消失時間	症状発現なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄雌共 5000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄雌共 5000

ジベレリン原体のラットを用いた急性経口毒性試験においては、死亡は認められず、特異的な中毒症状もみられなかった。

1) -2 ジベレリン原体のラットにおける急性経口毒性試験 (TLT-0025)

(資料 46)

試験機関: Recerca Inc.

[GLP 対応]

報告書作成年: 1991 年

検体純度:

供試動物: ZML:SD 系ラット、若齢成体、体重 雄 244~258 g、雌 230~254g、1 群 5 匹

観察期間: 14 日間

投与方法: ジベレリン原体は 0.2% ヒドロキシプロピルメチルセルロースに懸濁して、金属製胃ゾンデを用いて単回強制経口投与した。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を 14 日間観察した。

結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄雌共 > 5000
死亡開始時間 および終了時間	死亡例なし
症状発現時間 および消失時間	尾部汚染、軟便
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄雌共 5000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄雌共 5000

ジベレリン原体のラットを用いた急性経口毒性試験においては、死亡は認められず、特異的な中毒症状もみられなかった。

2) ジベレリン原体のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料 2)

試験機関：Merck Institute for Therapeutic Research
報告書作成年：1959年

検体の純度：

供試動物：Carworth CF1 系雌マウス、1 検体当り 10 又は 40 匹、週齢不明、体重 16~20 g

観察期間：7 日間

投与方法：ジベレリン酸¹⁾は 1.0 %カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液に懸濁又は希水酸化ナトリウムに溶解し、ジベレリン酸カリウム²⁾は蒸留水に溶解して、金属カテーテルを用いて単回強制経口投与した。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を 7 日間観察した。試験終了時の 5 匹の生存動物について組織の肉眼的病理検査及び病理組織学的検査を行った。

結果：

投与方法	経口		
	ジベレリン酸 1.0%CMC 懸濁液	ジベレリン酸希水酸化 ナトリウム溶液	ジベレリン酸 カリウム水溶液
供試動物数	10	40	40
投与量 (mg/kg)	25000	9100~25000	5100~14000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	> 25000	15100 (13700~16600)	8500 (7400~9600)
死亡開始時間 及び終了時間	死亡例なし	1~16 時間	15~30 分
症状発現時間 及び消失時間	不明	不明	不明
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	不明	不明	不明
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	25000	9100	5100

ジベレリン酸 1.0 %CMC 懸濁液では死亡は認められず、特異的な中毒症状もみられなかった。ジベレリン酸希水酸化ナトリウム溶液では、死亡動物に投与 20~30 分後から嗜眠状態が認められた。ジベレリン酸カリウム水溶液では、興奮状態、呼吸不規則、嗜眠、虚脱ならびに死亡時に痙攣が認められたが、これらの症状は塩であるカリウムによる影響と考えられた。剖検及び病理組織学的検査では検体投与による影響は認められなかった。

申請者注¹⁾ ジベレリン酸 (gibberellic acid) は、ジベレリン A₃ (gibberellin A₃) の別名

申請者注²⁾ ジベレリン酸カリウムは、FDA によりジベレリンと同様に食品添加物として認められている。ナトリウム塩の比較として、カリウム塩を用いた。

3) ジベレリン原体のラットにおける急性経皮毒性試験

(資料9)

試験機関：(財)化学品検査協会
[GLP対応]
報告書作成年：1989年

検体の純度：

供試動物：SD系ラット、1群雌雄各5匹、6週齢、体重；雄177.0～213.8g、雌138.2～152.1g

観察期間：14日間

投与方法：検体を0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC)水溶液で30%w/vの濃度に調製し、刈毛した背部(3×4cm)に均一に塗布し、リント布で覆い、外科用テープで固定した。塗布24時間後にリント布及びテープを除去し、適用部位を注射用蒸留水を含ませた脱脂綿で拭き取った。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を14日間観察した。体重は投与日、投与後1、7及び14日に測定した。試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	0、2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄雌共 >2000
死亡開始時間 及び終了時間	死亡例なし
症状発現時間 及び消失時間	症状発現なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄雌共 2000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄雌共 2000

中毒症状及び死亡例は認められなかった。

体重及び剖検所見では検体投与による影響は認められなかった。

3) -1 ジベレリン原体のラットにおける急性経皮毒性試験 (TLT-0022)

(資料 47)

試験機関: ICI Central Toxicology Laboratory

[GLP 対応]

報告書作成年: 1991 年

検体純度:

供試動物: Alp:APfSD 系ラット、若齢成体、体重; 雄 232~246 g、雌 170~188 g、1 群雌雄各 5 匹

観察期間: 14 日間

投与方法: 検体に少量のイオン交換水を加えペースト状とし、刈毛した背部 (4×6cm) に均一に塗布し、ガーゼのうえにプラスチックフィルムで覆い、粘着性包帯で固定した。塗布 24 時間後にガーゼおよびフィルムを除去し、適用部位を清浄な温水を含ませた脱脂綿で拭き取った。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を 14 日間観察した。体重は投与日、投与後 2、3、7 および 14 日に測定した。試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結果:

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄雌共 > 2000
死亡開始時間 および終了時間	死亡例なし
症状発現時間 および消失時間	症状発現なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄雌共 2000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄雌共 2000

中毒症状および死亡例は認められなかった。

体重および剖検所見では検体投与による影響は認められなかった。

4) -1 ジベレリン原体のラットにおける急性吸入毒性試験 (TLT-0023)

(資料 48)

試験機関: Hazleton Laboratories America, Inc.

[GLP 対応]

報告書作成年: 1988 年

検体純度:

供試動物: CRL:CD BR 系ラット、雄 9 週齢、雌 10 週齢、

体重: 雄 320.8~349.1 g、雌 225.1~230.1 g、1 群雌雄各 5 匹

観察期間: 14 日間

曝露方法: Spengler 粒子生成装置を用いてダストエアロゾルを発生させ、4 時間全身曝露させた。曝露空気をガラスフィルターを用いて捕集し、化学分析により実測気中濃度を求めた。また、空気対照群を設け、空気のみを曝露させた。

曝露条件:

設定濃度 (mg/L)	69.3
実測気中濃度 (mg/L)	1.74
空気力学的質量中位径 (μm)	5.40
幾何標準偏差	1.69
チャンパー容積 (L)	100
チャンパー内通気量 (L/分)	56.0
曝露条件	ダスト 4 時間 全身曝露

観察・検査項目: 曝露前、曝露開始後 30 分、曝露終了後 1 時間、その後 14 日間は 1 日 1 回中毒症状および生死を観察した。

曝露直前、曝露終了後 7 日および 14 日目に体重を測定した。

観察期間終了時、全ての動物について肉眼的病理検査を行った。

結果:

投与方法	吸入
曝露濃度 (mg/L)	1.74
LC50 (mg/L)	雌雄共 > 1.74
死亡開始時間および終了時間	死亡例なし
症状発現および消失時間	曝露直後に立毛、流涙、鼻漏などが認められたが、曝露終了後 1 時間で流涙は消失
毒性徴候の認められなかった最高曝露濃度 (mg/L)	< 1.74
死亡例の認められなかった最高曝露濃度 (mg/L)	1.74

曝露直後に立毛、流涙、鼻漏などの症状が認められたが、曝露終了後 1 時間で消失した。体重、肉眼的病理検査において何ら特記すべき変化は認められなかった。

4) -2 ジベレリン原体のラットにおける急性吸入毒性試験 (TLT-0024)

(資料 49)

試験機関：ICI Central Toxicology Laboratory

[GLP 対応]

報告書作成年：1991 年

検体純度：

供試動物：Wistar 系ラット、雄 9 週齢、雌 10 週齢、

体重：雄 221～243 g、雌 202～217 g、1 群雌雄各 5 匹

観察期間：14 日間

曝露方法：ライトダストフィーダーを用いてダストエアロゾルを発生させ、4 時間鼻部曝露させた。

曝露空気をガラスフィルターを用いて捕集し、化学分析により実測気中濃度を求めた。また、空気対照群を設け、空気のみを曝露させた。

曝露条件：

設定濃度 (mg/L)	0, 5
実測気中濃度 (ng/L)	1.44
粒子径分布 (%)	
> 9.8 (μm)	0.7
9.8 - 6.0	2.7
6.0 - 3.5	25.8
3.5 - 1.55	31.8
1.55 - 0.93	20.4
0.93 - 0.52	11.5
< 0.52	7.2
空気力学的質量中位径 (μm)	1.69
チャンパー内通気量 (L/分)	20
曝露条件	ダスト 4 時間 鼻部曝露

観察・検査項目：曝露前、曝露中、曝露終了後、その後 14 日間は 1 日 1 回中毒症状および生死を観察した。

曝露直前、曝露終了後 1、2、7 日および 14 日目に体重を測定した。

観察期間終了時、全ての動物について肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	吸入
曝露濃度 (mg/L)	1.44
LC50 (mg/L)	雌雄共 >1.44
死亡開始時間および終了時間	死亡例なし
症状発現および消失時間	曝露直後に立毛、流涙、鼻漏などが認められたが、曝露終了後 1 時間で流涙は消失
毒性徴候の認められなかった最高曝露濃度 (mg/L)	<1.44
死亡例の認められなかった最高曝露濃度 (mg/L)	1.44

中毒症状および死亡例は認められなかった。

体重および剖検所見では検体投与による影響は認められなかった。

(2) 皮膚及び眼に対する刺激性

1) ジベレリン原体のウサギを用いた皮膚刺激性試験 (TLT-0040)

(資料 50)

試験機関: Hazleton Laboratories America, Inc.

[GLP 対応]

報告書作成年: 1988 年

検体純度:

供試動物: ニュージーランドホワイト種雌雄ウサギ、若齢成体、

体重 2412~2670g、雌雄各 6 匹

観察期間: 検体除去後 72 時間

投与方法: 検体 0.5 g を 0.9% 塩水で湿らせてガーゼ (2.5 cm 四方) に展延し、除毛した動物の背中の皮膚に閉塞貼布した。曝露時間は 4 時間とし、皮膚に残った検体は温水を含ませた紙タオルを用いて拭き取った。

観察項目: 検体除去の 30 分、24、48 および 72 時間後に適用部分の刺激性変化 (紅斑、痂皮、浮腫) の有無等を観察して Draize 法に従って採点し、一次刺激率を求めて、刺激性を評価した。また、一般症状を毎日観察した。

結果: 観察した刺激性変化の採点は以下の表のとおりである。

刺激性変化	最高 評点	検 体 除 去 後			
		1 時間	24 時間	48 時間	72 時間
紅斑、痂皮	4	0	0	0	0
浮 腫	4	0	0	0	0
合 計	8	0	0	0	0

注) 表の点数は 6 匹の平均値である。

検体除去後 72 時間の観察期間中、いずれの動物においても刺激反応は認められなかった。一次刺激率は 0 であった。

また、一般症状に特記すべき変化は認められなかった。

以上の結果から、ジベレリン原体はウサギの皮膚に対して刺激性なしと判定された。

(2) ジベレリン原体のウサギを用いた皮膚刺激性試験 (TLT-0043)

(資料 51)

試験機関: ICI Central Toxicology Laboratory

[GLP 対応]

報告書作成年: 1991 年

検体純度:

供試動物: ニュージーランドホワイト種雄性ウサギ、若齢成体、体重 3754~4425g、1 群 6 匹

観察期間: 検体除去後 72 時間

投与方法: 検体 0.5 g をイオン交換水で湿らせて外科用ガーゼ (2.5 cm 四方) に展延し、除毛した動物の背中の皮膚に閉塞貼布した。曝露時間は 4 時間とし、皮膚に残った検体は温水を含ませた脱脂綿を用いて拭き取った。

観察項目: 検体除去の 30 分、1、2 および 3 日後に適用部分の刺激性変化 (紅斑、痂皮、浮腫) の有無等を観察して Draize 法に従って採点し、一次刺激率を求めて、刺激性を評価した。また、一般症状を毎日観察した。

結果: 観察した刺激性変化の採点は以下の表のとおりである。

刺激性変化	最高 評点	検 体 除 去 後			
		0.5 時間	1 日	2 日	3 日
紅斑、痂皮	4	0	0	0	0
浮 腫	4	0	0	0	0
合 計	8	0	0	0	0

注) 表の点数は 6 匹の平均値である。

検体除去後 72 時間の観察期間中、いずれの動物においても刺激反応は認められなかった。一次刺激率は 0 であった。

また、一般症状に特記すべき変化は認められなかった。

以上の結果から、ジベレリン原体はウサギの皮膚に対して刺激性なしと判定された。

2) ジベレリン原体のウサギを用いた眼刺激性試験 (TLT-0037)

(資料 52)

試験機関: ICI Central Toxicology Laboratory

[GLP 対応]

報告書作成年: 1991 年

検体純度:

供試動物: ニュージーランドホワイト種雄性ウサギ、若齢成体、体重 3722~4643g、1 群 6 匹

観察期間: 72 時間以上

投与方法: 検体をウサギの左側下眼瞼結膜嚢に 1 匹あたり約 100mg を適用した。

観察項目: 適用 1 時間、1、2、3、4、5 および 6 日後に角膜、虹彩、結膜等の刺激性変化を観察して Draize 法に従って反応の強さを点数化して記録し、Kay and Calandra の方法により刺激性を評価した。また、一般症状を毎日観察した。

結果: 観察した刺激性変化の採点は次項の表のとおりである。

全例の結膜に発赤および浮腫、6 匹中 2 匹に分泌物が適用 1 時間後に観察された。これらの反応は適用 144 時間後には消失した。刺激性反応の平均合計点の最大値 (MMTS) は適用 1 時間後の 6.8 であった。

また、一般症状に特記すべき変化は認められなかった。

以上の結果から、ジベレリン原体はウサギの眼粘膜に対して軽度の刺激性ありと判定された。

項 目		最高 評点	適 用 後 時 間							
			1 時間	1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	6 日	
非洗眼群 (6 匹 平均)	角膜	混濁	4	0	0	0	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0	0	0	0
	虹 彩		2	0	0	0	0	0	0	0
	結膜	発 赤	3	1.2	1.3	1.0	0.83	0.5	0.2	0
		浮 腫	4	1.5	1.3	0.5	0.3	0.2	0	0
		分泌物	3	0.7	0.2	0	0	0	0	0
	合 計		110	6.8	5.6	3.0	2.3	1.4	0.4	0

2) -1 ジベレリン原体のウサギを用いた眼一次刺激性試験 (TLT-0041)

(資料 53)

試験機関: Hazleton Laboratories America, Inc.

[GLP 対応]

報告書作成年: 1988 年

検体純度:

供試動物: ニュージーランドホワイト種雌雄ウサギ、若齢成体、体重 2262~2548g、
1 群 6 匹 (雌雄各 3 匹)

観察期間: 7 日間

投与方法: 検体をウサギの片側下眼瞼結膜嚢に 1 匹あたり 0.06g を適用した。

観察項目: 適用 1、24、48、72 および 96 時間後に角膜、虹彩、結膜等の刺激性変化を観察して Draize 法に従って反応の強さを点数化して記録し、Kay and Calandra の方法により刺激性を評価した。また、一般症状を毎日観察した。

結果: 観察した刺激性変化の採点は次項の表のとおりである。

全例の結膜に発赤、浮腫および分泌物が適用 1 時間後に観察された。これらの反応は適用 7 日後には消失した。刺激性反応の平均合計点の最大値 (MMTS) は適用 1 時間後の 18.3 であった。

また、一般症状に特記すべき変化は認められなかった。

以上の結果から、ジベレリン原体はウサギの眼粘膜に対して軽度の刺激性ありと判定された。

項 目		最高 評点	適 用 後 時 間					
			1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	96 時間	
非洗眼群 (6 匹平均)	角膜	混濁	4	0	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0	0
	虹彩	2	1	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	2.8	1.7	1.0	0.5	0.5
		浮腫	4	2.0	0.8	0.3	0.2	0
		分泌物	3	1.8	0.3	0	0	0
	合 計		110	18.3	5.7	2.7	1.3	1.0

(3) 皮膚感作性

1) ジベレリン原体のモルモットを用いた皮膚感作性試験 (Maximization 法) (資料 41)

試験機関: (株) ポゾリサーチセンター
[GLP 対応]

報告書作成年: 2004 年

検体純度:

供試動物: Hartley 系雌モルモット、1 群 10~20 匹、投与開始時約 6 週齢、投与開始時体重 322~387 g

観察期間: 感作開始後 24 日間

試験操作: [Maximization 法]

投与量設定根拠:

感作: 一次感作 (皮内)

肩甲骨上を剃毛し、正中線の両側 6 箇所 (2×4 cm) にそれぞれ以下に示す 3 対の皮内投与 (0.1 mL/箇所) を行った。

上 部: Freund's complete adjuvant (FCA) と注射用水の 1:1 (v/v) 乳化液

中央部: 検体の 0.5%メタノール溶液

下 部: 検体の 1%メタノール溶液と FCA の 1:1 (v/v) 乳化液

検体非感作群には投与液の検体を除き、上記と同様に処置した。

二次感作 (経皮)

一次感作の 6 日後、肩甲骨上を再度剃毛し、10%ラウリル硫酸ナトリウム含有ワセリン 0.5 mL を適用した。その翌日、適用部位をエーテルで湿らせた脱脂綿で拭き取り、検体の 50%メタノール溶液 0.2 mL を塗布したリント布 (2×4 cm) を 48 時間閉塞貼付した。

検体非感作群にはメタノールを同様に処置した。

惹起: 二次感作の 2 週間後、左右側胸部を剃毛し、左側胸部には検体の 50%アセトン溶液を、右側胸部にはアセトンをそれぞれ 0.05 mL を、2×2 cm の範囲に 24 時間塗布した。

検体非感作群は感作群と同様に処置した。

観察項目: 惹起後 24、48 及び 72 時間に適用部位の紅斑及び浮腫の有無等を肉眼的に観察して、Magnusson and Kligman の判定基準に従って採点し、皮膚感作性の強さを評価した。その他、全動物について一般症状を毎日観察し、体重を一次感作日、二次感作日、惹起日及び観察終了日に測定した。

結 果: 各観察時間において感作変化が認められた動物数及びその評点を次表に示した。

検体感作群及び検体非感作群のいずれにも、紅斑、浮腫等の皮膚反応は認められなかった。

一般症状及び体重では何ら異常は認められなかった。

なお、本試験では陽性対照群を設定しなかったが、2,4-ジニトロクロロベンゼン (DNCB) を用いた背景データ収集試験が同研究所で定期的実施されており、モルモットの感受性に問題のないことが確認されている。

以上の結果から、ジベレリン原体は本試験条件下（Maximization 法）で皮膚感作性なしと判定した。

群	感作	惹起	供試動物数	皮膚反応	感作反応動物数												感作率 (%)						
					24 時間					48 時間				72 時間			24 時間	48 時間	72 時間	総合			
					皮膚反応 評点				計	皮膚反応 評点				計	皮膚反応 評点						計		
					0	1	2	3		0	1	2	3		0	1						2	3
検体	皮内： 0.5%検体* 経皮 50%検体*	50%検体*	20	紅斑・浮腫	20	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0/20	0	0	0	0
	皮内： メタノール 経皮 メタノール	50%検体*	10	紅斑・浮腫	10	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0/10	0	0	0	0
陽性対照 a	0.1%DNCB	0.1%DNCB	10	紅斑・浮腫	0	0	0	10	10/10	0	0	0	10	10/10	-	-	-	-	-	100	100	-	100
	オリーブ油	0.1%DNCB	5	紅斑・浮腫	5	0	0	0	0/5	5	0	0	0	0/5	-	-	-	-	-	0	0	-	0

*：ジベレリン原体

a：陽性対照については同研究所で定期的に行っている DNCB を用いた試験結果（2003 年 1 月 22 日～2 月 15 日実施）を示した。

3) -1 ジベレリン原体のモルモットを用いた皮膚感作性試験 (Maximization 法) (TLT-0044)

(資料 54)

試験機関: ICI Central Toxicology Laboratory

[GLP 対応]

報告書作成年: 1991 年

検体純度:

供試動物: Hartley 系雌モルモット、若齢成体、体重: 409~566g、1 群 20 匹 (対照群 10 匹)

観察期間: 感作開始後 24 日間

試験操作: [Maximization 法]

用量設定根拠:

感作; 一次感作 (皮内)

背部を刈毛し、正中線の両側にそれぞれ以下に示す 3 対の皮内注射 (0.1 mL/箇所) を行った。

上 部: Freund's complete adjuvant (FCA) とコーンオイル液の 1:1 (v/v) 混合物

中央部: 検体の 1% コーンオイル液

下 部: 検体を 1% で含む FCA 液とコーンオイル液の 1:1 (v/v) 混合物

対照群には投与液に検体を含まないことを除き、上記と同様に処置した。

二次感作 (経皮)

一次感作の 1 週間後、肩甲骨部に検体の 75% コーン油液 0.2-0.3 mL を含ませたる紙 (2 cm × 4 cm) を 48 時間閉塞貼付した。

対照群にはコーンオイル液を用いて同様に処置した。

惹起: 二次感作の 2 週間後、刈毛した左腹側部に検体の 75% (w/v) コーンオイル液および右腹側部に検体の 30% コーンオイル液 0.05-0.1 mL を含ませたる紙 (1 cm × 1.5-2 cm) を 24 時間閉塞貼付した。貼布除去時には、適用部位を温水を含ませた脱脂綿で拭き取った。

観察項目: 惹起貼付除去の 24 および 48 時間後に適用部位の紅斑および浮腫の有無等を肉眼的に観察して、以下の基準に従って採点した。

評点	判定基準
0	変化なし
1	境界不明瞭 (軽度) な反応を示す
2	境界明瞭 (中等度) な反応を示す
3	強度な反応を示す

陽性反応 (評点 1~3) を示した動物の比率 (陽性率) から Magnusson and Kligman の判定基準に従って皮膚感作性の強さを評価した。

その他、全動物について、感作開始時および最終観察終了時に体重を測定した。

結 果: 観察時に皮膚反応が認められた動物数を次頁の表に示す。

群		感作	誘発	供試動物数	感作反応動物数						陽性率 (%)					
					24 時間後			48 時間後			24 時間	48 時間				
					皮膚反応評点*				計	皮膚反応評点*						
					0	1	2	3		0	1	2	3			
検体	I	75% 検体	30% 検体	20	19	1	0	0	1/20	20	0	0	0	0		
	II	コーン油	30% 検体	10	10	0	0	0	-	10	0	0	0	-		
陽性対照	III	0.3% FA	30% FA	20	0	1	7	12	20/20	1	4	8	7	20/20	90	90
	IV	コーン油	30% FA	10	9	1	0	0	-	9	1	0	0	-	-	

* : 0: 無反応、1: まばらな軽い紅斑、2: 中等度の紅斑、3: 強度の紅斑及び浮腫

検体除去 24 時間後に、まばらな軽い紅斑が I 群 (ジベレリン感作群) で 1 例に認められたが、II 群 (ジベレリン非感作群) および III 群 (無処置群) においては異常は全くみられなかった。一般症状および体重では異常は認められなかった。

以上の結果から、ジベレリン原体は本試験条件下で軽度の皮膚感作性を有さないと結論した。

(4) 急性神経毒性

急性経口毒性試験等で特異的な神経毒性を示唆する所見はなんら認められなかったことから、試験省略。

1. 急性経口毒性試験

ラットの急性経口毒性試験は、ジベレリン酸¹⁾をそれぞれ1.0%カルボキシメチルセルロース(CMC)水溶液に懸濁、希水酸化ナトリウムに溶解、またジベレリン酸カリウムの水溶液として、15000 mg/kgの用量にて実施された。ジベレリン酸については、死亡例は認められなかった。ジベレリン酸カリウムは24時間後に死亡例が観察され、興奮状態、嗜眠、虚脱及び痙攣が認められたが、これらはカリウムの影響と考えられ、特異的な神経系への影響とは考えられなかった。

2. ラットの90日間反復経口投与毒性試験

現行の神経毒性試験ガイドラインにおいて、外観、体位、姿勢、自律神経機能、歩行の異常、動物の取り扱い操作や環境刺激に対する反応、神経系及び異常行動について、詳細な状態の観察が求められている。

一般毒性試験における一般症状観察では、本剤の投与によって、5000 ppm 投与群では検体投与に関連した死亡例は認められず、特異的な神経毒性は認められていない。その他、いずれの観察項目にも本剤が関連したと思われる影響は認められていない。なお、機能検査の一貫としての自発運動量、刺激に対する感覚運動反応及び握力検査は実施されていない。

神経毒性に関わる坐骨神経、脳、下垂体、脊髄及び眼球及びその付属器における病理組織学的検査では本剤が関連したと思われる異常所見は認められていない。また、脳重量が測定されているが影響は認められなかった。

3. 既知神経毒性物質との化学構造の相関

既知神経毒性物質との化学構造に相関はないものと思われる。

4. 考察・結論

ラット急性経口毒性試験において、特異的な神経系への影響は認められなかった。

90日間反復経口投与毒性試験においても特異的な神経毒性を示唆する所見は何ら認められていない。また、化学構造も既知神経毒性物質と相関がないことも合わせ考慮すると、本剤には特異的な神経毒性作用はないものと判断される。

以上のことから、ジベレリンの急性神経毒性試験実施の必要性はないものと考えられた。

(5) 急性遅発性神経毒性

当該原体はりん酸エステル系化合物でなく、かつ、コリンエステラーゼ阻害活性を有しないため、試験省略。

¹⁾ ジベレリン酸 (gibberellic acid) は、ジベレリン A₃ (gibberellin A₃) の別名

(6) 90日間反復経口投与毒性

1) ジベレリン原体のラットを用いた飼料混入投与による15週間反復経口投与毒性試験(資料24)

試験機関: Merck Institute for Therapeutic Research

報告書作成年: 1959年

検体純度:

供試動物: Holtzman系ラット、1群雌雄各9匹

開始時体重; 試験区I雄 187~282g、雌 162~187g

試験区II雄 262~342g、雌 168~227g

試験区III雄 252~349g、雌 183~227g

投与期間: 試験区I; 5週間、試験区II; 10週間、試験区III; 15週間

投与方法: 検体を50000ppmの濃度で飼料に混入し、5、10または15週間にわたって随時摂食させた。

用量設定根拠:

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。

投与群に軟便が認められたが下痢症状は認められなかった。

検体投与に関連した死亡例は認められなかった。50000ppm群の雄4例及び雌1例、対照群の雄2例が期間中に死亡したが、感染によるものであり、偶然であると考えられる。

体重変化; 週1回測定した。

検体投与は雌雄ラットの体重増加に何の影響も認められなかった。

摂餌量; 週2回測定した。

投与開始初期には、検体投与群の摂餌量は対照群に比較してやや少なかったが、これは検体混入による飼料の変化を反映したと考えられ、検体が摂餌量に毒性学的に意義のある影響をもたらしたという確かな徴候は認められなかった。

検体摂取量; 投与期間中の平均検体摂取量は以下のとおりであった。

		I	II	III
検体摂取量 ^a (mg/kg/day)	雄	3169	2775	2673
	雌	3500	3415	3246

血液学的検査; 投与開始前、投与5、8及び12週時に各群雌雄各6~8匹を対象として、以下の項目の測定を行った。

赤血球数、網赤血球数、総白血球数、好中球数、好酸球数、リンパ球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、沈降速度

検体の影響に関連づけられるような顕著な変化はみられなかった。

臓器重量; 各投与期間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。

肺、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、甲状腺、卵巣、子宮、精巣、前立腺、精巣上体、精嚢、下垂体、脳

検体投与が臓器重量に変化をもたらしたという徴候はみられなかった。

肉眼的病理検査; 全動物を対象に、肉眼的病理検査を実施した。

途中死亡動物の検査では、検体投与の影響と考えられる病変は認められなかった。

I~IIIのいずれの群においても、50000ppm群の盲腸内容物は対照群よりも軟らかく、大腸も拡張していたが、これは検体の浸透効果によるものと考えられた。

^a 申請者注: 申請者が各週平均体重と平均摂餌量から週毎の検体摂取量を算出し、投与期間中の平均値を算出した。その際に用いた平均摂餌量は、飼料がこぼれた動物を除外して算出したもの。

病理組織学的検査；投与期間終了時に肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、以下の組織について病理標本を作成し、検鏡した。

皮膚、骨格筋、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣、子宮、胃、小腸、大腸、唾液腺、胸腺、膵臓、副腎、甲状腺、上皮小体、リンパ節、脾臓、肝臓、腎臓、膀胱、大動脈、心臓、肺、骨髄、下垂体、脳

雌雄ともに検体投与による組織形態学的変化の徴候は観察されなかった。

以上の結果から、本剤のラットに対する 15 週間飼料混入による反復経口投与毒性試験について、50000 ppm 投与では、雌雄ともに検体の影響が認められなかったので、無毒性量は雌雄とも 50000 ppm（雄；2673 mg/kg/day、雌；3246 mg/kg/day）であると判断される。

申請者注：軟便に関しては、50000 ppm 投与群において検体投与の影響が否定できないため、本試験からは NOAEL は導き出せないと判断した。

1) -1 ジベレリン原体のラットを用いた3ヶ月間反復経口投与毒性試験 (TLT-0045) (資料 55)

試験機関: Bio/ dynamics Inc. [GLP 対応]

報告書作成年: 1990 年

検体純度:

供試動物: Sprague-Dawley 系ラット[CD]、1 群雌雄各 10 匹、

開始時 6 週齢、投与開始時の体重範囲 雄: 177~225g、雌: 127~161g

投与期間: 3 ヶ月 (1989 年 8 月 15 日~1989 年 11 月 15 日)

回復期間: 4 週間 (1989 年 11 月 16 日~1989 年 12 月 12 日)

投与方法: 検体を 0、1000、10000 および 50000 ppm の濃度で飼料に混入し、3 ヶ月にわたって摂食させた。検体を混入した飼料は 1 週間ごとに調製した。

観察・検査項目および結果:

一般状態および死亡率: 一般状態および生死を毎日観察した。

50000ppm 群において投与 5~13 週に軟便が雌雄各 1~4 例に認められた。回復期間中に軟便は認められなかった。その他、一般状態については、雌雄いずれの投与群においても検体投与に関連する異常は認められなかった。

いずれの投与群においても死亡は認められなかった。

体重変化: 投与前および投与期間中の全動物の体重を毎週測定した。Dunnett の多重比較法で検定した。

平均体重は、対照群と比較して投与群がわずかに低値 (5%以内) であったが、統計学的な有意差は認められなかった。

回復期間において、対照群および高用量群の体重は増加した。

摂餌量および食餌効率: 全動物の摂餌量を週 1 回測定し、食餌効率も算出した。

食餌効率において対照群と比べ統計学的有意差の認められた週を下表に示す。

(g diet/kg b.w.)

性別	雄				雌				
	0	1000	10000	50000	0	1000	10000	50000	
投与量 (ppm)									
投与週	9	57.4		↑ 65.9	69.8	↑ 75.6	↑ 77.0	↑ 80.8	
	10	56.2		↑ 65.4	71.7		↑ 78.5	↑ 81.6	
	11	53.8		↑ 62.6	68.3		↑ 77.1	↑ 79.7	
	12	53.4		↑ 58.4	↑ 62.4	67.7	↑ 77.6	↑ 78.2	
	13	50.4		↑ 55.0	↑ 59.9	66.7	↑ 73.0	↑ 77.4	
	14	51.5	-	-	↑ 59.4	61.2	-	-	↑ 74.8
	15	52.8	-	-	↑ 56.5	64.5	-	-	↑ 73.2
	16	55.5	-	-	↑ 58.6	73.2	-	-	↑ 81.3
	17	51.4	-	-	↑ 54.8	65.9	-	-	↑ 75.7

有意差の検定は、Dunnettの多重比較法を用いて行った (↑: $p \leq 0.05$, ↑↑: $p \leq 0.01$)。

投与9週目以降において雌雄の中間用量群以上で、食餌効率が有意に増加した。

これらは、被験物質の餌中濃度が高いために栄養源を補うために摂餌量が増加したか、あるいは体重の減少に伴う変化と推察された。

検体摂取量：投与期間中の検体摂取量は以下の通りであった。

投与量(ppm)		1000	10000	50000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	69.7	703.7	3742.7
	雌	86.9	871.2	4436.0

血液学的検査：投与前、投与終了時および回復期間終了時に全生存動物を対象として、血液を採取し、以下の項目の測定を行った。

ヘマトクリット値、血色素量、赤血球数、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、血小板数、白血球数、白血球分類、プロトロンビン時間、活性化部分ロンボプラスチン時間

いずれの投与群の雌雄においても検体投与に関連すると考えられる有意な変化はなかった。

血液生化学的検査：血液学的検査で採取した血液の一部から得られた血漿を用い、以下の項目の測定を行った。

アルカリホスファターゼ、グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ、クレアチニン、尿素窒素、総蛋白、アルブミン、グロブリン、アルブミン/グロブリン比 (A/G 比)、血糖、総コレステロール、総ビリルビン、カルシウム、無機リン、ナトリウム、カリウム、塩素

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		
	1000	10000	50000	1000	10000	50000
投与量 (ppm)						
グロブリン			↓ 86			
尿素窒素						↑ 126

有意差の検定は、Dunnnettの多重比較法を用いて行った

(↑↓: $p \leq 0.05$;、↑↓: $p \leq 0.01$)。

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示した。

50000ppm群の雌において、尿素窒素が対照群と比較して有意に増加し、検体投与による腎機能への影響が示唆されたが、回復期間終了時には対照群と同等となったことから検体投与の中止により回復するものと考えられた。

その他、50000ppm群の雄でグロブリンが対照群と比較して有意に減少したが、本変化には毒性学的な意義はないものと考えられた。

尿検査：血液学的検査と同時期に採取した尿について以下の項目を検査した。

pH、蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビン、亜硝酸塩、潜血、尿比重、外観

いずれの投与群の雌雄においても検体投与に関連すると考えられる有意な変化はなかった。

眼科学的検査：投与13週時および回復期間終了後に眼科学的検査を実施した。

検体投与に関連のある変化は認められなかった。

臓器重量：投与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、相対重量も算出した。

脳、肝臓、腎臓、副腎、精巣、子宮

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		
	1000	10000	50000	1000	10000	50000
投与量 (ppm)						
体重						↓ 113
副腎	相対重量				↑ 124	
肝臓	相対重量		↑ 110		↑ 113	↑ 128
腎臓	相対重量					↑ 120
回復期間終了後						
肝臓	相対重量	-	-	-	-	↑ 111

有意差の検定は、Dunnnettの多重比較法を用いて行った

(↑↓: $p \leq 0.05$ 、↑↓: $p \leq 0.01$)。

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したものの。

50000ppm群の雌雄および10000ppm群の雌で肝臓の相対重量が有意に増加した。

これらは、体重の低値に伴う変化によるものと考えられた。

回復期間終了後の50000ppm群の雌の肝臓の相対重量も有意に増加したが、検体投与終了後と比較して対照群との差が小さくなったことから、回復性があるものと考えられた。

肉眼的病理検査および組織学的病理検査のいずれにおいても検体投与に関連する肝臓の変化は認められなかった。

このことから、肝臓の相対重量の増加は、検体投与による肝臓の適応性変化であると考えられた。

50000ppm群の雌の腎臓で相対重量が有意に増加したが、回復期間終了後には影響が認められなかった。同群の雌では尿素窒素の高値もあったが、投与の終了により腎機能の回復が示唆された。50000ppm群の雌以外の投与群においては、同様な変化が認められなかった。また、肉眼的病理検査および組織学的病理検査のいずれにおいても検体投与に関連する腎臓の変化は認められなかった。

肉眼的病理検査：全ての動物について剖検を行った。

検体投与に関連する変化は認められなかった。

病理組織学的検査：肉眼的病理検査を実施した対照群及び最高用量群の全動物を対象として、以下の組織について病理標本を作製し検鏡した。

脳（大脳、小脳、橋および延髄）、脊髄（頸部、胸部および腰部）、坐骨神経（片側）、下垂体、胸腺、甲状腺（両側）、上皮小体（両側）、副腎（両側）、脾臓、骨および骨髄（胸骨、片側大腿骨および椎骨3カ所）、リンパ節（頸部および腸間膜）、心臓、大動脈、唾液腺（顎下腺および舌下腺）、舌、食道、胃（前胃および腺胃）、肝臓、膵臓、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、頭部（鼻腔および副鼻腔を含む）、咽頭、喉頭、気管、肺、腎臓（両側）、膀胱、精巣（両側）、精巣上体（両側）、前立腺、精のう（両側）、凝固腺（両側）、卵巣（両側）、子宮（角部および頸部）、瞳、眼球（網膜および視神経を含む、両側）、ハーダー腺（両側）、外涙腺（両側）、下腿三頭筋（片側）、皮膚（腰背部）、乳腺（腹部、雌のみ）、肉眼的異常部位

いずれの投与群においても、検体投与に関連する変化は認められなかった。

以上の結果から、本剤のラットに対する飼料混入投与による90日間反復投与毒性試験における影響として、50000ppm群の雌雄において軟便、雌の尿素窒素の増加および腎臓の相対重量の増加が認められた。

したがって、最大無作用量（NOEL）は10000ppmと考えられたが、50000ppm群における変化はわずかで、病理検査においても変化が認められなかったことから、本剤のラットに対する最大無毒性量（NOAEL）は、雌雄とも50000ppm（雄：3743 mg/kg/day、雌：4436 mg/kg/day）であると判断された。

2) ジベレリン原体のマウスを用いた飼料混入投与による 90 日間反復経口投与毒性試験 (資料 25)

試験機関 : (財) 残留農業研究所
報告書作成年 : 1972 年

検体純度 :

供試動物 : ICR 系 SPF マウス、1 群雌雄各 10 匹、開始時 5 週齢、体重 ; 雄 26.8~27.3 g、雌 23.5~23.8 g

投与期間 : 13 週間

投与方法 : 検体を 3000、10000、30000 及び 100000 ppm の濃度で飼料に混入し、13 週間にわたって随時摂食させた。

用量設定根拠 :

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。

100000 ppm 群の雌雄で、投与開始翌日より軟便が観察され、4 日目頃より軟便による肛門のし開が認められて試験終了時まで継続した。また、軟便による被毛の汚染がみられ、85 日以降には雌の軟便中に血液様物の混合が認められた。30000 ppm 群には軽度の軟便が認められたが、10000 ppm 以下の群では便に異常は認められなかった。

100000 ppm 群の雌雄各 1 例がそれぞれ投与 82 及び 90 日目に死亡したが、他の投与群では死亡例はなかった。雌の死亡例は共食いのため病理検査ができなかったが、雄の死亡例については病理組織学的検査を行い、類白血病変化が認められた。この例の脾臓はやや腫大し、骨髓細胞性の幼若細胞を主体とした増生が認められた。

体重変化 ; 週 1 回測定した。

100000 ppm 群の雌雄で、体重増加抑制が認められた。3000 及び 10000 ppm 群の雌雄では、軽度の体重増加傾向がみられた。体重変化を次表に示した。

検査時期	投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	3000	10000	30000	100000	3000	10000	30000	100000
1 週目	103	105	100	85	105	105	104	87
2 週目	105	107	102	84	105	96	96	72
3 週目	105	106	103	84	108	108	107	87
4 週目	104	107	101	83	111	106	103	82
5 週目	103	107	99	83	106	106	104	86
6 週目	104	108	100	82	109	104	102	86
7 週目	104	108	97	83	107	104	95	87
8 週目	105	110	97	80	106	107	99	85
9 週目	106	111	100	76	103	108	100	79
10 週目	107	112	98	76	106	106	99	73
11 週目	108	113	99	74	107	110	104	73
12 週目	108	120	101	67	107	108	100	73
13 週目	109	117	101	67	110	111	102	76

表中の数値は変動の目安として、対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

対照群との有意差検定は実施しなかった。

摂餌量及び食餌効率 ; 週 4 回測定した。これらの変化を次表に示した。

100000 ppm 群の雌雄では、投与開始より 2 週時まで摂食忌避傾向がみられたが、3 週以降は回復した。しかし、雄では 8 週以降においても摂餌量の軽度の減少が認められた。食餌効率は

100000 ppm 群の雌雄で顕著な低下がみられ、3000 及び 10000 ppm 投与群の雌雄では増加傾向が認められた。

項目	検査時期	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		3000	10000	30000	100000	3000	10000	30000	100000
摂餌量	1 週目	104	98	105	70	104	102	96	54
	2 週目	114	112	120	90	102	98	93	70
	3 週目	115	106	117	102	116	105	95	105
	4 週目	102	100	104	104	102	108	115	106
	5 週目	96	96	94	102	100	94	110	104
	6 週目	102	100	104	98	96	98	107	115
	7 週目	102	98	91	93	109	104	104	113
	8 週目	100	102	100	87	98	102	113	96
	9 週目	104	93	96	81	109	107	109	104
	10 週目	110	98	100	85	107	107	109	100
	11 週目	106	98	102	83	90	92	98	80
	12 週目	104	96	100	83	98	110	112	114
	13 週目	98	91	98	87	102	105	120	129
食餌効率	1~13 週	118	142	103	21	127	127	103	30

表中の数値は変動の目安として、対照群を 100 とした場合の値を表したもの。
対照群との有意差検定は実施しなかった。

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は以下のとおりであった。

投与量 (ppm)		3000	10000	30000	100000
検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	410	1250	4190	15160
	雌	420	1420	4580	17600

飲水量；週 4 回測定した。

100000 ppm 群の雌雄に投与 3 週時より試験終了時まで飲水量の増加が認められ、30000 ppm 群の雌雄にも軽度の増加が認められた。これらの変化を次表に示した。

検査時期	投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	3000	10000	30000	100000	3000	10000	30000	100000
1 週目	107	110	114	96	103	111	108	87
2 週目	115	117	128	118	109	103	100	97
3 週目	114	113	131	141	103	99	114	122
4 週目	106	100	111	134	104	106	120	138
5 週目	99	103	110	146	96	101	117	134
6 週目	110	107	126	140	105	104	125	147
7 週目	110	103	125	153	106	110	124	164
8 週目	104	101	121	133	106	108	132	153
9 週目	107	92	115	133	108	115	132	150
10 週目	107	96	119	129	106	107	128	149
11 週目	103	92	111	126	103	153	130	162
12 週目	97	96	116	139	102	113	133	170
13 週目	115	90	116	151	108	111	138	177

表中の数値は変動の目安として、対照群を 100 とした場合の値を表したもの。
対照群との有意差検定は実施しなかった。

血液学的検査；投与 91 日目に全生存動物を対象として、後大動脈から血液を採取し、以下の項目の測定を行った。

白血球数、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値

また、尾静脈血を用いて白血球百分率を検査した。対照群と比べて差の認められた項目を次表に示す。

項目	投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	3000	10000	30000	100000	3000	10000	30000	100000
赤血球数	102	100	105	98	102	↑110	↑120	↑135
ヘモグロビン濃度	101	101	109	101	101	104	↑108	↑107
ヘマトクリット値	102	100	100	95	102	105	105	105
白血球数	93	84	↓66	↓69	108	94	133	↑225
リンパ球比率	101	101	92	78	107	112	107	103
好中球比率	108	108	162	277	77	64	73	86

対照群との有意差検定法は不明 (↑↓: $p < 0.05$, ↑↓: $p < 0.01$)。

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

赤血球数は 10000 ppm 以上の投与群の雌で検体濃度の増加に伴って増加し、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値もそれに伴って若干上昇した。白血球数は 30000 ppm 以上の投与群雄で減少し、雌では増加傾向が観察された。白血球百分率においては 30000 及び 100000 ppm 群雄で好中球比率の増加とリンパ球比率の減少が認められた。

申請者注；10000 ppm 群雌の赤血球数の有意な増加は、ヘモグロビン濃度の有意な変化を伴っておらず、毒性学的に意義がないと考えられた。

血液生化学的検査；血液学的検査で使用した血液から得られた血漿を用い、以下の項目の測定を行った。

総蛋白、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(ALP)、尿素窒素
対照群に比べ差のみられた項目を次表に示す。

項目	投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	3000	10000	30000	100000	3000	10000	30000	100000
GPT	97	97	115	▼69	164	103	100	83
ALP	110	148	130	115	↑148	↑155	133	112
総蛋白	106	104	98	↓92	111	111	113	96

対照群との有意差検定法は不明 (↑↓: $p < 0.05$, ▲▼: $p < 0.01$)。

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したものを。

雄では、100000 ppm 群の総蛋白がやや低下した他には特に異常は認められなかった。雌では、3000 及び 10000 ppm 群において ALP の上昇がみられたが、30000 ppm 以上の投与群では 3000 及び 10000 ppm 群よりも低下し、検体濃度との関連性はみられなかった。

申請者注；100000 ppm 群の雄では GPT の有意な低下もみられた。しかし、100000 ppm 群の雄でみられた総蛋白及び GPT の低下は用量相関性が明確でないことから、検体投与に関連がないと考えられた。

尿検査；投与 91 日目の全生存動物を対象として、以下の項目の測定を行った。

pH、蛋白、糖、ケトン体、潜血

検体投与に関連のある変化は認められなかった。

臓器重量；投与期間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、対体重比も算出した。

脳、下垂体、甲状腺、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣、卵巣、腓腹筋/ヒラメ筋

対照群と比べて差の認められた項目を次表に示す。

100000 ppm 群の雄では体重の減少に伴う心臓、胸腺、肝臓、腎臓の重量減少が著しく、100000 ppm 群の雌では体重の減少に伴う胸腺、肝臓の重量減少に有意差がみられた。

対体重比では 100000 ppm 群の雄で脳、脾臓、副腎及び精巣等が増加し、同群雌では脳、下垂体、甲状腺、心臓、腎臓、脾臓、卵巣等にやや増加が認められた。

項目	投与量 (ppm)								
	雄				雌				
	3000	10000	30000	100000	3000	10000	30000	100000	
最終体重	109	↑117	101	↓67	110	111	102	↓76	
心臓	重量	109	106	102	↓77	↑110	↑116	108	93
	対体重比 ^a	98	90	100	115	100	106	106	124
胸腺	重量	105	↑159	92	↓64	108	121	100	↓74
	対体重比 ^a	95	135	91	95	93	107	93	93
肝臓	重量	108	121	92	↓63	↑113	106	100	↓81
	対体重比 ^a	99	103	90	94	103	96	98	107
腎臓	重量	102	101	94	↓64	↑113	↑117	↑115	95
	対体重比 ^a	94	86	93	95	103	106	112	125
脳	重量	98	102	102	97	103	108	106	103
	対体重比 ^a	90	88	101	146	93	97	103	136
下垂体	重量	91	81	103	75	95	114	100	100
	対体重比 ^a	83	70	101	113	87	103	97	133
甲状腺	重量	102	108	110	85	108	125	94	108
	対体重比 ^a	93	93	110	128	98	113	92	143
脾臓	重量	108	111	91	111	113	111	110	104
	対体重比 ^a	100	96	92	168	103	103	110	138
副腎	重量	93	104	99	107	100	115	100	82
	対体重比 ^a	87	87	100	160	89	104	96	107
精巣/ 卵巣	重量	101	114	107	98	92	89	104	87
	対体重比 ^a	92	96	106	145	82	80	100	114

対照群との有意差検定法は不明 (↑↓: $p < 0.05$, ↑↓: $p < 0.01$)。

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したものを。

a: 申請者注: 対体重比は平均最終体重と平均臓器重量から算出し、統計解析は行っていない。

肉眼的病理検査; 全動物を対象に、肉眼的病理検査を実施した。

100000 ppm 群の雌雄で盲腸の膨大が認められた。

病理組織学的検査; 全動物を対象として、以下の組織について病理標本を作成し、検鏡した。

大脳、小脳、延髄、下垂体、甲状腺、胸腺、肺、心臓、肝臓、脾臓、胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸、腎臓、副腎、精巣、精囊、前立腺、卵巣、子宮、骨髄 (大腿骨)、腓腹筋、ヒラメ筋

100000 ppm 群の雄 2 例で、脾臓に髄外造血の著しい亢進が認められ、そのうち 1 例は類白血病性変化であった。その他には検体投与に関連する変化は認められなかった。

雌においては ICR 系マウスによく見られる副腎皮髄間の空胞形成が各群に散在していたが、検体投与に関連した変化は認められなかった。

申請者注: 病理組織学的検査においては、統計処理は行われていない。

以上の結果から、マウスに対する飼料混入による 13 週間反復経口投与毒性試験における本剤の影響として、100000 ppm では雌雄各 1 例が死亡し、軟便、体重の減少、摂餌量の変化、食餌効率の低下、飲水量の増加、血液学的変化 (雄では白血球数の減少、白血球分画の変化、雌では白血球数、赤血球数の増加)、臓器重量の減少 (雄では心臓、胸腺、肝臓、腎臓等の減少、雌では胸腺、肝臓の減少)、盲腸の膨大、髄外造血亢進が認められた。30000 ppm 群でも軽度の軟便、軽度の摂水量

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

増加及び血液学的変化（雄では白血球数の減少、白血球分画の変化、雌では白血球数、赤血球数の増加等）が認められたことから、無毒性量は 10000 ppm（雄：1250 mg/kg/day、雌：1420 mg/kg/day）であると判断される。

- (6) 90日間反復経口投与毒性
 イヌの90日間反復経口投与毒性試験
 (11) 1年間反復経口投与毒性及び発がん性試験
 マウスの1年間反復経口投与毒性/発がん性併合試験
 イヌの1年間反復経口投与毒性/発がん性併合試験

当該農薬の成分物質等の種類から見て、その毒性がきわめて弱いことの理由により安全と認められることから、試験省略可能と考えられた。

以下、関連する文献から、考察を行った。

ジベレリンは植物体内に内生する“植物ホルモン”(生理活性物質)であり、微量で植物の生理作用を調節するものである。類縁化合物は100種類を超え、多岐にわたる植物、食用作物に含まれていることが報告されている(表1)。^{1),2)}

表1 ジベレリン A₃ が含まれている植物の一覧表

植物(学名)	和名(一般名)	部位	報告者(報告年)	文献
<i>Abelmoschus esculentus</i>	オクラ	未熟種子	Koshioka <i>et al.</i> (1996)	A,B
<i>Artemisia capillaris</i>	カワラヨモギ	葉	Ueda <i>et al.</i> (1987)	A
<i>Avena sativa</i>	燕麦	花序	Kaufman <i>et al.</i> (1976)	A
<i>Brassica napus</i>	アブラナ	茎	Rood <i>et al.</i> (1987)	A
		未熟長角果	Zanewich, Rood (1993)	A
<i>Camellia sinensis</i>	茶	内胚乳	Koshioka <i>et al.</i> (1993)	A
<i>Carica papaya</i>	パパイヤ	果実, 花梗	Dathe <i>et al.</i> (1991)	A
<i>Carthamus tinctorius</i>	紅花	茎	Potter <i>et al.</i> (1993)	A
<i>Citrus sinensis</i>	オレンジ	果実	Turnbull (1989)	A
<i>Cucumis melo</i>	メロン	成熟種子	Hemphill <i>et al.</i> (1972)	A
<i>Cucumis sativus</i>	キュウリ	成熟種子	Hemphill <i>et al.</i> (1972)	A
<i>Hordeum vulgare</i>	大麦	発芽種子	Yamada (1982)	A
		未熟種子	Boother <i>et al.</i> (1991)	A
		葉鞘	Croker <i>et al.</i> (1990)	A
<i>Ipomoea batatas</i>	サツマイモ	未熟種子	Matsuo <i>et al.</i> (1984)	A
<i>Lactuca sativa</i>	レタス	シュート	Wacott <i>et al.</i> (1991)	A
<i>Lycopersicon esculentum</i>	トマト	培養根	Butcher <i>et al.</i> (1988)	A
		葉+シュート先端	Grunzweig <i>et al.</i> (1997)	A
<i>Malus domestica</i>	りんご	未熟種子	Hedden <i>et al.</i> (1993)	A
<i>Pennisetum glaucum</i>	トウジンビエ	シュート	Devi <i>et al.</i> (1984)	A
<i>Phaseolus coccineus</i>	ベニバナインゲン	未熟種子	Durley <i>et al.</i> (1971)	A
<i>Phaseolus lunatus</i>	ライマメ	茎, 根粒	Dobert <i>et al.</i> (1992a)	A
<i>Pisum sativum</i>	エンドウ	莢, 胚珠	Garcia-Martinez <i>et al.</i> (1991)	A
<i>Prunus cerasus</i>	マラスカチェリー	未熟種子	Nakayama <i>et al.</i> (1996)	A
<i>Raphanus sativus</i>	ダイコン	成熟種子	Nakayama <i>et al.</i> (1998)	A
<i>Saccharum spp</i>	サトウキビ	頂点	Kuhnle <i>et al.</i> (1983)	A

¹⁾ J. MacMillan: *J. Plant Growth Regul.*, 20, 387-442 (2002)
 (http://www.plant-hormones.info/occurrence_of_gas_in_plants.html)

²⁾ 腰岡政二: *植物の生長調節*, 39(1), 1-9 (2004)

植物(学名)	和名(一般名)	部位	報告者(報告年)	文献
<i>Secale cereale</i>	ライ麦	植物体	Eckert <i>et al.</i> (1978)	A
<i>Sechium edule</i>	ハヤトウリ	種皮	Albone <i>et al.</i> (1984)	A
<i>Sorghum bicolor</i>	もろこし	シュート	Beall <i>et al.</i> (1991)	A
<i>Triticum aestivum</i>	小麦	葉, 根	Eckert <i>et al.</i> (1978)	A
		葉, 茎	Jensen, Junttila (1987)	A
		シュート	Appleford, Lenton (1991)	A
		肥大節間	Webb <i>et al.</i> (1998)	A
		幼若穂	Webb <i>et al.</i> (1998)	A
<i>Vigna unguiculatum</i>	ササゲ	葉+葉柄+上胚軸	Garcia-Martinez <i>et al.</i> (1987b)	A
		茎	Dobert <i>et al.</i> (1992b)	A
<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	シュート	Fujioka <i>et al.</i> (1988b)	A
		毛	Murofushi <i>et al.</i> (1991)	A
<i>Allium wakegi</i>	ワケギ	-	Yamazaki <i>et al.</i> (2002)	B
<i>Camellia sinensis</i>	チャ	-	Koshioka <i>et al.</i> (1993)	B
<i>Prunus persica</i>	モモ	-	Nakayama <i>et al.</i> (2001)	B
<i>Saccharum spp.</i>	サトウキビ	-	Moore <i>et al.</i> (1986)	B

さらに、ジベレリン A₃ 量の植物体内での生育期による量的な変動についての報告もされている。以下に、比較的摂取量の多い作物を例に挙げた。

① 稲³⁾

供試品種 農林 29 号

乾燥種子からは検出されないが、吸水させると、4 日目～8 日目にかけて急激にジベレリン A₃ 含量が増加した。

茎葉中のジベレリン活性は 0.1～0.4 μg/100 g であり、栽培時の生育ステージで見ると、最高分けつ期頃に最大に達する。穂中のジベレリン A₃ 含量は出穂期に急激に増加し、0.5 μg/100 g に達し、その後減少する。

② いんげん⁴⁾

供試品種 マントル、マスターピース (矮性)、ケンタッキーワンダー (つる性)

3 つの品種のインゲンについて、莢の成熟過程におけるジベレリン A₃ の消長を調べた。

著者の先の検討でマントルについては、完熟風乾した莢中にも多量のジベレリンが含まれ、莢の生長最盛期前後と比べて、ほとんど濃度の低下がないことが報告されている⁵⁾。また、ケンタッキーワンダーにおいては、種子に多量のジベレリン A₃ が含まれることも報告されている⁶⁾。

ケンタッキーワンダーについても、マントルと同様の推移を示した。

マスターピースについては、収穫適期でジベレリン A₃ は 4.2 μg/g 乾物重を示し、その後は急激に減少した。

³⁾ Akio OSADA, Hiroshi SUGE, Saburo SHIBUKAWA and Iwao NOGUCHI ; Changes of Endogenous Gibberelins in Rice Plants as Affected by Growth Stage and Different Growth Conditions; *The Crop Science Society of JAPAN*, 42(1), 41-45(1973)

⁴⁾ 太田敏郎; インゲン 3 品種の莢に含まれるジベレリン含量の変化; *Jour. Crop Sci.*, 48(2), 249-253 (1979)

⁵⁾ 太田敏郎; 作物遺体中のジベレリン、イネ、オオムギのわら、インゲンの完熟莢、及び脱落子葉中に含まれるジベレリンについて; *日作紀*, 47, 581-586(1978)

⁶⁾ Gotoh, N ; A Comparison of gibberellin-like substances in germinating dicotyledons of tall and dwarf varieties of *Phaseolus vulgaris* L. ; *Plant and Cell Physiol.*, 11, 355-359(1970)

③ねぎ⁷⁾

供試品種 長悦、晚中太、吉晴（晚ねぎ）

鳥取県園芸試験場弓浜砂丘地分場の砂畑圃場で栽培し、通常の収穫期に収穫し、葉鞘と葉身に分けてジベレリンを抽出した。各品種に含まれるジベレリン A₃ 含量を表 2 に示した。

表 2 ネギに含まれる内生ジベレリン含量

品種	部位	ジベレリン A ₃ 含量 (pg/g 新鮮重)*
長悦	葉鞘	60
	葉身	40
晚中太	葉鞘	40
	葉身	60
吉晴	葉鞘	40
	葉身	80

*申請者が図から読み取った。

（考察及び結論）

上記文献や植物代謝試験概要（代 18 頁～参照）に示されるように、古来より人類はジベレリンを含む作物を摂取し続けているが、ジベレリンによる中毒について、未だ報告例はない。従って、ジベレリンについて表記試験の実施の必要性はないと考えられた。

尚、ジベレリンは植物ホルモンであることから、その含有量は変遷するものであり、その生育ステージに応じて生合成される、あるいは前駆物質や抱合体として存在し、同様に活性化されることが示唆されており、定常的にその含有量を捕らまえることは難しいと思われる。

⁷⁾ 白岩裕隆；初夏どりネギ栽培における安定多収のための抽台制御に関する生理学的研究（学位論文）50-76（2007）

(7) 21日間反復経皮投与毒性

急性経皮毒性試験の結果が、経口経路による急性毒性に比べて、著しく強い毒性を示唆する所見が何ら認められなかったことから、試験省略可能と考えた。

(8) 90日間反復吸入毒性

1) ジベレリン原体のラットを用いた3週間反復吸入毒性試験

(資料26)

試験機関：Merck Institute for Therapeutic Research

報告書作成年：1959年

[試験I]

検体純度：

供試動物：Holtzman系ラット、1群 雌雄各8匹（雌雄各4匹は投与期間終了直後に、雌雄各2匹は無処置で1及び2ヵ月間飼育した後に屠殺）

投与開始時体重；雄132~162g、雌118~141g

投与期間：3週間

投与方法：検体を少量のアルコールに溶解し、さらに水で希釈して、濃度200及び400ppmの噴霧液を調製した。各濃度の噴霧液3mLを10分間、容積88Lのチャンバー内に噴霧した。曝露は1日2回各1時間を週5日、3週間実施した。対照群にはアルコールを水で希釈した噴霧液を曝露した。

用量設定根拠：

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。

いずれの濃度で曝露しても、即時あるいは遅発の中毒反応は生じなかった。

体重変化；週1回測定した。

体重増加は投与群及び対照群とも正常であった。

臓器重量；計画屠殺動物を対象として以下の臓器重量を測定した。

肺、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、脳、下垂体、副腎、甲状腺、卵巣、子宮、精巣、前立腺、精囊、精巣上体

3週間曝露終了後の400ppm群雄の甲状腺及び下垂体重量が、対照群及び200ppm群よりもやや高かった。検査動物数が少ないことから偶発的なものと考えられた。

肉眼的病理検査；全動物を対象に、肉眼的病理検査を実施した。

検体が原因と考えられるような病変は認められなかった。

病理組織学的検査；全動物を対象として、以下の組織について病理標本を作成し、検鏡した。

皮膚、骨格筋、精巣、精巣上体、前立腺、精囊、卵巣、子宮、胃、腸、唾液腺、胸腺、脾臓、副腎、甲状腺、上皮小体、リンパ節、脾臓、肝臓、腎臓、膀胱、大動脈、心臓、肺、骨髄、下垂体、脳

肺の所見の発現頻度を次表に示す。

検体が原因と考えられるような病変は認められなかった。また、肺の変化の発生率または重篤度は投与群で増加せず、肺刺激の徴候はなかった。

検査時期	性別	雄			雌		
	投与量(ppm)	0	200	400	0	200	400
噴霧直後	所見\検査動物数	4	4	4	4	4	4
	肺炎(軽度)	2	1	0	1	1	0
噴霧終了後 1ヵ月	所見\検査動物数	2	2	2	2	2	2
	肺炎(軽度)	2	1	2	1	1	2
噴霧終了後 2ヵ月	所見\検査動物数	1	2	2	2	2	2
	肺炎(軽度)	0	1	0	0	0	0

[試験 II]

試験目的：前述の[試験 I] (資料 26) において、投与期間終了直後に屠殺した動物の下垂体及び甲状腺重量に変化がみられたが、検査動物数が少ないことによる偶発的な変化であることを確認する目的で、より高用量で多数の動物を用いた[試験 II]を実施した。

検体純度：

供試動物：Holtzman 系ラット、1 群雌雄各 10 匹、投与開始時体重；雄 130~166 g、雌 106~135 g

投与期間：3 週間

投与方法：検体を少量のアルコールに溶解し、さらに水で希釈して、濃度 400 及び 1000 ppm の噴霧液を調製した。各濃度の噴霧液 3 mL を 10 分間、容積 88 L のチャンパー内に噴霧した。曝露は 1 日 2 回各 1 時間を週 5 日、3 週間実施した。対照群にはアルコールを水で希釈した噴霧液を曝露した。

用量設定根拠：

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。

曝露中及び曝露後にも中毒症状はみられなかった。

体重変化；週 1 回測定した。

体重増加は投与群と対照群の間で差がなかった。

臓器重量；計画屠殺動物を対象として以下の臓器重量を測定した。

肺、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、脳、下垂体、副腎、甲状腺、卵巣、子宮、精巣、前立腺、精囊、精巣上部

雄の甲状腺及び下垂体を含む各臓器の重量は、群間で差がなかった。[試験 I]よりも規模の大きい[試験 II]で臓器重量に差がみられなかったことから、[試験 I]でみられた下垂体と甲状腺の重量変化は偶発的なものであるとの判断が裏付けられた。

肉眼的病理検査；全動物を対象に、肉眼的病理検査を実施した。

検体が原因と考えられるような病変は認められなかった。

病理組織学的検査；全動物を対象として、以下の組織について病理標本を作成し、検鏡した。

皮膚、骨格筋、精巣、精巣上部、前立腺、精囊、卵巣、子宮、胃、腸、唾液腺、胸腺、脾臓、副腎、甲状腺、上皮小体、リンパ節、脾臓、肝臓、腎臓、膀胱、大動脈、心臓、肺、骨髄、下垂体、脳

肺の所見の発現頻度を次表に示す。

検査時期	性別	雄			雌		
	投与量(ppm)	0	200	1000	0	200	1000
噴霧直後	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10
	肺炎	2	0	5	4	0	1

検体投与が原因と考えられるような病変は認められなかった。また、肺の変化の発生率または重篤度は、投与群と対照群の間で差がなく、肺刺激の徴候はなかった。

以上の結果から、本剤のラットに対する 3 週間反復吸入毒性試験における影響は、噴霧液濃度 1000 ppm でも雌雄ともに認められなかったため、無毒性量は雌雄とも 1000 ppm 以上であると判断された。

(9) 反復経口投与神経毒性

ジベレリンの反復経口投与神経毒性について関連する試験結果から考察した。

1. ラットの15週間反復経口投与毒性試験

現行の神経毒性試験のガイドラインにおいて、外観、体位、姿勢、自律神経機能、歩行の異常、動物の取り扱い操作や環境刺激に対する反応、神経系及び異常行動について、詳細な状態の観察が求められている。

一般毒性試験における一般症状観察では、本剤の投与によって、5000 ppmの投与群では検体投与に関連した死亡例は認められず、特異的な神経毒性は認められていない。その他、いずれの観察項目においても本剤が関連したと思われる影響は認められていない。なお、機能検査の一貫としての自発運動量、刺激に対する感覚運動反応および握力検査は実施されていない。

神経毒性に関わる坐骨神経、脳、下垂体、脊髄及び眼球及びその付属器における病理組織学的検査では本剤が関連したと思われる異常所見は認められていない。また、脳重量が測定されているが影響は認められなかった。

2. その他の試験(90日より長期の試験)

下記の長期の試験において、レポートの要約、考察及び結論の中に致死量以下の用量では本剤が関連したと思われる特異的な神経毒性を示唆する所見はない。

(1) 亜急性毒性試験(マウス; 1972年 資料25)

(2) 慢性毒性試験(ラット; 1994年 資料)

3. 既知神経毒性物質との化学構造の相関

既知神経毒性物質との化学構造に相関はないものと考えられる。

4. 考察・結論

ラット90日間反復経口投与毒性試験において致死用量以下の用量で特異的な神経毒性を示唆する毒性症状及び神経毒性に関わる病理組織学的異常所見は何ら認められていない。90日より長期の試験においても、致死用量以下の用量で特異的な神経毒性を示唆する所見は認められていない。また、本剤の化学構造も既知神経毒性物質と相関がない。従って、本剤には特異的な神経毒性作用はないものと判断される。

以上のことから、ジベレリンの反復経口投与神経毒性試験実施の必要性はないものと考えられた。

(10) 28日間反復投与遅発性神経毒性

当該原体はりん酸エステル系化合物でなく、かつ、コリンエステラーゼ阻害活性を有しないため、試験省略。

(11) 1年間反復投与経口毒性及び発がん性試験

1) ジベレリン原体のラットを用いた飼料混入投与による1年間反復経口投与毒性/発がん性併合試験
(資料 27)

試験機関：(財) 残留農薬研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1994年

検体純度：

供試動物：Fischer系ラット (F344/DuCrj)、1群雌雄各90匹 (主群50、衛星群40)、

試験開始時5~6週齢、体重；雄117~129g、雌90~100g

衛星群については、13、26及び52週間投与終了後に各用量雌雄各10匹を、78週間投与終了後には残りの全生存動物を屠殺した。

投与期間：104週間 (1991年3月4日~1993年3月9日)

投与方法：検体を0、3000、10000及び30000ppmの濃度で飼料に混入し、2年間にわたって随時摂食させた。検体を混入した飼料は1ヵ月に1回調製した。

用量設定根拠：

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、少なくとも毎週1回触診を含む詳細な臨床観察を行った。

臨床症状では、雌雄とも30000ppm群において軟便が投与初期より終了時まで継続して観察された。本所見は先に実施した4週間用量設定試験においても観察されており、検体投与に起因する変化と考えられた。軟便に関しては群飼のため排泄した個体を特定できないため、発生頻度を算出しなかった。

発生頻度に統計学的有意差を示した臨床症状を以下の表に示す。

性別	雄				雌			
	0	3000	10000	30000	0	3000	10000	30000
投与量 (ppm)								
所見\検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50
赤色眼脂	7	7	↓1	5	7	6	11	4
被毛の汚れ	3	3	2	4	5	4	3	↓0
皮膚・皮下腫瘍	11	13	12	14	7	10	10	↑16

対照群との有意差検定は、Fisherの直接確率計算法を用いて行った (↑↓: p<0.05)。

表中の数値は発現動物数を示す。

30000ppm群では、雌において皮膚・皮下腫瘍の発生頻度が有意に増加したが、肉眼的病理検査では皮膚・皮下腫瘍の発生頻度に統計学的有意差はなく、病理組織学的に観察された皮膚あるいは乳腺腫瘍を組織型別に解析した場合に特定の腫瘍の増加は認められなかったことから、偶発所見と判断した。赤色眼脂及び被毛の汚れの発生頻度の減少に関しては、毒性学的に意味のない変化と解釈した。

試験終了時の死亡率を次表に示す。検体投与の影響は特に認められなかった。

投与量 (ppm)		0	3000	10000	30000
死亡率 (%)	雄	20	16	18	30
	雌	22	14	26	10

対照群との有意差検定には、生命表解析を用いた。

体重変化；全動物について、投与開始後 13 週時までは毎週 1 回、16 週以降は 4 週に 1 回の頻度で体重を測定し、主群についてのみ各用量群の平均体重を測定日ごとに算出した。

30000 ppm 群において雄では投与 28 週以降、雌では投与 12 週以降に平均体重が対照群に比べ軽度 (5%前後) ながら有意に減少あるいは減少傾向を示した。この体重増加抑制は、同群には摂餌量の減少がなかった (むしろ増加傾向を示した) ことに加え食餌効率の低下が雌雄とも認められたことから、検体投与に起因する毒性徴候のひとつと考えられた。有意差検定には Dunnett または Scheffe の多重比較法を用いた ($\uparrow\downarrow$: $p < 0.05$, $\uparrow\downarrow\downarrow$: $p < 0.01$)。

摂餌量及び食餌効率；主群のすべてのケージについて、投与開始後 13 週時までは毎週 1 回、16 週以降は 4 週に 1 回の頻度で 3 日分または 4 日分のケージ別摂餌量を測定し、1 日 1 匹あたりの摂餌量を算出した。

30000 ppm 群の摂餌量は雌雄とも軽度 (5~10%) ではあるが対照群に比べ高値を示す傾向にあったが、投与期間中の総平均値は対照群との間に特に差がなかった。

投与開始後 13 週間までの食餌効率を求めたところ、10000 及び 3000 ppm の投与群には異常は認められなかったが、30000 ppm 群では雌雄とも 13 週間の総平均値において対照群より約 7% 低い値を示した^{申請者注)}。

申請者注：体重変化、食餌効率と合わせて考察すると、検体投与による影響と考えられた。

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は以下のとおりであった。

投与量 (ppm)		3000	10000	30000
検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	112.0	379	1200
	雌	135.3	460	1462

飲水量；主群のすべてのケージについて、投与開始後 13 週時までは毎週 1 回、16 週以降は 4 週に 1 回の頻度でケージ別飲水量を測定し、1 日 1 匹あたりの飲水量を算出した。

30000 ppm 群では、雌雄とも投与期間を通じ飲水量が有意に増加し、総平均値では対照群に比べ雄で約 38%、雌では 33% 高い値を示した。10000 ppm 群でも同様に投与期間を通じ有意に増加あるいは増加傾向を示し、総平均値では対照群に比べ雄で約 7%、雌では 8% 高い値を示した。この飲水量の増加には明らかな用量相関性が認められ、検体投与の影響と考えられた。この飲水量の増加は、尿検査値の異常あるいは肉眼的病理検査で観察された盲腸膨満と何らかの関連性があると考えられた。3000 ppm 群においても投与期間中の飲水量が増加傾向にあったが、総平均値の対照群との差は 5% 以内の軽微なものであり、毒性学的に意義のある変化ではなかった¹⁾。有意差検定には Dunnett または Scheffe の多重比較法を用いた ($\uparrow\downarrow$: $p < 0.05$, $\uparrow\downarrow\downarrow$: $p < 0.01$)。

血液学的検査；13、26、52 及び 78 週間投与終了後には衛星群の各用量雌雄各 10 匹を、104 週間投与終了後には主群の各用量雌雄各 10 匹を対象として、後大静脈から血液を採取し、以下の項目の測定を行った。

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(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)、平均赤血球色素濃度(MCHC)、血小板数、白血球数、白血球百分率
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。

項目	検査 時期 (週)	投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		3000	10000	30000	3000	10000	30000
ヘマトクリット値	52	100	100	100	101	99	▼95
ヘモグロビン量	52	100	99	99	100	99	▼96
赤血球数	52	100	100	99	99	97	▼95
MCH	26	100	99	↓98	99	100	101
血小板数	26	101	106	▲122	104	107	107
	78	105	105	▲112	99	91	99

対照群との有意差検定は、Dunnett または Scheffe の多重比較法を用いて行った
(↑↓: p<0.05, ▲▼: p<0.01)。

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

30000 ppm 群の雄では、投与 26 及び 78 週後に血小板数が有意に増加し、投与 26 週後には MCH が減少した。一方、30000 ppm 群の雌では投与 52 週後にヘマトクリット値、ヘモグロビン量及び赤血球数が有意に減少した。しかし、これらの変化はいずれも散発的で、投与期間との相関性は特に認められず、他の諸検査に対応所見が得られなかったことから、生物学的意義のないものと考えられた。

血液生化学的検査:血液学的検査で採取した血液より得られた血漿を用い、以下の項目の測定を行った。

アルカリホスファターゼ(ALP)、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)、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ(GGTP)、クレアチンホスホキナーゼ(CPK)、総ビリルビン、総蛋白、アルブミン、グロブリン、アルブミン/グロブリン比(A/G 比)、血糖、尿素窒素(BUN)、クレアチニン、総コレステロール、カルシウム、リン、ナトリウム、カリウム、クロル

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。

項目	検査 時期 (週)	投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		3000	10000	30000	3000	10000	30000
ALP	13	104	102	92	98	98	▼83
	26	96	96	↓92	97	92	91
GOT	13	92	88	▼80	96	96	▼91
	26	89	↓75	▼59	125	113	88
	52	199	94	▼55	95	89	▼65
	78	105	77	▼66	113	98	100
GPT	13	83	87	▼74	100	93	↓86
	26	91	↓74	▼54	139	117	↓72
	52	146	98	▼54	89	81	▼48
	78	73	↓68	▼57	115	115	104
	104	111	93	191	79	80	▼62
GGPT	26	100	100	0*	100	100	↓100
	52	100	100	↓100	100	100	▼100
CPK	13	100	100	91	102	110	↑122
BUN	26	102	99	↑108	96	92	97
総蛋白	13	100	101	↑103	100	100	100
アルブミン	13	101	102	▲103	101	100	102
グロブリン	26	98	98	102	102	↑104	100

項目	検査 時期 (週)	投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		3000	10000	30000	3000	10000	30000
	78	99	97	99	↑110	107	105
A/G 比	26	100	102	99	↓95	↓95	97
血糖	52	↓89	97	↓91	95	99	98
総コレステロール	26	96	100	94	100	100	↓84
	52	82	96	↓79	103	104	101
カルシウム	26	101	101	↑104	98	100	100
	104	100	↓96	100	101	102	102
リン	26	105	105	↑115	↓78	↓78	94
	52	109	106	↑117	104	104	100
ナトリウム	13	100	100	↓99	100	99	99
カリウム	26	103	↑107	↑108	87	89	88

対照群との有意差検定は、Dunnett または Scheffe の多重比較法を用いて行った
(↑↓: p < 0.05, ↑↓: p < 0.01)。

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

*: 測定値が「0」を示した。

30000 ppm 群の雌雄において、GOT 及び GPT がほぼ全検査期間を通じ有意な減少あるいは減少傾向が認められた。また、ALP が 13 及び 26 週、GGTP が 26 及び 52 週でそれぞれ有意に減少した。10000 ppm 群においても GOT 及び GPT の減少がみられた。これら酵素系の活性値の減少に関しては一般にその毒性的意味はまだ十分に解明されるに至っていない。しかし、今回認められた変化は用量相関性もあり、また、高用量群では雌雄とも共通して認められていることから検体投与に起因する変化と推察した。

その他にも種々の検査項目に統計学的な変動がみられたが、いずれも散発的であり、用量あるいは投与期間との相関性は認められなかったことから、偶発所見と解釈した。

尿検査: 13、26 及び 52 週間投与終了後には衛星群の各用量雌雄各 10 匹を、78 週間投与終了後には衛星群の全生存動物を、104 週間投与終了後には主群の各用量雌雄各 10 匹を対象として、採取した尿について以下の項目を検査した。

比重、pH、蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、潜血、ウロビリノーゲン、尿量、尿色、尿沈渣

対照群と比べ統計学的に有意差の認められた項目を次表に示す。

30000 ppm 群では、雄において投与 13、26、52 及び 78 週時に尿 pH 値が有意に低下し、投与 52 週時では尿比重の減少及び尿量の増加が認められた。一方、雌では投与 104 週時に尿比重及び尿蛋白が有意に減少した。また、10000 ppm 群では、雄において投与 78 週時に尿 pH 値が有意に低下し、雌では投与 13 週時に尿量が増加し、投与 26 週時に尿比重が減少した。これらの尿検査値の変動は飲水量の増加に起因するものと考えられた。

項目	検査 時期 (週)	投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		3000	10000	30000	3000	10000	30000
尿量	13	94	106	95	115	↑135	124
	52	93	110	↑141	116	103	125
尿比重	26	100	100	100	99	↕98	101
	52	100	100	↓99	100	100	99
	104	100	100	99	99	100	↕98
pH*	13	6.8	6.5	▽6.35			
	26	7.05	7.0	▼6.35			
	52	7.3	7.25	▽6.95			
	78	7.0	▽6.7	▼6.55			
蛋白	104						▽

定量値の対照群との有意差検定は、Dunnett または Scheffe の多重比較法を用いて行った

(↑↓: p < 0.05, ↕↕: p < 0.01)。

定量値の表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したものを。

定性値の対照群との有意差検定は Mann-Whitney の U 検定を用いて行った

(△▽: p < 0.05, ▲▼: p < 0.01)

* 雄の対照群の数値はそれぞれ 6.75(0 週)、7.0(13 週)、7.4(52 週)、7.05(78 週)

眼科学的検査; 投与開始前に全ての動物について、投与 12 及び 103 週時には主群の対照群及び 30000 ppm 群のすべての動物について検査した。

検体投与に関連のある異常は認められなかった。

臓器重量; 13、26、52 及び 78 週間投与終了後には衛星群の各用量雌雄各 10 匹を、104 週間投与終了後には主群の各用量雌雄各 10 匹を対象として、以下の臓器重量を測定し、体重比を算出した。但し、胸腺重量は 13 及び 26 週間投与終了後の屠殺動物についてのみ測定した。

脳、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、盲腸、精巣

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。

30000 ppm 群では、雌雄とも全ての検査時期において盲腸の重量が有意に増加し、肉眼的病理所見と一致した。また、30000 ppm 群では肝臓重量の増加がほぼ全検査時期で認められた。その他には、30000 ppm 群において脳、腎臓、脾臓、副腎及び精巣重量の体重比が有意に増加したが、いずれも病理組織学的に明らかな対応所見が得られなかったことから、これらの脳、腎臓、脾臓、副腎及び精巣の対体重比の増加は、ストレスあるいは体重変化に伴う二次的変化と推察した。なお、10000 及び 3000 ppm の投与群では、特記すべき変化は認められなかった。

項目	検査 時期 (週)	投与量 (ppm)						
		雄			雌			
		3000	10000	30000	3000	10000	30000	
脳	52	重量	100	101	101	101	99	100
		体重比	100	100	104	96	↓95	100
	78	重量	98	100	100	102	101	100
		体重比	107	102	107	107	106	↑118
肝臓	13	重量	97	102	↑113	103	105	↑111
		体重比	100	101	↑113	105	↑106	↑113
	26	重量	103	104	↑116	101	106	104
		体重比	100	103	↑118	97	101	105
	52	重量	99	99	106	104	107	↑114
		体重比	99	99	↑110	99	103	↑114
	78	重量	98	96	104	99	100	103
		体重比	107	99	↑111	106	103	↑123
	104	重量	106	106	125	98	95	99
		体重比	108	107	↑134	93	99	102
腎臓	13	重量	96	98	104	99	100	105
		体重比	97	97	103	100	102	↑106
	78	重量	97	101	101	106	100	100
		体重比	105	104	107	112	105	↑117
脾臓	13	重量	↓92	98	97	97	100	104
		体重比	95	100	100	100	100	105
	52	重量	102	99	103	100	105	105
		体重比	100	100	↑107	100	100	105
副腎	13	重量	100	97	101	105	105	110
		体重比	100	93	100	108	108	↑112
	26	重量	98	103	102	101	107	109
		体重比	100	108	100	100	104	↑113
	52	重量	103	102	110	106	100	↑110
		体重比	100	100	↑110	100	96	↑108
	78	重量	114	104	102	101	97	100
		体重比	120	110	110	105	105	↑119
盲腸	13	重量	97	106	↑257	97	108	↑221
		体重比	99	105	↑255	98	108	↑224
	26	重量	110	96	↑245	106	113	↑171
		体重比	107	96	↑250	102	107	↑173
	52	重量	103	127	↑221	103	105	↑178
		体重比	103	127	↑230	98	100	↑177
	78	重量	102	118	↑196	104	103	↑171
		体重比	109	121	↑210	108	107	↑198
	104	重量	108	111	↑229	101	105	↑170
		体重比	111	113	↑246	98	108	↑176
精巣	52	重量	101	102	106	-	-	-
		体重比	101	101	↑110	-	-	-

対照群との有意差検定は、Dunnett または Scheffe の多重比較法を用いて行った
(↑↓: $p < 0.05$, ↑↓: $p < 0.01$)。

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

肉眼的病理検査；主群については途中死亡・切迫屠殺動物及び試験終了時の最終屠殺動物について剖検

を行った。衛星群については13、26、52及び78週間投与終了後に血液学的・血液生化学的検査に供した中間屠殺動物のみを剖検した。

対照群と比べて統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

検査時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	3000	10000	30000	0	3000	10000	30000
13週	臓器	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10
	盲腸	膨満	0	0	0	▲10	0	0	0	▲10
26週	臓器	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10
	盲腸	膨満	0	0	0	▲10	0	0	0	▲9
52週	臓器	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10
	盲腸	膨満	0	0	2	▲10	0	0	0	▲7
78週	臓器	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	9
	盲腸	膨満	0	0	0	▲10	0	0	0	▲8
	皮膚	脱毛	0	1	0	0	6	5	▼0	4
死亡・切迫殺	臓器	所見\検査動物数	10	8	9	15	11	7	13	5
	子宮	腫瘍	—	—	—	—	7	3	4	↓0
最終屠殺	臓器	所見\検査動物数	40	42	41	35	39	43	37	45
	盲腸	膨満	0	0	0	▲32	0	0	0	▲33
	皮膚	脱毛	3	2	2	↑9	12	9	12	19
	肝臓	斑・点	3	1	2	6	6	4	3	▲19
		腫瘍	0	1	0	▲10	2	0	0	5
	腎臓	表面粗造	2	6	6	▲11	2	3	2	1
	精巣	萎縮・軟化	16	9	18	↓6	—	—	—	—
	子宮	腫瘍	—	—	—	—	10	↓4	4	10
全動物	臓器	所見\検査動物数	90	90	90	90	90	90	90	89
	盲腸	膨満	0	0	2	▲74	0	0	0	▲69
	肝臓	斑・点	4	2	3	8	8	5	3	↑19
		腫瘍	0	3	1	▲12	3	0	0	5
	腎臓	表面粗造	3	8	6	↑11	2	3	4	1
	脾臓	腫大	5	9	10	↑13	9	6	7	10
	精巣	萎縮・軟化	23	↓13	23	▼10	—	—	—	—
	子宮	腫瘍	—	—	—	—	18	↓8	10	10

対照群との有意差検定は、Fisherの直接確率計算法を用いて行った
(↑↓: p<0.05, ▲▼: p<0.01)。

30000 ppm群では、雌雄ともほぼ全計画屠殺動物において盲腸の膨満が観察され、途中死亡・切迫殺動物を含む全動物での総発生頻度は78%以上に達した。この盲腸の膨満は先に実施した4週間用量設定試験においても観察されており、検体投与に起因する特異的な変化と考えられ、摂餌量及び飲水量の増加と何らかの関連性があるものと推察した。なお、盲腸内腔には多量の軟便様内容物が充満していたが、組織学的には粘膜に特に異常は認められなかった。

その他、30000 ppm群では最終屠殺動物において雄では肝腫瘍及び腎表面粗造の発生頻度が、雌では肝臓の斑・点の発生頻度がそれぞれ有意に増加し、総発生頻度においても有意差を示した。加えて、雄では脾臓の腫大の総発生頻度が有意に増加した。これらの変化のうち、肝臓の腫瘍及び斑・点の増加は病理組織学的検査における肝細胞腫瘍及び肝細胞小増殖巣の発生頻度の増加と一致し、検体投与の影響と考えられた。雄における腎表面粗造及び脾臓腫大の発生頻度の増加に関しては、変化が認められたのが最終屠殺動物のみであり、対応する病理組織学的

所見の統計学的な検定において有意な増加は認められず、また雌では異常がなかったことから検体投与の影響ではないと判断した。上記以外にも種々の肉眼病変の発生頻度に統計学的有意差が認められたが、いずれも散発的であり、毒性学的に意味のある変化ではなかった。
 病理組織学的検査；肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、以下の組織について病理標本を作成し、検鏡した。

脳、脊髄（頸部、胸部、腰部）、坐骨神経、下垂体、胸腺、甲状腺、上皮小体、副腎、脾臓、骨・骨髄（大腿骨、胸骨、椎骨）、リンパ節（頸部、腸間膜）、心臓、大動脈、唾液腺、食道、胃、肝臓、膵臓、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、気管、肺、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、精囊・凝固腺、卵巣、子宮（頸部、角）、眼球、ハーダー腺、骨格筋（下腿三頭筋）、皮膚（腰背部）、乳腺（雌）、肉眼的病変部

〔非腫瘍性病変〕

認められた主要な非腫瘍性病変を表1 (p.毒40～) に示す。

30000 ppm 群では、雄において投与 52 週後の中間屠殺動物で肝細胞の好塩基性及び好酸性小増殖巣が、投与 78 週後の中間屠殺動物では混合型小増殖巣が、最終屠殺動物では空胞性及び混合型の小増殖巣がそれぞれ対照群に比べ有意に増加し、混合型の小増殖巣は総発生頻度（全動物）においても有意差を示した。雌では、最終屠殺動物において肝細胞の好酸性及び混合型小増殖巣が有意に増加し、総発生頻度においても有意差を示した。これらは検体投与に起因する変化と考えられた。なお、10000 ppm 群でも最終屠殺動物の雌において好酸性肝細胞小増殖巣の発生頻度が有意に増加したが、好塩基性小増殖巣の総発生頻度は逆に有意に減少し、また、肝細胞腫瘍の発生には特に異常がなかったことから、毒性学的に意義のない変化と判断した。これらの発現頻度を次表に示す。

検査 時期	性別 投与量 (ppm)	雄				雌			
		0	3000	10000	30000	0	3000	10000	30000
52 週	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10
	好酸性肝細胞小増殖巣	0	0	0	↑5	0	0	0	0
	好塩基性肝細胞小増殖巣	2	1	4	↑10	6	3	3	6
78 週	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	9
	混合型肝細胞小増殖巣	0	0	0	↑4	0	0	0	0
	所見\検査動物数	40	42	41	35	39	43	37	45
最終 屠殺	好酸性肝細胞小増殖巣	33	31	38	33	16	20	↑25	↑32
	混合型肝細胞小増殖巣	16	20	22	↑25	8	6	7	↑25
	空胞化肝細胞小増殖巣	5	5	8	↑13	4	3	1	4
	所見\検査動物数	90	90	90	90	90	90	90	89
全 動物	好酸性肝細胞小増殖巣	38	38	41	50	16	21	26	↑32
	好塩基性肝細胞小増殖巣	56	55	60	65	61	60	↓49	61
	混合型肝細胞小増殖巣	18	23	23	↑33	9	6	7	↑25

対照群との有意差検定は、Fisher の直接確率計算法を用いて行った (↑↓: p < 0.05, ↑↓: p < 0.01)。

その他にも検体投与群において限局性肝細胞脂肪化、胆管増生、肝小肉芽腫、乳腺増生など種々の非腫瘍性病変の発生頻度に統計学的に有意な増減が認められたが、いずれも毒性学的に意味のない減少あるいは用量相関性のない増加であった。

〔腫瘍性病変〕

認められたすべての腫瘍性病変を表2(p.毒49～)に示す。

30000 ppm 群では、最終屠殺動物において肝細胞腺腫が雌雄各 4 例に、肝細胞癌が雄 4 例及び雌 1 例に認められ、肝細胞腺腫と肝細胞癌を併せた発生頻度(雄 8 例、雌 5 例)が対照群(雄 1 例、

雌 0 例)に比べ有意に増加した。また、全動物における総発生頻度においても、雄では肝細胞癌の発生頻度(5 例)及び肝細胞腺腫(5 例)を併せた発生頻度(10 例)が対照群(腺腫 1 例、癌 0 例)に比較し有意に増加した。雌の肝細胞腺腫の総発生頻度(腺腫 4 例、癌 1 例)も雄と同様に対照群(腺腫 1 例、癌 0 例)に比べ増加傾向を示したが、統計学的有意差はなかった。肝細胞腺腫の発生頻度は対照群に比べ明らかに高く検体投与に起因する変化と考えられた。これらの発現頻度を次表にまとめた。

検査 時期	性別 投与量 (ppm)	雄				雌			
		0	3000	10000	30000	0	3000	10000	30000
最終 屠殺	所見\検査動物数	40	42	41	35	39	43	37	45
	肝細胞腺腫	1	0	1	4	0	0	0	4
	肝細胞癌	0	0	0	↑4	0	0	0	1
	肝細胞腺腫(腺腫+癌)	1	0	1	↑8	0	0	0	↑5
全 動物	所見\検査動物数	90	90	90	90	90	90	90	89
	肝細胞腺腫	1	0	2	5	1	0	0	4
	肝細胞癌	0	1	0	↑5	0	0	0	1
	肝細胞腺腫(腺腫+癌)	1	1	2	↑10	1	0	0	5

対照群との有意差検定は、Fisher の直接確率計算法を用いて行った
(↑↓: $p < 0.05$, ↑↓: $p < 0.01$)。

30000 ppm 群では、その他にも種々の腫瘍性病変が観察されたが、検体投与に関連して有意な増加を示す病変は認められなかった。10000 及び 3000 ppm の投与群では、雌雄とも観察された腫瘍性病変(肝腺腫を含む)の発生頻度において有意な増加を示す病変は認められなかった。

以上の結果から、本剤のラットに対する 104 週間飼料混入投与による 1 年間反復経口投与毒性/発がん性併合試験における影響として、30000 ppm 投与では雌雄ともに軟便、体重増加抑制、摂餌量及び飲水量の増加がみられた。尿検査では、雌雄とも尿比重が有意に増加し、雄では pH 値の低下及び尿量の増加、雌では尿蛋白の減少が認められた。血液生化学的検査では雌雄とも血漿のアルカリホスファターゼ、グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミラーゼ、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミラーゼ及びγ-グルタミルトランスペプチターゼ値が有意に減少した。盲腸及び肝臓重量の増加、盲腸膨満、肝細胞小増殖巣の発現頻度増加が認められた。また、10000 ppm 群でも雌雄ともに飲水量の増加及び尿検査項目の変動がみられ、雄では血液生化学的検査項目の変動も認められたので、無毒性量は雌雄とも 3000 ppm (雄: 112.0 mg/kg/day, 雌: 135.3 mg/kg/day) であると判断される。

また、催腫瘍性に関しては、30000 ppm 投与の雌雄において肝細胞小増殖巣及び肝細胞腺腫の発生頻度が対照群に比べ有意に増加した。10000 及び 3000 ppm の投与では、雌雄とも検体投与に関連づけられる腫瘍性病変の増加は認められなかった^{註1)}。

注1 申請者注: 肝腺腫の発生機序について検討した各種試験(資料 No.35~39)の結果、検体を F344 ラットに高用量(3000 ppm 以上)混餌投与すると肝臓の細胞増殖活性が亢進し、同時にギャップ結合蛋白 Connexin 32 (CX32) が小葉中心性に減少することが示唆された。ただし、細胞増殖に関しては投与初期(3 日以内)に一旦亢進するものの、その後すぐに正常に戻るという非変異原性肝発癌物質に特有の変動パターンを示し、10000 及び 30000 ppm の投与群では投与 26 週以降再び細胞増殖活性が亢進した。これらの結果から、検体はフェノバルビタールと同様に細胞増殖作用(mitogenic activity)を有し、同時に細胞間連絡を阻害することにより自然発生性の変異細胞(initiated cell)の増殖を促し、検査項肝腺腫を誘発したものと推察された。なお、100 ppm 群ではいずれの目においても有意な変化は認められず、上記の作用には閾値があることが確認されている。

表1〔非腫瘍性病変〕

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	3000	10000	30000	0	3000	10000	30000
13 週	臓器	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10
	心臓	心筋炎	7	6	4	4	0	0	1	2
	脾臓	被膜炎/被膜線維化	0	1	0	0	0	1	0	0
	肺	肉芽腫	0	0	0	0	0	1	0	0
	肝臓	小肉芽腫	1	1	1	0	1	0	1	0
		肝横隔膜面結節	1	1	0	1	0	0	0	0
		被膜炎	0	0	0	0	0	1	0	0
	腎臓	尿細管萎縮	4	3	5	8	1	0	4	2
		硝子円柱	1	2	2	1	1	0	0	1
		嚢胞	2	1	0	0	0	0	0	0
	下垂体	嚢胞	0	0	0	0	0	0	1	0
	腹腔	脂肪壊死	0	0	0	0	0	0	0	1
	26 週	臓器	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10
心臓		心筋炎	6	5	4	4	2	1	1	0
肝臓		限局性肝細胞脂肪変化	0	0	0	0	1	0	1	0
		空胞化肝細胞小増殖巣	1	0	0	0	0	0	0	0
		小肉芽腫	0	0	0	0	1	1	2	1
		肝横隔膜面結節	0	2	0	0	0	0	0	1
		鈣質沈着	0	0	1	0	0	0	0	0
		単核細胞浸潤	0	0	0	0	1	0	0	0
脾臓		腺房細胞萎縮	1	1	2	1	0	0	0	0
腎臓		尿細管萎縮	4	7	4	4	0	1	0	0
		硝子円柱	1	2	1	1	2	0	0	0
下垂体		嚢胞	1	0	0	0	0	1	0	0
甲状腺		C細胞過形成	0	0	1	0	0	0	0	0
	嚢嚢遺残	0	0	1	0	0	0	0	0	

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01 (Fisher直接確率計算法)

表1〔非腫瘍性病変〕

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	3000	10000	30000	0	3000	10000	30000
52 週	臓器	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10
	心臓	心筋炎	3	5	3	3	0	0	0	1
	脾臓	髓外造血増加	0	0	0	0	0	0	1	0
	肝臓	限局性肝細胞壊死	0	0	0	0	0	0	0	1
		好酸性肝細胞小増殖巣	0	0	0	5↑	0	0	0	0
		好塩基性肝細胞小増殖巣	2	1	4	4↑	6	3	3	6
		小肉芽腫	2	2	1	0	2	2	4	4
		肝横隔膜面結節	1	0	1	0	1	0	0	1
	胆管増生	6	4	4	4↓	0	0	0	0	
	膵臓	腺房細胞萎縮	0	0	0	1	0	0	0	0
	腎臓	慢性腎症の初期変化	3	3	1	3	0	0	0	0
		尿管萎縮	6	7	6	5	1	1	2	1
		硝子円柱	2	4	4	3	1	2	2	3
	精巣	精細管萎縮	1	1	0	0	-	-	-	-
		間細胞過形成	0	0	0	1	-	-	-	-
	下垂体	前葉過形成	0	0	0	0	0	2	2	1
		嚢胞	0	0	0	1	0	0	0	0
	甲状腺	C細胞過形成	2	0	0	1	0	0	0	0
78 週	臓器	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	9
	心臓	心筋萎縮/線維化	1	1	4	3	0	0	0	0
		心筋炎	3	3	3	2	2	0	1	1
	脾臓	褐色色素沈着増加	0	0	1	1	5	5	3	2
		髓外造血増加	0	0	0	0	2	0	1	3
	肺	肺胞上皮過形成	1	0	0	1	0	0	0	0
	肝臓	限局性肝細胞脂肪変化	0	0	0	0	2	0	0	0
		限局性肝細胞壊死	1	0	0	0	0	0	1	1
		好酸性肝細胞小増殖巣	3	2	1	7	0	0	0	0
		好塩基性肝細胞小増殖巣	8	8	10	9	10	9	8	9
		混合型肝細胞小増殖巣	0	0	0	4↑	0	0	0	0
		空胞化肝細胞小増殖巣	1	1	0	1	1	1	1	0
		小肉芽腫	2	1	0	1	6	6	9	5
		肝横隔膜面結節	0	0	2	1	1	0	2	0
	胆管増生	9	9	10	4↓	2	1	2	1	
	膵臓	腺房細胞萎縮	0	1	0	0	0	1	0	2
	腎臓	慢性腎症の初期変化	7	8	8	6	1	4	4	2
		慢性腎症	2	1	1	2	1	1	0	0
尿管萎縮		1	1	2	2	3	2	3	2	
硝子円柱		1	1	2	1	3	3	5	3	

統計学的有意差: ↑↓: p<0.05, ↑↓: p<0.01 (Fisher直接確率計算法)

- : 該当臓器なし

表1〔非腫瘍性病変〕

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	3000	10000	30000	0	3000	10000	30000
78 週	臓器	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	9
	精巣	精細管萎縮	1	2	0	2	—	—	—	—
		間細胞過形成	3	6	7	7	—	—	—	—
	下垂体	前葉過形成	0	1	2	3	1	4	0	1
		嚢胞	1	1	2	0	0	0	0	0
	甲状腺	C細胞過形成	3	1	0	2	0	0	0	2
		嚢嚢遺残	0	1	1	1	0	0	1	0
	副腎	皮質過形成	1	2	0	0	1	2	0	0
		髓質過形成	0	1	0	0	0	0	0	0
		副腎ペリオーシス	0	0	0	0	0	0	0	1
	皮膚	毛のう拡張	1	1	0	0	1	0	0	2
	乳腺	腺房拡張	—	—	—	—	0	1	1	1
		検査標本なし	—	—	—	—	0	0	1	0
	腹腔	脂肪壊死	0	0	0	0	1	0	0	1
死亡・ 切迫殺	臓器	所見\検査動物数	10	8	9	15	11	7	13	5
	心臓	心筋萎縮/線維化	4	2	2	4	0	1	0	0
		心筋炎	0	1	1	0	0	0	0	0
		心室拡張	0	1	1	0	0	0	0	0
	脾臓	線維化	0	0	0	0	0	0	1	0
		褐色色素沈着増加	2	0	0	0	1	1	4	0
		髄外造血増加	2	1	2	1	9	3	4	2
		うっ血	2	1	0	0	0	0	0	0
		肉芽腫	0	0	0	0	0	0	1	0
	肺	肺胞上皮過形成	1	0	0	0	0	0	0	0
		泡沫細胞凝集	0	0	1	0	0	0	0	0
		無気肺	0	0	0	1	0	0	0	1
		浮腫	1	0	0	0	0	1	0	0
		うっ血	1	0	0	0	0	0	0	0
		出血	0	1	1	0	1	0	0	0
		気管支肺炎	1	0	0	0	0	0	0	0
	大腸	腸炎	0	1	0	0	0	0	0	0
		粘膜下組織浮腫	1	0	0	1	0	0	0	0
	肝臓	小葉中心性肝細胞脂肪変化	0	0	1	0	2	1	0	0
		門脈周囲肝細胞脂肪変化	0	0	0	0	0	0	1	0
		限局性肝細胞脂肪変化	0	1	0	0	1	0	0	0
		びまん性肝細胞脂肪変化	1	1	0	0	1	1	2	0
		限局性肝細胞壊死	3	0	1	1	1	2	1	0
		好酸性肝細胞小増殖巣	2	5	2	5	0	1	1	0

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↕：p<0.01 (Fisher直接確率計算法)

—：該当臓器なし

表1〔非腫瘍性病変〕

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	3000	10000	30000	0	3000	10000	30000
死亡・ 切迫殺	臓器	所見\検査動物数	10	8	9	15	11	7	13	5
	肝臓	好塩基性肝細胞小増殖巣	7	5	5	11	6	5	3	4
		明細胞性肝細胞小増殖巣	1	2	0	2	0	0	0	0
		混合型肝細胞小増殖巣	2	3	1	4	1	0	0	0
		空胞化肝細胞小増殖巣	0	1	0	0	0	1	0	0
		肝海綿状変性	0	1	0	3	0	0	0	0
		ペリオシス	0	1	0	0	0	0	0	0
		小肉芽腫	3	1	2	1	1	0	3	1
		肝横隔膜面結節	0	0	0	0	1	0	0	0
		間質褐色色素沈着	0	0	0	0	0	0	1	1
		胆管増生	9	7	7	▼4	1	2	0	0
		髓外造血増加	1	0	0	0	0	2	0	0
		うっ血	0	0	0	1	0	0	0	0
		血栓	0	0	0	0	0	0	1	0
		単核細胞浸潤	0	0	0	0	0	0	0	1
		膵臓	膵房細胞萎縮	0	0	2	1	0	0	0
	腎臓	慢性腎症の初期変化	5	6	5	11	8	4	6	2
		慢性腎症	5	2	2	3	1	0	1	0
		近位尿細管細胞内褐色色素沈着増加	2	1	4	1	5	6	5	3
		近位尿細管細胞硝子滴変性	0	0	0	0	0	0	1	1
		尿細管萎縮	0	0	1	0	0	0	0	0
		硝子円柱	0	0	1	1	0	1	1	1
		水腎症	0	0	0	0	0	0	1	0
		腎盂炎/腎盂腎炎	0	0	1	0	0	0	0	0
	精巣	精細管萎縮	5	3	5	3	-	-	-	-
		間細胞過形成	3	1	2	2	-	-	-	-
	前立腺	前立腺炎	1	0	2	3	-	-	-	-
	下垂体	前葉過形成	1	3	1	1	0	0	2	1
		嚢胞	0	0	0	0	2	2	1	0
	甲状腺	濾胞肥大	1	1	0	1	0	0	0	0
		C細胞過形成	0	2	0	4	2	1	1	1
		嚢嚢遺残	0	0	1	0	2	1	0	0
		検査標本なし	0	0	0	1	0	0	0	0
副腎	皮質過形成	2	2	2	3	4	2	1	0	
	皮質壊死	1	0	0	0	0	0	0	0	
	髓質過形成	3	3	3	2	1	1	0	1	
	副腎ペリオシス	0	0	0	0	2	1	0	0	
脊髄(腰部)	神経根神経線維変性	8	4	5	7	5	2	3	3	

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、◆▼：p<0.01 (Fisher 直接確率計算法)

-：該当臓器なし

表1〔非腫瘍性病変〕

検査時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	3000	10000	30000	0	3000	10000	30000
死亡・切迫殺	臓器	所見\検査動物数	10	8	9	15	11	7	13	5
	皮膚	毛のう拡張	0	0	0	0	1	0	0	0
	乳腺	腺房拡張	-	-	-	-	8	↓1	↑2	↓0
	腹腔	脂肪壊死	0	1	0	0	2	0	0	0
最終屠殺	臓器	所見\検査動物数	40	42	41	35	39	43	37	45
	心臓	心筋萎縮/線維化	19	21	22	15	7	5	2	4
		心筋炎	2	3	0	0	2	1	0	0
		心室拡張	1	1	0	0	0	0	0	0
	脾臓	リンパ球過形成	1	0	1	0	1	1	0	1
		組織球凝集	1	0	0	0	2	0	0	0
		線維化	1	0	1	1	0	0	0	0
		褐色色素沈着増加	5	7	2	2	14	10	12	10
		被膜炎/被膜線維化	0	0	0	0	1	0	1	1
		髓外造血増加	6	4	3	7	5	6	6	6
		うっ血	1	0	2	1	1	0	1	0
	肺	肺胞上皮過形成	0	0	2	0	2	0	0	0
		うっ血	0	0	0	0	1	0	0	0
		出血	1	0	0	0	0	0	1	0
		気管支肺炎	0	0	0	0	0	0	1	0
	肝臓	門脈周囲肝細胞脂肪変化	5	4	2	1	0	0	1	0
		限局性肝細胞脂肪変化	5	5	3	↓0	13	↑3	9	↑4
		限局性肝細胞壊死	0	1	0	0	1	0	1	0
		好酸性肝細胞小増殖巣	33	31	38	33	16	20	↑25	↑32
		好塩基性肝細胞小増殖巣	39	41	41	35	39	43	35	42
		明細胞性肝細胞小増殖巣	6	12	7	10	0	0	0	2
		混合型肝細胞小増殖巣	16	20	22	↑25	8	6	7	↑25
		空胞化肝細胞小増殖巣	5	5	8	↑13	4	3	1	4
		肝海綿状変性	5	4	2	3	0	0	0	0
		ペリオシス	0	0	0	0	1	1	2	2
		小肉芽腫	13	15	9	↑2	21	20	14	24
		肝横隔膜面結節	0	2	4	0	3	3	4	4
		嚢胞	0	0	1	1	0	0	0	1
		間質褐色色素沈着	0	0	0	0	7	2	2	4
		胆管増生	40	42	39	↑13	8	9	12	5
		髓外造血増加	0	0	2	0	1	0	0	0
		単核細胞浸潤	1	0	0	0	5	5	2	2
脾臓	腺房細胞萎縮	17	14	10	↑5	7	2	4	6	
腎臓	慢性腎症の初期変化	15	12	12	11	23	31	28	28	

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↑：p<0.01 (Fisher 直接確率計算法)

-：該当臓器なし

表1〔非腫瘍性病変〕

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	3000	10000	30000	0	3000	10000	30000
最終 屠殺	臓器	所見\検査動物数	40	42	41	35	39	43	37	45
	腎臓	慢性腎症	25	30	28	24	6	4	4	3
		近位尿細管細胞内褐色色素沈着増加	0	0	0	1	19	26	19	24
		近位尿細管細胞硝子滴変性	1	0	0	0	0	0	0	0
		尿細管萎縮	1	0	1	0	0	3	0	3
		硝子円柱	0	0	1	0	3	1	3	8
		線維化	0	0	0	1	0	0	0	1
		嚢胞	0	1	0	0	0	0	1	0
		単核細胞浸潤	0	0	0	0	0	0	1	0
	卵巣	萎縮	—	—	—	—	0	1	0	0
		嚢胞	—	—	—	—	1	0	1	0
	精巣	精細管萎縮	9	7	7	5	—	—	—	—
		間細胞過形成	10	8	7	3	—	—	—	—
		動脈炎	0	1	1	0	—	—	—	—
	前立腺	前立腺炎	2	↑9	5	2	—	—	—	—
		検査標本なし	0	0	0	1	—	—	—	—
	下垂体	前葉過形成	10	11	7	9	11	9	7	15
		中間葉過形成	1	0	0	0	0	0	0	0
		嚢胞	5	1	1	3	7	9	5	10
		血腫	0	0	0	0	1	0	0	0
		ラトケ嚢遺残	0	0	0	0	0	0	1	0
		うっ血	0	0	0	0	0	0	3	0
		後葉グリア細胞増殖	0	2	0	0	0	0	0	0
		検査標本なし	0	0	0	1	1	0	0	0
	甲状腺	濾胞嚢胞状過形成	0	0	0	0	1	0	0	0
		濾胞肥大	0	1	0	1	0	0	1	0
		C細胞過形成	11	10	13	9	13	14	↓5	↓6
		嚢嚢遺残	1	0	0	0	0	1	1	0
	副腎	皮質過形成	10	14	5	7	14	10	8	↓7
		皮質脂肪変化	1	1	0	0	0	0	0	0
		萎縮	0	0	0	0	0	1	0	0
		髄質過形成	10	9	8	15	6	2	2	9
		被膜下細胞過形成	1	0	0	0	0	0	0	0
		嚢胞	0	0	0	0	1	0	0	0
		皮髄境界部褐色色素沈着増加	0	0	0	0	0	1	0	0
		副腎ペリオーシス	0	0	0	0	0	3	2	4
脊椎(腰部)	神経根神経線維変性	39	37	↑33	31	30	31	30	33	
皮膚	毛のう拡張	1	0	1	1	3	0	2	3	

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01 (Fisher 直接確率計算法)

—：該当臓器なし

表1〔非腫瘍性病変〕

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	3000	10000	30000	0	3000	10000	30000
	臓器	所見\検査動物数	40	42	41	35	39	43	37	45
最終 屠殺	乳腺	腺房拡張	-	-	-	-	12	↑22	15	16
		検査標本なし	-	-	-	-	0	2	1	1
	腹腔	脂肪壊死	0	0	1	1	2	0	0	1
		心臓	心筋萎縮/線維化	24	24	28	22	7	6	2
	心筋炎		21	23	15	13	6	2	3	4
	心室拡張		1	2	1	0	0	0	0	0
	脾臓	リンパ球過形成	1	0	1	0	1	1	0	1
		組織球凝集	1	0	0	0	2	0	0	0
		線維化	1	0	1	1	0	0	1	0
		褐色色素沈着増加	7	7	3	3	20	16	19	12
		被膜炎/被膜線維化	0	1	0	0	1	1	1	1
		髓外造血増加	8	5	5	8	16	9	12	11
		うっ血	3	1	2	1	1	0	1	0
	肺	肉芽腫	0	0	0	0	0	0	1	0
		肺胞上皮過形成	2	0	2	1	2	0	0	0
		泡沫細胞凝集	0	0	1	0	0	0	0	0
		無気肺	0	0	0	1	0	0	0	1
		浮腫	1	0	0	0	0	1	0	0
		うっ血	1	0	0	0	1	0	0	0
		出血	1	1	1	0	1	0	1	0
		肉芽腫	0	0	0	0	0	1	0	0
	大腸	気管支肺炎	1	0	0	0	0	0	1	0
		腸炎	0	1	0	0	0	0	0	0
	肝臓	粘膜下組織浮腫	1	0	0	1	0	0	0	0
		小葉中心性肝細胞脂肪変化	0	0	1	0	2	1	0	0
		門脈周囲肝細胞脂肪変化	5	4	2	1	0	0	2	0
		限局性肝細胞脂肪変化	5	6	3	↓0	17	↑3	10	↑4
		びまん性肝細胞脂肪変化	1	1	0	0	1	1	2	0
		限局性肝細胞壊死	4	1	1	1	2	2	3	2
		好酸性肝細胞小増殖巣	38	38	41	50	16	21	26	↑32
		好塩基性肝細胞小増殖巣	56	55	60	65	61	60	↓49	61
		明細胞性肝細胞小増殖巣	7	14	7	12	0	0	0	2
混合型肝細胞小増殖巣		18	23	23	↑33	9	6	7	↑25	
空胞化肝細胞小増殖巣		7	7	8	14	5	5	2	4	
肝海綿状変性		5	5	2	6	0	0	0	0	
ペリオシス		0	1	0	0	1	1	2	2	
小肉芽腫		21	20	13	↑4	32	29	33	35	

統計学的有意差: ↑↓: p<0.05、↑↓: p<0.01 (Fisher 直接確率計算法)

- : 該当臓器なし

表1〔非腫瘍性病変〕

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	3000	10000	30000	0	3000	10000	30000
全 動 物	臓器	所見\検査動物数	90	90	90	90	90	90	90	89
	肝臓	肝横隔膜面結節		2	5	7	2	6	3	6
嚢胞			0	0	1	1	0	0	0	1
間質褐色色素沈着			0	0	0	0	7	2	3	5
胆管増生			64	62	60	▼21	11	12	14	6
鉍質沈着			0	0	1	0	0	0	0	0
被膜炎			0	0	0	0	0	1	0	0
髓外造血増加			1	0	2	0	1	2	0	0
うっ血			0	0	0	1	0	0	0	0
血栓			0	0	0	0	0	0	1	0
単核細胞浸潤			1	0	0	0	6	5	2	3
腎臓	慢性腎症の初期変化		30	29	26	31	32	39	38	32
	慢性腎症		32	33	31	29	8	5	5	3
	近位尿細管細胞内褐色色素沈着増加		2	1	4	2	24	32	24	27
	近位尿細管細胞硝子滴変性		1	0	0	0	0	0	1	1
	尿細管萎縮		16	18	19	19	5	7	9	8
	硝子円柱		5	9	11	7	10	7	11	16
	水腎症		0	0	0	0	0	0	1	0
	腎盂炎/腎盂腎炎		0	0	1	0	0	0	0	0
	線維化		0	0	0	1	0	0	0	1
	嚢胞		2	2	0	0	0	0	1	0
単核細胞浸潤		0	0	0	0	0	0	1	0	
卵巢	萎縮		-	-	-	-	0	1	0	0
	嚢胞		-	-	-	-	1	0	1	0
膵臓	腺房細胞萎縮		18	16	14	↓8	7	3	4	8
精巣	精細管萎縮		16	13	12	10	-	-	-	-
	間細胞過形成		16	15	16	13	-	-	-	-
	動脈炎		0	1	1	0	-	-	-	-
前立腺	前立腺炎		3	9	7	5	-	-	-	-
	検査標本なし		0	0	0	1	-	-	-	-
	前葉過形成		11	15	10	13	12	15	11	18
下垂体	中間葉過形成		1	0	0	0	0	0	0	0
	嚢胞		7	2	3	4	9	12	7	10
	血腫		0	0	0	0	1	0	0	0
	ラトケ嚢遺残		0	0	0	0	0	0	1	0
	うっ血		0	0	0	0	0	0	3	0
	後葉グリア細胞増殖		0	2	0	0	0	0	0	0
	検査標本なし		0	0	0	1	1	0	0	0

統計学的有意差: ↑↓: p<0.05、▲▼: p<0.01 (Fisher 直接確率計算法)

- : 該当臓器なし

表1〔非腫瘍性病変〕

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	3000	10000	30000	0	3000	10000	30000
全 動 物	臓器	所見\検査動物数	90	90	90	90	90	90	90	89
	甲状腺	濾胞囊胞状過形成	0	0	0	0	1	0	0	0
		濾胞肥大	1	2	0	2	0	0	1	0
		C細胞過形成	16	13	14	16	15	15	↑6	9
		嚢嚢遺残	1	1	3	1	2	2	2	0
		検査標本なし	0	0	0	1	0	0	0	0
	副腎	皮質過形成	13	18	7	10	19	14	↓9	↑7
		皮質壊死	1	0	0	0	0	0	0	0
		皮質脂肪変化	1	1	0	0	0	0	0	0
		萎縮	0	0	0	0	0	1	0	0
		髓質過形成	13	13	11	17	7	3	2	10
		被膜下細胞過形成	1	0	0	0	0	0	0	0
		嚢胞	0	0	0	0	1	0	0	0
		皮髓境界部褐色色素沈着増加	0	0	0	0	0	1	0	0
	副腎ペリオーシス	0	0	0	0	2	4	2	5	
	脊椎(腰部)	神経根神経線維変性	47	41	38	38	35	33	33	36
	皮膚	毛のう拡張	2	1	1	1	5	↓0	2	5
	乳腺	腺房拡張	-	-	-	-	20	24	18	17
		検査標本なし	-	-	-	-	3	5	6	4
	腹腔	脂肪壊死	0	1	1	1	5	↓0	↓0	3

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01 (Fisher直接確率計算法)

-：該当臓器なし

表2〔腫瘍性病変〕

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	3000	10000	30000	0	3000	10000	30000
52 週	臓器	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10
	肺	腺腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0
	子宮角	子宮内膜間質ポリープ (B)	—	—	—	—	0	1	1	1
	下垂体	前葉腺腫 (B)	0	0	0	0	2	0	3	0
	耳介	シュワン細胞腫 (B)	0	0	0	0	1	0	0	0
	皮膚	線維腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0
78 週	臓器	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	9
	造血器系	単核球性白血病 (M)	0	0	0	0	0	0	1	1
	肺	腺腫 (B)	0	0	1	1	0	0	0	0
	肝臓	肝細胞腺腫 (B)	0	0	0	1	0	0	0	0
		肝細胞癌 (M)	0	1	0	1	0	0	0	0
	精巣	間細胞腫 (B)	3	7	6	7	—	—	—	—
	子宮角	子宮内膜間質ポリープ (B)	—	—	—	—	2	2	4	1
	下垂体	前葉腺腫 (B)	1	0	1	2	1	3	2	1
	甲状腺	C細胞腺腫 (B)	1	0	0	0	1	0	0	0
	副腎	褐色細胞腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0
	皮膚	乳頭腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	0
		脂肪腫 (B)	2	0	0	0	1	0	0	0
		組織球性肉腫 (M)	0	0	0	0	1	0	0	0
		検査標本なし	0	0	0	0	0	0	0	1
死亡・ 切迫殺	臓器	所見\検査動物数	10	8	9	15	11	7	13	5
	心臓	シュワン細胞腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0
	造血器系	悪性リンパ腫 (M)	0	0	0	0	0	1	0	0
		単核球性白血病 (M)	3	3	5	6	2	1	4	2
	大腿骨骨髓	組織球腫 (B)	0	0	0	0	0	1	0	0
	胸骨骨髓	組織球腫 (B)	0	0	0	0	0	1	0	0
	脊椎骨髓	組織球腫 (B)	0	0	0	0	0	1	0	0
	肺	腺腫 (B)	1	1	1	0	0	0	1	1
		腺癌 (M)	0	1	0	0	0	0	0	0
	前胃	悪性線維性組織球腫 (M)	0	0	0	0	1	0	0	0
	腺胃	平滑筋腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	0
	大腸	脂肪腫 (B)	0	0	0	1	0	0	0	0
	肝臓	肝細胞腺腫 (B)	0	0	1	0	1	0	0	0
	膵臓	島細胞腺腫 (B)	0	0	0	2	0	0	0	0
		シュワン細胞腫 (B)	0	0	0	1	0	0	0	0
	精巣	間細胞腫 (B)	7	6	7	11	—	—	—	—
		中皮腫 (B)	0	1	0	0	—	—	—	—

統計学的有意差: ↑↓: p<0.05、◆♣: p<0.01 (Fisher 直接確率計算法)

(B): 良性腫瘍

(M): 悪性腫瘍

—: 該当臓器なし

表2 [腫瘍性病変]

検査 時期	性別		雄				雌				
	投与量 (ppm)		0	3000	10000	30000	0	3000	10000	30000	
死亡・ 切迫殺	臓器	所見\検査動物数	10	8	9	15	11	7	13	5	
	包皮腺	腺腫 (B)	0	1	1	0	-	-	-	-	
	子宮角	子宮内膜間質ポリープ (B)	-	-	-	-	3	2	2	0	
		平滑筋肉腫 (M)	-	-	-	-	1	0	0	0	
	子宮頸部	血管腫 (B)	-	-	-	-	0	0	1	0	
		腺癌 (M)	-	-	-	-	0	0	1	0	
		悪性シュワン細胞腫 (M)	-	-	-	-	3	1	0	0	
		悪性線維性組織球腫 (M)	-	-	-	-	1	0	0	0	
	下垂体	前葉腺腫 (B)	3	1	0	3	4	2	2	2	
	甲状腺	C細胞腺腫 (B)	2	0	0	2	1	0	0	0	
	副腎	褐色細胞腫 (B)	3	1	1	1	0	0	2	0	
	大脳	髓膜腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0	
	小脳	神経膠腫 (B)	0	0	1	0	0	0	0	0	
	耳	ジンバル腺扁平上皮癌 (M)	0	0	0	1	0	0	0	0	
	耳介	乳頭腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	0	
	皮膚	線維腫 (B)	1	0	1	1	0	0	1	2	
		シュワン細胞腫 (B)	0	0	0	1	0	0	1	0	
		基底細胞癌 (M)	0	1	0	0	0	0	0	0	
	乳腺	線維腺腫 (B)	0	0	0	0	2	2	1	2	
		線維腫 (B)	1	1	0	0	0	0	0	0	
	腹腔	悪性中皮腫 (M)	1	0	1	0	0	0	1	0	
	最終 屠殺	臓器	所見\検査動物数	40	42	41	35	39	43	37	45
		心臓	シュワン細胞腫 (B)	2	1	1	1	2	0	0	1
		造血器系	悪性リンパ腫 (M)	0	0	0	0	0	0	1	0
単核球性白血病 (M)			2	3	3	6	2	3	1	6	
脾臓		血管腫 (B)	0	0	0	0	0	1	0	0	
肺		腺腫 (B)	5	6	2	2	1	1	0	1	
		腺癌 (M)	0	1	1	1	0	0	0	0	
口唇		基底細胞癌 (M)	0	0	0	0	0	0	1	0	
小腸		粘液癌 (M)	0	1	0	0	0	0	0	0	
		平滑筋肉腫 (B)	0	0	0	0	1	0	0	0	
肝臓		肝細胞腺腫 (B)	1	0	1	4	0	0	0	4	
		肝細胞癌 (M)	0	0	0	1	0	0	0	1	
膵臓		島細胞腺腫 (B)	3	5	3	4	1	0	1	1	
腎臓		腺腫 (B)	0	0	0	0	0	1	0	0	
膀胱		乳頭腫 (B)	0	0	0	0	0	1	0	0	
		移行上皮癌 (M)	0	0	0	0	0	0	1	0	

統計学的有意差: ↑↓: p<0.05、◆♣: p<0.01 (Fisher 直接確率計算法)

(B): 良性腫瘍

(M): 悪性腫瘍

- : 該当臓器なし

表2〔腫瘍性病変〕

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	3000	10000	30000	0	3000	10000	30000
最終 屠殺	臓器	所見\検査動物数	40	42	41	35	39	43	37	45
	精巣	間細胞腫 (B)	36	35	38	32	-	-	-	-
	前立腺	腺腫 (B)	1	0	1	2	-	-	-	-
	包皮腺	腺腫 (B)	0	0	1	0	-	-	-	-
	卵巢	顆粒膜細胞腫 (B)	-	-	-	-	1	0	0	0
		腺癌 (M)	-	-	-	-	0	0	1	0
		検査標本なし	-	-	-	-	0	1	0	0
	子宮角	子宮内膜間質ポリープ (B)	-	-	-	-	11	10	7	11
		腺腫 (B)	-	-	-	-	2	1	0	0
		腺癌 (M)	-	-	-	-	1	0	0	0
	陰核腺	腺腫 (B)	-	-	-	-	1	2	0	1
		腺癌 (M)	-	-	-	-	0	1	1	0
	下垂体	前葉腺腫 (B)	9	13	9	4	15	↑26	22	14
		検査標本なし	0	0	0	1	0	0	0	0
	甲状腺	C細胞腺腫 (B)	6	3	7	6	1	4	3	4
		濾胞細胞腺癌 (M)	0	1	0	0	0	0	0	0
		乳頭状腺癌 (M)	0	0	0	0	0	0	1	1
		C細胞癌 (M)	0	2	0	0	0	0	1	0
	副腎	皮質腺腫 (B)	0	1	0	0	1	0	1	0
		褐色細胞腫 (B)	5	6	4	1	2	1	0	2
	大脳	顆粒細胞腫 (B)	0	0	0	1	0	0	0	0
	脊椎骨	骨腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0
	骨格筋	線維腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0
	耳	外耳乳頭腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0
		ジンバル腺癌 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0
	耳介	シュワン細胞腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	0
	皮膚	乳頭腫 (B)	1	1	0	0	0	0	0	0
		角化棘細胞腫 (B)	1	1	1	1	0	0	1	0
皮脂腺腺腫 (B)		0	1	2	0	0	0	0	0	
線維腫 (B)		3	2	3	2	0	1	0	1	
脂肪腫 (B)		0	0	1	0	0	0	0	0	
シュワン細胞腫 (B)		0	0	0	1	0	0	0	0	
基底細胞癌 (M)		0	1	1	0	0	0	1	0	
血管肉腫 (M)		1	0	0	0	0	0	0	0	
悪性線維性組織球腫 (M)		0	0	0	1	1	0	0	0	
検査標本なし	1	1	0	1	0	0	0	0		
乳腺	線維腺腫 (B)	1	1	1	2	2	5	3	8	

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01 (Fisher 直接確率計算法)

(B)：良性腫瘍

(M)：悪性腫瘍

-：該当臓器なし

表2〔腫瘍性病変〕

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	3000	10000	30000	0	3000	10000	30000
最終 屠殺	臓器	所見\検査動物数	40	42	41	35	39	43	37	45
	乳腺	線維腫 (B)	1	0	1	0	0	0	0	1
		腺癌 (M)	0	0	0	0	0	0	1	0
	腹腔	悪性中皮腫 (M)	0	1	1	1	1	0	0	0
		脂肪肉腫 (M)	1	0	0	1	0	0	0	0
全動物	臓器	所見\検査動物数	90	90	90	90	90	90	90	89
	心臓	シュワン細胞腫 (B)	3	1	1	1	2	0	0	1
	造血器系	悪性リンパ腫 (M)	0	0	0	0	0	1	1	0
		単核球性白血病 (M)	5	6	8	12	4	4	6	9
	大腿骨骨髓	組織球腫 (B)	0	0	0	0	0	1	0	0
	胸骨骨髓	組織球腫 (B)	0	0	0	0	0	1	0	0
	脊椎骨髓	組織球腫 (B)	0	0	0	0	0	1	0	0
	脾臓	血管腫 (B)	0	0	0	0	0	1	0	0
	肺	腺腫 (B)	6	8	4	3	1	1	1	2
		腺癌 (M)	0	2	1	1	0	0	0	0
	口唇	基底細胞癌 (M)	0	0	0	0	0	0	1	0
	前胃	悪性線維性組織球腫 (M)	0	0	0	0	1	0	0	0
		平滑筋腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	0
	小腸	粘液癌 (M)	0	1	0	0	0	0	0	0
		平滑筋腫 (B)	0	0	0	0	1	0	0	0
	大腸	脂肪腫 (B)	0	0	0	1	0	0	0	0
	肝臓	肝細胞腺腫 (B)	1	0	2	5	1	0	0	4
		肝細胞癌 (M)	0	1	0	↑5	0	0	0	1
	膵臓	島細胞腺腫 (B)	3	5	3	6	1	0	1	1
		シュワン細胞腫 (B)	0	0	0	1	0	0	0	0
	腎臓	腺腫 (B)	0	0	0	0	0	1	0	0
	膀胱	乳頭腫 (B)	0	0	0	0	0	1	0	0
		移行上皮癌 (M)	0	0	0	0	0	0	1	0
	精巣	間細胞腫 (B)	46	48	51	50	-	-	-	-
		中皮腫 (B)	0	1	0	0	-	-	-	-
	前立腺	腺腫 (B)	1	0	1	2	-	-	-	-
	包皮腺	腺腫 (B)	0	1	2	0	-	-	-	-
	卵巢	顆粒膜細胞腫 (B)	-	-	-	-	1	0	0	0
		腺癌 (M)	-	-	-	-	0	0	1	0
		検査標本なし	-	-	-	-	0	1	0	0
子宮角	子宮内膜間質ポリープ (B)	-	-	-	-	16	15	14	13	
	腺腫 (B)	-	-	-	-	2	1	0	0	

統計学的有意差: ↑↓: p<0.05、◆♣: p<0.01 (Fisher 直接確率計算法)

(B): 良性腫瘍

(M): 悪性腫瘍

-: 該当臓器なし

表2〔腫瘍性病変〕

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	3000	10000	30000	0	3000	10000	30000
	臓器	所見\検査動物数	90	90	90	90	90	90	90	89
全 動 物	子宮角	腺癌 (M)	—	—	—	—	1	0	0	0
		平滑筋肉腫 (M)	—	—	—	—	1	0	0	0
	子宮頸部	血管腫 (B)	—	—	—	—	0	0	1	0
		腺癌 (M)	—	—	—	—	0	0	1	0
		悪性シュワン細胞腫 (M)	—	—	—	—	3	1	0	0
		悪性線維性組織球腫 (M)	—	—	—	—	1	0	0	0
	陰核腺	腺腫 (B)	—	—	—	—	1	2	0	1
		腺癌 (M)	—	—	—	—	0	1	1	0
	下垂体	前葉腺腫 (B)	13	14	10	9	22	31	29	17
		検査標本なし	0	0	0	1	0	0	0	0
	甲状腺	C細胞腺腫 (B)	9	3	7	8	3	4	3	4
		濾胞細胞腺癌 (M)	0	1	0	0	0	0	0	0
		乳頭状腺癌 (M)	0	0	0	0	0	0	1	1
	副腎	C細胞癌 (M)	0	2	0	0	0	0	1	0
		皮質腺腫 (B)	0	1	0	0	1	0	1	0
	大脳	褐色細胞腫 (B)	8	8	5	↓2	2	1	2	2
		髄膜腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0
		顆粒細胞腫 (B)	0	0	0	1	0	0	0	0
	小脳	神経膠腫 (B)	0	0	1	0	0	0	0	0
	脊椎骨	骨腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0
	骨格筋	線維腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0
	耳	外耳乳頭腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0
		ジンバル腺扁平上皮癌 (M)	0	0	0	1	0	0	0	0
		ジンバル腺癌 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0
	耳介	乳頭腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	0
		シュワン細胞腫 (B)	0	0	0	0	1	0	1	0
	皮膚	乳頭腫 (B)	1	1	0	0	0	0	1	0
		角化棘細胞腫 (B)	1	1	1	1	0	0	1	0
		皮脂腺腺腫 (B)	0	1	2	0	0	0	0	0
		線維腫 (B)	4	3	4	3	0	1	1	3
脂肪腫 (B)		2	0	1	0	1	0	0	0	
シュワン細胞腫 (B)		0	0	0	2	0	0	1	0	
基底細胞癌 (M)		0	2	1	0	0	0	1	0	
血管肉腫 (M)		1	0	0	0	0	0	0	0	
組織球性肉腫 (M)		0	0	0	0	1	0	0	0	
	悪性線維性組織球腫 (M)	0	0	0	1	1	0	0	0	

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↕：p<0.01 (Fisher 直接確率計算法)

(B)：良性腫瘍

(M)：悪性腫瘍

—：該当臓器なし

表2〔腫瘍性病変〕

検査 時期	性別		雄				雌				
	投与量 (ppm)		0	3000	10000	30000	0	3000	10000	30000	
全動物	臓器	所見\検査動物数	90	90	90	90	90	90	90	89	
	皮膚	検査標本なし	1	1	0	1	0	0	0	1	
	乳腺	線維腺腫 (B)	1	1	1	2	4	7	4	10	
		線維腫 (B)	2	1	1	0	0	0	0	1	
		腺癌 (M)	0	0	0	0	0	0	1	0	
	腹腔	悪性中皮腫 (M)	1	1	2	1	1	0	1	0	
		脂肪肉腫 (M)	1	0	0	1	0	0	0	0	
合計	検査動物数		90	90	90	90	90	90	90	89	
	腫瘍数		良性	101	102	97	97	60	69	63	59
			悪性	9	16	12	22	14	7	17	11
	腫瘍総数		110	118	109	119	74	76	80	70	
	担腫瘍動物数		良性	51	58	55	57	39	44	46	41
			悪性	8	14	12	20	13	6	16	10
	担腫瘍動物数		51	58	55	58	45	45	51	45	

統計学的有意差：↑↓：p < 0.05、*↓：p < 0.01 (Fisher 直接確率計算法)

(B)：良性腫瘍

(M)：悪性腫瘍

—：該当臓器なし

(12) 繁殖毒性及び催奇形性試験

1) ジベレリン原体のラットを用いた繁殖毒性試験

(資料 28)

試験機関：(財) 残留農薬研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1992 年

検体：ジベレリン原体

検体純度：

供試動物：SD 系ラット (Cj; CD)、1 群雌雄各 24 匹、投与開始時 5 週齢、体重；雄 117~133 g、雌 105~116 g

投与期間：P 世代；投与開始から F₁ 児離乳時までの約 18 週間、

F₁ 世代；離乳時から F₂ 児離乳時までの約 18 週間

(1991 年 7 月 16 日~1992 年 3 月 17 日)

投与方法：検体を 0、3000、10000 及び 30000 ppm の濃度で飼料に混入し、随時摂食させた。検体を混入した飼料は 1 ヶ月に 1 回調製した。

用量設定根拠：

交配・調整・選抜及び観察・検査項目：概要を次頁の表にまとめた。

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。

体重及び摂餌量；育成期間中は雌雄とも体重及び摂餌量を毎週測定した。交配開始後の体重及び摂餌量は、雄については 2 週間に 1 回の頻度で、交尾の確認された雌については妊娠 0、7、14 及び 20 日ならびに哺育 0、7、14 及び 21 日に測定した。児動物の体重は哺育 0、4、7、14 及び 21 日に測定した。

交配及び妊娠の確認；雌を同群の雄と 1 対 1 で同居させて交配を行い、膣栓または膣垢中に精子が確認された場合に交尾成立と判断し、妊娠 0 日とした。

繁殖性に関する指標；交配、妊娠及び哺育の各期間の観察に基づき次の指標を算出した。

交尾率 (%) = (交尾確認動物数 / 同居させた動物数) × 100

妊娠率 (%) = (妊娠雌動物数 / 交尾確認雌動物数) × 100

出産率 (%) = (生存児を出産した雌動物数 / 妊娠雌動物数) × 100

性比 = 哺育 0 日生存雄児数 / 哺育 0 日生存総児数

哺育 0 日生存率 (%) = (哺育 0 日生存児数 / 産児数) × 100

哺育 4 日生存率 (%) = (哺育 4 日児数調整前生存児数 / 哺育 0 日生存児数) × 100

哺育 21 日生存率 (%) = (哺育 21 日生存児数 / 哺育 4 日児数調整後生存児数) × 100

妊娠期間 (妊娠 0 日から分娩完了日までの日数)

性周期

精巣上体の精子数及び形態

試験の概要

世代	期間	交配・調整・選抜	観察・検査項目
P	育成期間 (10 週間)	雌 1 対雄 1 で同居。交尾は膣栓または膣垢中の精子で確認 (妊娠 0 日)	生死及び一般状態の観察 (毎日) 体重、摂餌量測定; 週 1 回 性周期; 交配 1 週間前から毎日
	交配 (最長 3 週間)		交尾率を記録
	妊娠 (3 週間)		母動物体重、摂餌量測定; 妊娠 0、7、14、21 日
	出産		妊娠期間、妊娠率、出産率を記録 産児の数 (生存及び死亡)、体重、性比を記録
	哺育 (3 週間)		生後 4 日に各同腹児数を 8 匹(可能ならば雄 4 匹、雌 4 匹)に調整
F ₁	離乳	生後 21~24 日の F ₁ 離乳児から継代用の各群雄 24 匹雌 24 匹を選抜、その他は屠殺 P 世代親動物の屠殺	選抜されなかった児動物の肉眼的病理検査 親動物の肉眼的病理検査、臓器重量測定、病理組織学的検査
	育成期間 (10 週間)	(P 世代に準ずる)	(P 世代に準ずる)
	交配 (最長 3 週間)		(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)		
F ₂	離乳	F ₂ 離乳児の屠殺 F ₁ 世代親動物の屠殺	離乳児の肉眼的病理検査 親動物の肉眼的病理検査、臓器重量測定、病理組織学的検査

病理検査; P 世代及び F₁ 世代親動物はそれぞれの児動物離乳後に、生後 4 日に選抜されなかった児動物は生後 4 日に、F₁ 世代親動物に選抜されなかった F₁ 児動物と全ての F₂ 児動物については生後 21~26 日に安楽死させ、肉眼的病理検査を行った。

計画屠殺した P 世代及び F₁ 世代親動物から繁殖性に異常のみられなかった雌雄各 10 匹を選抜し、以下の臓器重量を測定した。

下垂体、肝臓、腎臓、副腎、卵巣、子宮、精巣、精巣上体、精囊、前立腺

対照群と 30000 ppm 群の親動物 (途中死亡例を除く) については、以下の組織について病理標本を作成し、鏡検した。

卵巣、子宮、膈、精巣、精巣上体、前立腺、精囊、下垂体

3000 ppm 群と 10000 ppm 群の親動物については、妊娠の証拠が得られなかった雌雄の生殖器官と下垂体について病理組織学的検査を行った。また、対照群と 30000 ppm 投与群の両世代雌雄各 10 匹を選抜し、盲腸の病理組織学的検査を行った。

結果: 概要を次頁の表に示した。

親動物; 30000 ppm 群では、P 及び F₁ 両世代の雌雄で、臨床所見として軟便の出現頻度が有意に上昇した。また、雌雄の体重が対照群をやや下回り、雄では P 世代の最終体重と F₁ 世代の投与 5 週以降の

体重に、雌ではF₁世代の投与第10週、妊娠20日、哺育14日及び最終体重にそれぞれ対照群との間で統計学的に有意な差が認められた。これらの群の肉眼的病理検査では、軟便に対応する変化と思われる盲腸の膨満が、大多数の動物に観察された。一部の動物について盲腸の病理組織学的検査を実施したが、実質組織に異常はみられなかった。また、30000 ppm 群では、雄の肝臓重量の対体重比がP世代でやや上昇し、F₁世代では対照群より統計学的に有意に高かった。その他の臓器重量の変化については、世代間または投与量間で一定の関係が認められないこと、病理組織学的検査においても異常は認められなかったことから、いずれも偶発的な変動と考えられた。繁殖能に対する影響はいずれの投与群にも認められなかった。平均着床数が、F₁世代の3000及び30000 ppmの投与群で対照群値より統計学的に有意に低かったが、これらの(16.0及び14.8)はいずれも当研究所における背景データ(14.7~16.9)の範囲内であり、むしろ対照群における値(17.4)が通常の値よりやや高いことから、いずれも偶発的な変動と考えられた。また、P世代の30000 ppm 群で正常形態精子率の有意な低値がみられたが、F₁世代の正常形態精子率には異常が認められなかったことから、偶発的な変動と考えられた。

児動物：30000 ppm 群では、雌雄のF₁児動物の哺育14日及び21日における体重が、いずれも対照群の体重より統計学的に有意に低かった。また、F₂児動物の体重についても、哺育期間の前半には産児数の低値に起因すると考えられる有意な高値がみられたものの、離乳時における体重は雌雄とも対照群値をやや下回った。この投与群では、F₁及びF₂離乳児の剖検時に盲腸の膨満が高頻度に観察され、その出現率は対照群より統計学的に有意に高かった。また、F₁離乳児においては、腺胃壁の肥厚の出現頻度も対照群の値より有意に高かった。

その他、哺育0日の観察で死亡の発現率がF₁児動物の10000 ppm 群で有意に高く、F₂児動物の30000 ppm 群で有意に低かった。また、哺育5日以降の観察では臍部の膨隆の発現率がF₁児動物の3000 ppm 群で有意に高かった。しかし、これらの出現率に世代間または投与量間に一定の関係が認められないことから、いずれも偶発的な変動と考えられた。

平均産児数は、F₂児動物の3000及び30000 ppmの投与群で対照群の値より統計学的に有意に低かったが、これらの値(14.6及び13.7)はいずれも当研究所における背景データ(13.1~15.9)の範囲内であり、むしろ対照群における値(16.0)が通常の値よりやや高いこと、着床数についても同様の変動が認められていることから、いずれも偶発的な変化であると考えられた。性比については、F₂児動物の30000 ppm 群で対照群の値との間に統計学的に有意な差がみられたが、この値(0.541)は当研究所における背景データ(0.434~0.584)の範囲内であることから、偶発的な変動と考えられた。

離乳児の剖検では、臍帯ヘルニアの発現率がF₂児動物の3000 ppm 群で有意に高かったが、10000 ppm 以上の投与群においてはこの所見の発現頻度に対照群との間で有意な差は認められなかったことから、偶発的な変動と考えられた。

以上の結果より、2世代にわたって本剤を飼料に混入して投与した場合、30000 ppm 投与の親動物で軟便及び盲腸膨満の発現頻度増加、体重の低値及び肝臓重量対体重比の増加がみられ、児動物では体重の低値ならびに盲腸膨満及び腺胃壁肥厚の発現頻度増加が認められた。繁殖能に対しては何ら影響がみられなかった。

従って、無毒性量は親動物及び児動物に対して10000 ppm (P：雄767 mg/kg、雌870 mg/kg、F₁：雄853 mg/kg、雌997 mg/kg)と判断される。繁殖については最高投与用量の30000 ppm でも影響がなかった。

結果の概要

(1/3)

世代		親：P				親：F ₁				
投与量 (ppm)		対照	3000	10000	30000	対照	3000	10000	30000	
動物数	雄	24	24	24	24	24	24	24	24	
	雌	24	24	24	24	24	24	24	24	
死亡	雄	2	1	0	1	1	1	1	1	
	雌	0	0	0	0	0	0	1	0	
一般状態 ^{a)} ; 軟便	雄	0	0	0	♂9	0	1	2	♂19	
	雌	0	0	0	♂7	0	0	0	♂8	
親動物	体重 b)	雄	—	有意差なし	有意差なし	↓97 : 投与 18 週	—	有意差なし	有意差なし	↓94~97 : 投与 5~7、 12~18 週 ♂94~95 : 投与 8~10 週
		雌	—	有意差なし	↑105 : 妊娠 14 日	有意差なし	—	有意差なし	有意差なし	↓95 : 投与 10 週 ↓95 : 妊娠 20 日
	摂餌量 b)	雄	—	↑107 : 投与 10 週 ♂105 : 投与 1 週	↑104 : 投与 2 週 ♂105 : 投与 1 週	↑105 : 投与 1 週 ♂107 : 投与 4 週 ♂107~108 : 投与 2、3 週	—	↑107 : 投与 4 週 ♂104 : 投与 3 週	↑104 : 投与 3 週	↑104~107 投与 3、4 週
		雌	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし
検体採取量 ^{c)} (育成期)	雄	—	233	767	2397	—	256	853	2607	
	雌	—	263	870	2700	—	299	997	3058	

太枠は検体投与による影響であることを示す。

— : 対照群

a) 表中の数値は育成期に所見がみられた動物数を示す。

b) 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

c) 各週平均検体採取量から育成期の平均値を申請者が算出した。

対照群との有意差の検定 (↑↓ : P<0.05, ♂♂ : P<0.01, ♂♂♂ : P<0.001)

Student または Aspin-Welch の t 検定 : 体重、摂餌量

Fisher 直接確率検定 : 臨床所見の発現頻度

結果の概要 (つづき)

(2/3)

世代		親 : P				親 : F ₁				
投与量 (ppm)		対照	3000	10000	30000	対照	3000	10000	30000	
肉眼的病理検査 ^{d)} ; 盲腸膨満	雄	0	0	0	○20	0	0	0	○23	
	雌	0	0	0	○18	0	0	0	○24	
(mg) 臓器重量	雄	副腎	38.7	↓34.6	39.4	36.7	36.7	37.5	37.8	36.1
		腎臓	2157	2060	2098	↓1954	2095	2004	2126	2056
	雌	下垂体	16.4	17.7	17.8	↑19.4	18.1	18.4	17.6	18.3
対体重比 (%) 臓器重量	雄	肝臓	3.65	3.72	3.82	3.83	3.89	3.87	4.10	↑4.37
		副腎	0.00671	↓0.00593	0.00663	0.00656	0.00596	0.00605	0.00586	0.00617
		精巣	0.315	↓0.290	0.301	0.322	0.308	0.294	0.296	0.319
	雌	精巣上体	0.118	0.115	0.117	↑0.127	0.114	0.112	0.112	0.123
		下垂体	0.00516	0.00532	0.00537	↑0.00636	0.00540	0.00536	0.00524	0.00561
	卵巣	0.0190	0.0181	0.0196	↑0.0217	0.0203	0.0190	0.0203	0.0204	
親動物	病理組織学的検査		検体投与に起因する異常なし				検体投与に起因する異常なし			
	交尾率 (%)	雄	100	100	100	100	100	95.8	95.8	100
		雌	100	100	100	100	100	95.8	95.8	100
	妊娠率 (%)		100	95.8	95.8	95.8	91.7	100	95.7	100
	出産率 (%)		100	100	100	100	100	100	95.5	100
	妊娠期間 (日)		22.4	22.3	22.2	22.2	22.2	22.3	22.3	22.4
	平均着床数		16.2	15.2	15.7	15.7	17.4	↓16.0	16.5	○14.8
	精子数 (×10 ⁶)	/精巣上体	189	189	196	212	186	164	186	177
		/g 精巣上体	659	682	665	705	586	605	627	579
	正常形態精子率 (%)		97.0	96.4	96.1	↓94.1	94.9	95.3	96.7	96.0
児動物	平均生存産児数		14.8	13.9	14.5	14.5	16.0	↓14.6	15.1	↑13.7
	性比		0.483	0.500	0.527	0.483	0.473	0.503	0.473	↑0.541
	生存率 (%)	哺育0日	97.5	97.0	95.5	95.8	96.7	98.1	96.3	98.7
		哺育4日	99.5	99.1	97.3	98.3	97.8	97.2	97.2	99.7
		哺育21日	100.0	99.5	98.9	99.5	98.3	100.0	98.8	100.0
	一般状態 ^{e)} ; 死亡 (哺育0日)		9/354	10/320	↑16/334	14/333	12/353	5/336	11/317	↓4/329
臍部膨隆 (哺育5-7日)		1/192	↑9/184	2/183	0/184	2/176	8/182	0/168	3/190	

太枠は検体投与による影響であることを示す。

- : 対照群

d) 表中の数値は所見がみられた動物数を示す。

e) 表中の数値は所見がみられた動物数/検査動物数を示す。

対照群との有意差の検定 (↑↓ : P < 0.05, ↑↑ : P < 0.01, ○○ : P < 0.001)

Student または Aspin-Welch の t 検定 : 着床数、精子数、臓器重量、臓器重量体重比、平均生存産児数

Fisher 直接確率検定 : 臨床所見及び病理所見の発現頻度、交尾率、妊娠率、出産率、性比

Mann-Whitney の U 検定 : 正常形態精子率、妊娠期間、児動物生存率

結果の概要 (つづき)

(3/3)

世代			親 : P				親 : F ₁					
投与量 (ppm)			対照	3000	10000	30000	対照	3000	10000	30000		
児動物	体重 (g)	生後 0 日	雄	7.1	7.3	7.2	7.2	6.7	↑7.1	6.9	♂7.5	
			雌	6.6	↑7.0	6.8	6.8	6.3	6.6	6.6	♂7.0	
		生後 4 日 f)	雄	12.0	12.3	12.3	12.0	11.3	11.9	11.9	↑12.3	
			雌	11.5	11.9	11.7	11.4	10.9	11.3	11.5	↑11.8	
		生後 7 日	雄	19.8	19.8	19.6	19.4	18.3	19.3	19.2	↑19.9	
			雌	18.9	19.1	18.8	18.5	17.5	18.4	18.7	↑19.1	
		生後 14 日	雄	40.5	40.5	39.6	↓38.5	38.7	39.7	39.2	39.6	
			雌	38.9	38.8	38.1	↓37.1	37.2	38.0	38.4	38.1	
		生後 21 日	雄	65.4	65.9	64.7	↑61.3	65.2	66.0	66.1	63.6	
			雌	61.8	62.2	61.9	↑58.1	61.9	62.2	62.9	60.4	
		肉眼的病理検査 ^{g)} ;										
		検査児数			144	135	133	135	173	182	166	190
		臍帯ヘルニア			1(1)	6(5)	2(2)	0	0	↑6(4)	0	3(3)
		腺胃壁肥厚			0	0	0	♂82(20)	0	0	0	0
盲腸膨満			0	0	0	♂101(23)	0	0	0	♂84(17)		

太字は検体投与による影響であることを示す。

f) 児動物数調整前

g) 離乳時の肉眼的病理検査結果。()内数値は腹数を示す。

対照群との有意差の検定 (↑↓: P<0.05, ↑↓: P<0.01, ♂: P<0.001)

Student または Aspin-Welch の t 検定: 児動物体重

Fisher 直接確率検定: 病理所見の発現頻度

2) ジベレリン原体のラットにおける催奇形性試験

(資料 29)

試験機関：(財)化学品検査協会
[GLP 対応]
報告書作成年：1989 年

検体純度：

供試動物：SD 系妊娠ラット (Crj:CD)、1 群 26 匹、交配開始時 12 週齢、
妊娠 0 日体重 221.5~278.0 g

投与期間：妊娠 7 日から 17 日までの 11 日間

(1988 年 9 月 20 日投与開始~1988 年 10 月 3 日帝王切開開始)

投与方法：検体を 0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC)水溶液に懸濁し、0 及び 1000 mg/kg/day の投与レベルで、妊娠 7^{*)} 日から 17 日までの 11 日間、毎日 1 回強制経口投与した。
なお、対照群には 0.5% CMC 水溶液を同様に投与した。

^{*)} 膣垢中に精子を確認した日を妊娠 0 日とした。

用量設定根拠：

観察・検査項目：

母動物：妊娠 0 日から 20 日まで毎日、一般状態を観察し、体重及び摂餌量を測定した。妊娠 20 日に帝王切開し、黄体数、着床数、早期・後期吸収胚数、死亡胎児数及び生存胎児数を検査した。

生存胎児：性比、体重及び胎盤重量を算出、測定し、外表異常の有無を観察した。各同腹児の約 1/2 の胎児については内臓異常の有無を観察し、残りの胎児については、70%エタノール固定後、アリザリンレッド S による透明骨格標本作製し、骨格異常の有無及び骨化進行度について観察した。

結果：概要を次表に示した。

母動物：一般状態、体重、摂餌量及び肉眼的病理所見、ならびに帝王切開時における黄体数、着床数、吸収胚・死亡胎児数及び生存胎児数のいずれにおいても、検体投与によると考えられる異常は認められなかった^{*)}。

生存胎児：性比、体重及び胎盤重量、ならびに外表、内臓及び骨格検査のいずれにおいても、検体投与によると考えられる異常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動物及び胎児に対する無毒性量はいずれも 1000 mg/kg/day 以上であった。また、1000 mg/kg/day でも胎児動物に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。

申請者注 1：投与群で着床前損失率の有意な低値がみられたが、毒性学的に意義のない変化と考えられた。

結果の概要

(1/2)

投与量 (mg/kg/day)		対照	1000		
1 群当りの動物数		26	26		
母動物	妊娠動物数	23	22		
	死亡数	0	0		
	一般状態	検体投与に起因する異常なし			
	体重変化	—	有意差なし		
	摂餌量	—	有意差なし		
	肉眼的病理所見	検体投与に起因する異常なし			
	着床所見	検査母動物数	23	22	
		黄体数 ^{a)}	15.7	15.3	
		着床数 ^{a)}	14.3	14.9	
		着床前損失率 (%)	8.6	↓2.4	
		吸収胚率 (%)	早期	5.2	5.2
			後期	0.3	0.0
		死亡胎児率 (%)	0.0	0.0	
		生存胎児数 ^{a)}	13.5	14.1	
胎児動物	性比 (雄/雌)		162/149	151/160	
	生存胎児体重 (g)	雄	4.02	4.01	
		雌	3.81	3.77	
	胎盤重量 (g)	雄	0.52	0.49	
		雌	0.50	0.48	
	外表検査	検査胎児数	311	311	
		異常のみられた胎児数	0	1	
		外脳	0	1	
	内臓検査 ^{b)}	検査胎児数	149	149	
		異常のみられた胎児数	5	4	
		胸腺頸部遺残	3(3)	1	
		左臍帯動脈	0	2(2)	
腸重複		2(2)	0		
尿管拡張	0	2(2)			

— : 対照群

着床前損失率 = ((黄体数 - 着床数) / 黄体数) × 100

吸収胚率 = (吸収胚数 / 着床数) × 100

死亡胎児率 = (死亡胎児数 / 着床数) × 100

a) 1 腹当たりの数値

b) () は腹数

対照群との有意差の検定 (↑↓ : P < 0.05, ↑↑ : P < 0.01)

Dunnnett 多重比較検定 : 体重、摂餌量、黄体数、着床数、生存胎児数、胎児体重、胎盤重量

χ² 検定 : 性比

Dunnnett 多重比較検定または Scheffe 多重比較検定

: 着床前損失率、吸収胚率、死亡胎児率、外表異常率、内臓異常率

結果の概要 (つづき)

(2/2)

投与量 (mg/kg/day)		対照	1000	
胎児動物	骨格検査 ^{b)}	検査胎児数	162	162
		異常のみられた胎児数	1	1
		波状肋骨	1	0
		短小肋骨	0	1
		変異のみられた胎児数	65(26)	74(26)
		腰肋	5(4)	7(6)
		胸椎体分葉化	1	1
		胸椎体分離	1	1
		仙椎弓分離	32(14)	29(13)
		尾椎弓分離	27(14)	41(14)
		骨化進行度	—	有意差なし

—: 対照群

b) () は腹数

対照群との有意差の検定 (↑↓: P<0.05, †‡: P<0.01)

Dunnett 多重比較検定: 頸椎体、頸椎弓、尾椎体及び尾椎弓の骨化数

Dunnett 多重比較検定または Scheffe 多重比較検定: 骨格異常率、骨化進行度

3) ジベレリン原体のウサギにおける催奇形性試験

(資料 30)

試験機関：(株)ポゾリサーチセンター
[GLP 対応]
報告書作成年：1992 年

検体純度：

供試動物：New Zealand White 種妊娠ウサギ (Kbl: NZW)、1 群 16 匹、交配時約 17 週齢、
体重 3.23～3.75 kg

投与期間：妊娠 6 日から 18 日までの 13 日間 (1992 年 2 月 24 日～1992 年 3 月 8 日)

投与方法：検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース(CMC)水溶液に懸濁し、0 及び 1000 mg/kg/day の投与
レベルで妊娠 6^{*)} 日から 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
0.5%CMC 水溶液を同様に投与した。

^{*)} 交尾を 2 回確認した翌日を妊娠 0 日とした。

用量設定根拠：

観察・検査項目：

母動物；一般状態及び生死を毎日観察し、妊娠 0、3、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26 及
び 28 日に体重を、妊娠 3、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26 及び 28 日に摂餌量を
測定した。妊娠 28 日目に帝王切開し、黄体数、着床数、生存胎児数及び死亡吸収胎児数を検
査した。

生存胎児；体重及び胎盤重量を測定し、外表異常の有無を観察した。全ての生存胎児について開腹して
性別を判定し、固定して内臓異常の有無を検査した。内臓検査後、全ての生存胎児について、
Dawson 法に準じて透明骨格標本を作成し、骨格異常の有無を検査した。

結 果：概要を次頁の表に示した。

母動物；1000 mg/kg 群では投与期間中に体重増加が抑制され、摂餌量が低値を示す傾向にあった。しか
し、剖検所見及び帝王切開時に得られた各所見には検体投与の影響は認められなかった。

1000 mg/kg 群では着床数及び生存胎児数に有意な低値が認められたが、同群では排卵数の指標
である妊娠黄体数の低値が認められていることから、着床数及び生存胎児数の低値は、検体投
与の影響よりは排卵数が少ないことに起因する偶発的な変化と考えられる。

生存胎児；生存及び発育に検体投与による影響は認められず、催奇形性も認められなかった。

以上の結果より、本剤を妊娠ウサギに投与したときの母動物に対する無毒性量は 1000 mg/kg/day 未
満、胎児動物に対する無毒性量は 1000 mg/kg/day 以上であった。また、1000 mg/kg/day でも胎児動
物に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。

結果の概要

(1/2)

投与量 (mg/kg/day)		対照	1000	
1 群当りの動物数		16	16	
母動物	妊娠動物数	14	16	
	死亡数	1	0	
	流早産数	0	1	
	一般状態	検体投与に起因する異常なし		
	平均体重	—	有意差なし	
	体重増加量(kg)	妊娠 6~18 日	0.21	▼ 0.09
		妊娠 8 日	141.5	▼ 118.3
	摂餌量(g/匹/日)	妊娠 16 日	143.2	↓ 106.1
		妊娠 24 日	104.6	↑ 129.4
	肉眼的病理所見		検体投与に起因する異常なし	
	着床所見	検査母動物数	13	15
		黄体数 ^{a)}	11.0	9.5
		着床数 ^{a)}	9.8	↓ 7.2
		着床率 (%)	88.8	76.1
早期吸収胚数		4	2	
後期吸収胚数		8	2	
死亡吸収胎児率 (%)		9.4	3.7	
生存胎児数 ^{a)}		8.8	↓ 6.9	
胎盤重量 (g)		3.05	3.35	
胎児動物	性比 (雄/雌)		0.93 / 0.76	
	生存胎児体重 (g)	雄	37.74 / 37.94	
		雌	37.64 / 35.84	
	外表検査 ^{c)}	検査胎児数	114	104
		異常のみられた胎児数	5 (4)	2 (2)
		複合異常 ^{b)}	1 (1)	0
		前肢手関節屈曲拘縮	4 (4)	0
		浮腫	1 (1)	0
		頭蓋裂	0	2 (2)
		臍帯ヘルニア	0	1 (1)
	内反足	0	1 (1)	

太枠は検体投与による影響であることを示す。—：対照群

着床率 = (着床数 / 黄体数) × 100

死亡吸収胎児率 = (死亡吸収胎児数 / 着床数) × 100

a) 1 腹当たりの数値 b) 無頭、脊椎裂、胸腹壁裂、前肢欠損、後肢完全合指の複合異常

c) () は腹数を示す。

対照群との有意差の検定 (↑↓: P<0.05, ▲▼: P<0.01)

Scheffe 法または多重比較法: 体重、摂餌量、黄体数、着床数、生存胎児数、胎児体重、胎盤重量

Wilcoxon 順位和検定: 着床率、死亡吸収胎児率、外表異常率

χ² 検定: 性比

結果の概要 (つづき)

(2/2)

投与量 (mg/kg/day)		対照	1000	
内臓検査 ^{c)}	検査胎児数	114 ^{d)}	102	
	異常のみられた胎児数	25(9)	21(11)	
	胸腺頭部遺残	6(2)	2(2)	
	肺分葉異常	1	2(2)	
	心臓形態異常	1	0	
	右冠状動脈口過剰	18(9)	17(10)	
	大動脈弓の変異			
	2型	1	0	
	3型	46(12)	43(12)	
	4型	38(12)	16(6)	
	胎児動物 骨格検査 ^{c)}	検査胎児数	114 ^{d)}	102
		異常のみられた胎児数	9(6)	3(2)
		左第10/右第11肋骨分岐	1	0
胸椎と肋骨の異常 ^{e)}		1	0	
肋骨分岐を伴う胸椎半脊椎 ^{f)}		0	1	
胸骨分節癒合		7(6)	2(2)	
変異のみられた胎児数		4(3)	1	
胸骨分節分離		1	1	
胸骨分節非対称		3(2)	0	
13肋骨を有する胎児数				
合計	80(13)	77(13)		
右側	6(5)	2(2)		
左側	10(7)	5(4)		
両側	64(12)	70(12)		
骨化進行度	—	有意差なし		

— : 対照群

c) () は異常が見られた腹数

d) 無頭、脊椎裂、胸腹壁裂、前肢欠損、後肢完全合指の複合異常のみられた胎児は観察不可能のため除外した。

d) 第9胸椎体の左側分岐とこれに伴う胸椎弓及び肋骨の過剰

e) 右第12肋骨分岐、左第13胸椎の半脊椎とこれに伴う胸椎弓及び肋骨の過剰

対照群との有意差の検定 (↑↓ : P < 0.05, ◆▼ : P < 0.01)

Scheffe 法または多重比較法 : 中手骨、中足骨、指骨及び仙尾椎骨の骨化数

Wilcoxon 順位和検定 : 内臓異常率、骨格異常率、骨格変異率、胸骨分節骨化度

4) ジベレリン原体のウサギにおける催奇形性試験；母動物毒性試験 (資料 40)

試験機関：WIL Research Laboratories Inc.

[GLP 対応]

報告書作成年：1996 年

試験目的：ウサギにおける催奇形性試験（資料 30）は、1000 mg/kg/day の 1 用量のみの試験で、母動物に体重増加抑制が認められ、母動物に対する無毒性量が特定できなかったことから、母動物に対する無毒性量を調べる目的で実施した。

検体純度：

供試動物：New Zealand White 種妊娠ウサギ、1 群 16 匹、人工授精時 約 7 ヶ月齢、体重 2994～4106 g

投与期間：妊娠 7 日から 19 日までの 13 日間（1995 年 10 月 10 日～1995 年 10 月 23 日）

投与方法：検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液に懸濁し、0、100、300 及び 1000 mg/kg/day の投与レベルで妊娠 7^{*)} 日から 19 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 0.5% CMC 水溶液を同様に投与した。

*) 人工授精を実施した当日を妊娠 0 日とした。

用量設定根拠；

観察・検査項目：

母動物；一般状態及び生死を毎日観察した。体重を妊娠 0、3、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28 及び 29 日に測定し、摂餌量は毎日測定した。妊娠 29 日目に帝王切開し、卵巣の黄体数を記録した。子宮は重量測定後に切開し、着床数、早期及び後期吸収胚数、生存及び死亡死胎児数を検査した。また、妊娠 29 日の体重と妊娠子宮重量から補正体重及び補正体重増加量を算出した。

生存胎児；体重を測定し、外表異常の有無を観察した。

結果；概要を次頁の表に示した。

母動物；いずれの投与群においても検体投与に関連した死亡あるいは流産は認められなかった。1000 mg/kg 投与群において軟便及び泌尿生殖器部分に褐色物質の所見の増加が認められ、これらは検体投与に関連した影響と考えられた。また、投与期間を通じ、1000 mg/kg 投与群において体重増加抑制及び摂餌量の低下が認められた。100 及び 300 mg/kg 投与群では母動物に対する毒性は明確に認められなかった。また、検体投与に関連した着床所見はいずれの投与群においても認められなかった。

生存胎児；1000 mg/kg 投与群の平均胎児体重 (43.9 g) は対照群の体重 (50.8 g) と比較して有意に減少したが、1000 mg/kg 投与群の平均胎児体重は背景データの範囲 (34.5～49.3 g) 内であり、対照群の平均値が背景データの最高値よりも高かったことから、検体投与に起因したものとは考えられなかった。外表検査において異常あるいは変異は認められなかった。

以上の結果より、本剤を妊娠ウサギに投与したときの母動物に対する無毒性量は 300 mg/kg/day であった。

結果の概要

投与量 (mg/kg/day)		対照	100	300	1000	
1 群当りの動物数		16	16	16	16	
母動物	妊娠動物数	13	14	13	14	
	死亡数	0	1	1 ^{a)}	0	
	流早産数	0	2	1	1	
	一般状態 ^{b)} ; 軟便	4/2	12/6	6/5	58/11	
	泌尿生殖器部褐色物質	3/1	1/1	0/0	43/9	
	平均体重 (g)	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし	
	体重 増加量 (g)	妊娠 6~20 日	302	216	320	↓ 128
		妊娠 20~29 日	92	44	112	↑ 208
		妊娠 24~26 日	8	16	17	↑ 96
	摂餌量 (g/day)	妊娠 8~10 日	213	198	210	↓ 171
		妊娠 12~14 日	207	170	205	↓ 167
		妊娠 16~18 日	216	185	225	↓ 164
		妊娠 6~20 日	214	190	217	↓ 172
	肉眼的病理所見	検体投与に起因する異常なし				
妊娠子宮重量 (g)	373.2	399.4	429.4	425.8		
補正体重増加量 (g)	315.4	171.3	293.3	210.2		
着床 所見	検査母動物数	13	11	11	13 ^{c)}	
	黄体数 ^{d)}	10.7	9.6	10.7	10.6	
	着床数 ^{d)}	5.9	6.9	7.4	7.5	
	着床後損失数 ^{d)}	0.5	0.5	0.7	0.9	
	早期吸収胚数 ^{d)}	0.4	0.4	0.7	0.6	
	後期吸収胚数 ^{d)}	0.1	0.1	0.0	0.3	
	死亡胎児数 ^{d)}	0.0	0.0	0.0	0.0	
	生存胎児数 ^{d)}	5.5	6.5	6.6	6.6	
胎児	同腹児重量 (g)	50.8	45.6	47.2	↓ 43.9	
	外表異常を有する胎児数	0	0	0	0	

太枠は検体投与による影響であることを示す。 — : 対照群

a) 検体投与による死亡。

b) 表中の数値は所見の発現回数/所見がみられた例数を示す。

c) 全胚吸収の 2 例を含む。

d) 1 腹当たりの数値

対照群との有意差の検定 (↑↓: P<0.05, ↑↓: P<0.01,)

Dunnett 検定: 体重、体重増加量、摂餌量、妊娠子宮重量、黄体数、着床数、生存胎児数

Mann-Whitney U 検定: 吸収胚数、死亡胎児数、着床後損失数

Fisher 直接確率検定: 胎児異常発現率

(13) 変異原性

1) ジベレリン原体の細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料 31)

試験機関：残留農業研究所

[GLP 非対応]

報告書作成年：1978年

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538 株) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli* WP2hcr 株) 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、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、10、50、100、500、1000 及び 5000 μ g/plate の 6 濃度で実施した。試験は 2 連制とした。

試験結果：結果を次表に示した。

検体は S9 mix の有無に関わらず、いずれの菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、S9 mix 非存在下の陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2)、 β -プロピオラクトン (β -PL)、9-アミノアクリジン (9-AA)、2-ニトロフルオレン (2-NF) では、明らかな復帰変異コロニーの増加が認められた。また、S9 mix 存在下の陽性対照である 2-アミノアントラセン (2-AA) では S9 mix 存在下においてのみ、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、ジベレリン原体は代謝活性化の有無にかかわらず本試験条件下で復帰変異誘発性を有しないと判断された。

(表中の数値は、2連の平均値*)

薬物	濃度 (μ g/plate)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/plate						
			塩基対置換型			フレームシフト型			
			WP2 _{hcr}	TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98	
対照(DMSO)	0	-	14	14	123	11	9	18	
ジベレリン 原体	10	-	15	11	139	8	15	18	
	50	-	14	14	129	6	13	18	
	100	-	13	17	114	8	16	22	
	500	-	21	17	126	7	16	19	
	1000	-	9	14	134	5	18	22	
	5000	-	10	8	128	9	15	22	
対照(DMSO)	0	+	13	10	130	5	13	21	
ジベレリン 原体	10	+	17	10	118	9	11	17	
	50	+	17	8	117	8	16	21	
	100	+	11	9	118	11	12	19	
	500	+	10	5	125	11	10	21	
	1000	+	11	7	134	9	12	17	
	5000	+	13	8	123	6	14	14	
陽性 対照	AF-2	0.05	-	/	/	709	/	/	/
		0.1	-	/	/	/	/	/	188
		0.25	-	> 2000	/	/	/	/	/
	β -PL	50	-	/	746	/	/	/	/
	9-AA	200	-	/	/	/	> 10000	/	/
	2-NF	50	-	/	/	/	/	> 3000	/
	2-AA	10	-	16	10	172	24	14	37
		10	+	66	380	> 3000	559	> 3000	> 3000

* 申請者が算出した。

陽性対照物質

- 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) -1 ジベレリン原体の *S. typhimurium* を用いた復帰突然変異試験 (TLT-0034) (資料 56)

試験機関：ICI central toxicology laboratory
[GLP 対応]
報告書作成年：1991 年

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体は DMSO に溶解し、1.6~5000 µg/プレート の範囲の 6 用量で実施した。試験は 3 連制とし、ブレインキューベーション法により 2 回行った。

用量設定根拠：

結果：結果を次表に示した。

2 回の試験 (用量設定試験、本試験) において検体は S9 mix の有無にかかわらず、5000 µg/プレート の用量まで、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を溶媒対照群の 2 倍以上かつ用量依存的に増加させることはなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジンおよび 2-アミノアントラセンではすべての試験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、ジベレリン原体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性を有しないものと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

本試験

(表中の数値は3反復の平均値±標準偏差)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 mixの 有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型		フレームシフト型			
			TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98	
対照 (DMSO)	0	-	11.6±3.4	75.8±4.3	3.6±1.1	13.2±3.7	18.2±5.3	
検体	1.6	-	11.0±0.0	76.7±9.3	2.7±1.2	13.0±4.0	14.0±1.7	
	8	-	8.7±3.2	73.7±6.5	2.3±1.5	11.7±2.3	17.0±4.6	
	40	-	8.3±4.9	71.0±9.2	4.7±1.2	12.7±4.5	13.3±0.6	
	200	-	9.0±1.0	66.7±15.6	2.0±1.7	14.5±2.1	15.7±2.3	
	1000	-	8.3±2.5	64.3±0.6	2.0±1.0	14.7±5.1	16.0±3.6	
	5000†	-	9.3±3.5	64.7±5.1	1.7±2.1	13.3±4.2	14.7±3.2	
対照 (DMSO)	0	+	9.6±5.1	93.0±7.9	3.0±0.7	11.4±2.7	18.6±4.1	
検体	1.6	+	5.7±0.6	80.7±7.8	1.7±1.2	12.0±2.8	18.5±9.2	
	8	+	10.3±3.8	87.0±6.0	2.7±1.5	9.7±1.5	15.3±4.0	
	40	+	10.3±1.5	84.3±5.1	1.7±1.2	6.0±3.0	17.7±7.2	
	200	+	8.0±3.6	85.0±13.7	2.7±1.2	10.3±2.1	18.0±3.5	
	1000	+	8.7±4.2	74.3±5.1	3.0±1.0	7.3±4.0	14.7±4.2	
	5000†	+	5.3±0.6	83.3±6.0	3.7±0.6	8.7±3.5	21.3±3.2	
陽性 対照	MNNG	1	-	18±2*	165±7**			
		2	-	632±149**	784±333**			
		5	-	4818±130**	5494±497**			
	DR	0.2	-					41±4**
		0.5	-					40±11**
		1	-					114±14**
	AM	0.5	-			112±10**		
		2	-			120±16**		
		5	-			402±46**		
	4-NPD	1	-				131±11**	
		2	-				213±10**	
		5	-				697±32**	
	2-AA	0.2	+		220±30**		113±14**	127±15**
		0.5	+	111±7**	853±78**	39±1**	296±10**	731±25**
1		+	180±4**	2617±75**	107±9**	1440±323**	2253±181**	
2		+	230±10**		236±35**			

陽性対照物質

MNNG: N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

DR: ダウノルピシン

AM: アクリジン変異原 ICR191

4-NPD: 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

†: 検体の析出が認められた。

対照群との有意差検定は、t検定を行った (*: 0.05, **: 0.01)。

1) -2 ジベレリン原体の細菌を用いる復帰突然変異試験 (TLT-0042)

(資料 57)

試験機関：ABBOTT laboratories

[GLP 対応]

報告書作成年：1987 年

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体は DMSO に溶解し、1~10000 μg /プレートの範囲の 6 用量で実施した。試験は 3 連制とし、ブレインキューベーション法により 2 回行った。

用量設定根拠：

結果：結果を次表に示した。

検体は S9 mix の有無にかかわらず、10000 μg /プレートの用量まで、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を溶媒対照群の 2 倍以上にかつ用量依存的に増加させることはなかった。一方、陽性対照として用いた N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、9-アミノアクリジンおよび 2-ニトロフルオレンではすべての試験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、ジベレリン原体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性を有しないものと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

本試験

(表中の数値は3反復の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 mixの 有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型		フレームシフト型			
			TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98	
対照 (DMSO)	0	-	12	72	6	8	15	
検体	1	-			3			
	5	-			5			
	10	-			3			
	50	-			3			
	100	-			3			
	500	-			6			
	1000	-			3			
	2000	-	14	74	5	10	12	
	5000	-	14	73	5	7	15	
10000	-	12	73	4	9	15		
対照 (DMSO)	0	+	5	74	4	8	29	
検体	1	+			5			
	5	+			3			
	10	+			4			
	50	+			4			
	100	+			2			
	500	+			4			
	1000	+			5			
	2000	+	7	61	3	8	27	
	5000	+	12	82	2	9	26	
10000	+	11	71	4	7	29		
陽性 対照	MNNG	10	-	5426	5278			
		10	+	144	971			
	9-A	50	-			28		
		50	+			5		
	2-NF	10	-				1107	1312
		10	+				94	380

陽性対照物質

MNNG : N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

9-A : 9-アミノアクリジン

2-NF : 2-ニトロフルオレン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

2) ジベレリン原体のチャイニーズハムスターの肺由来培養細胞 (CHL) を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (資料 32)

試験機関：(財) 化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1989 年

検体純度：

試験方法：チャイニーズハムスターの肺由来の培養細胞(CHL)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染色体異常誘発性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、S9 mix 存在下では 6 時間、非存在下では 24 及び 48 時間細胞を処理した。また、S9 mix の効果を明らかにするため、S9 mix を含まず、検体濃度及び処理時間を S9 mix 存在下と同一にした対照群を設けた。観察は 1 濃度あたり 200 個の分裂中期像について行った。

用量設定根拠：

結果：結果を次表に示した。

いずれの処理群においても、S9 mix の有無にかかわらず、染色体異常を有する細胞の出現頻度に増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いたマイトマイシン C 及びシクロホスファミドでは染色体異常を有する細胞の出現頻度の明らかな増加が認められた。

以上の結果より、ジベレリン原体は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下でチャイニーズハムスター肺由来の培養細胞(CHL)に対して染色体異常誘発性を有しないと判断された。

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処理時間 (h)	標本作製時間 (h)	観察細胞数	S9 mix の有無	構造異常							数的異常 ^{b)}			
						異常数				異常細胞			判定 ^{a)}	判定 ^{a)}		
						ギャップ	染色分体型 切断	染色体型 交換	染色体型 切断	その他	+G (%)	-G (%)			(%)	(%)
無処理 対照	0	24	24	200	-	0	1	1	0	0	0	1.0	1.0	-	0.0	-
溶媒対照 (DMSO)	0			200		0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	0.0	-
検体	437.5			200		3	3	0	1	1	0	3.5	2.5	-	0.5	-
	875			200		1	2	2	0	0	0	2.5	2.0	-	1.0	-
1750	200			2		1	2	0	1	0	3.0	2.0	-	0.5	-	
陽性対照 (MMC)	0.05	200	9	22	46	0	1	0	33.0	31.0	++	0.0	-			
無処理 対照	0	48	48	200	-	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	0.0	-
溶媒対照 (DMSO)	0			200		1	0	0	1	0	0	1.0	0.5	-	0.5	-
検体	218.8			200		0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	-	0.0	-
	437.5			200		1	1	0	0	0	0	1.0	0.5	-	0.0	-
875	200			0		0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	1.0	-	
陽性対照 (MMC)	0.05	200	2	27	55	0	0	0	35.0	34.0	++	0.0	-			
無処理 対照	0	6	24	200	-	0	1	1	0	0	0	1.0	1.0	-	0.0	-
溶媒対照 (DMSO)	0			200		1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	-	0.0	-
検体	437.5			200		1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	-	1.0	-
	875			200		0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	-	0.0	-
1750	200			0		0	0	0	1	0	0.5	0.5	-	0.0	-	
陽性対照 (CP)	10	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	-	0.0	-			
無処理 対照	0	6	24	200	+	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	-	1.0	-
溶媒対照 (DMSO)	0			200		0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	0.5	-
検体	437.5			200		0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	1.0	-
	875			200		0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	0.0	-
1750	200			0		0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	0.0	-	
陽性対照 (CP)	10	200	1	53	77	0	2	0	55.0	54.5	+++	0.0	-			

MMC: マイトマイシン、CP: シクロホスファミド

+G: ギャップを含む異常、-G: ギャップを除く異常

a) ギャップを含む異常を有する細胞の出現率

-; 5%未満、++; 20%以上~50%未満、+++; 50%以上

b) 200細胞中の倍数体細胞及び核内倍加細胞の割合

2) -1 ジベレリン原体のチャイニーズハムスター卵巣由来の培養細胞 (CHO-WBL) を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (TLT-0038)

(資料 58)

試験機関: Hazleton Biotechnologies

[GLP 対応]

報告書作成年: 1986 年

検体純度:

試験方法: チャイニーズハムスターの卵巣由来培養細胞 (CHO-WBL) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で検体の染色体異常誘発性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、S9 mix 存在下では 2 時間、非存在下では 2.5 時間細胞を処理した。染色体異常の観察は 1 濃度あたり 50 個について行った。

用量設定根拠:

試験結果: 結果を次頁の表に示した。

S9 mix 非存在下、存在下の、いずれの濃度区においても姉妹染色分体交換数に有意な増加は認められなかった。なお、陽性対照として用いたマイトマイシン C およびシクロホスファミドは構造異常を有する細胞の出現頻度を明らかに増加させた。

以上の結果より、ジベレリン原体は代謝活性化存在下および非存在下のチャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO-WBL) に対して染色体異常誘発性を有さないと判断した。

	細胞数	処理濃度 (µg/ml)	S9mix	染色体数	SCE 数	SCE/染色体	SCE/細胞数 (平均±SD)
無処理対照	50	—	-	1047	460	0.44	9.20±0.41
溶媒対照 (DMSO)	50	—	-	1034	527	0.51	10.54±0.53
ジベレリン原体	50	90	-	1044	472	0.45	9.44±0.41
	50	270	-	1043	470	0.45	9.40±0.45
	50	900	-	1040	509	0.49	10.18±0.45
	50	2700	-	1044	485	0.46	9.70±0.46
MMC	20	0.005	-	415	415	1.17	24.25±1.17

	細胞数	処理濃度 (µg/ml)	S9mix	染色体数	SCE 数	SCE/染色体	SCE/細胞数 (平均±SD)
無処理対照	50	—	+	1049	497	0.47	9.94±0.43
溶媒対照 (DMSO)	50	—	+	1053	468	0.44	9.36±0.41
ジベレリン原体	50	90	+	1049	499	0.48	9.98±0.46
	50	270	+	1047	497	0.47	9.94±0.45
	50	900	+	1045	486	0.47	9.72±0.45
	50	2700	+	1046	503	0.48	10.06±0.51
CP	20	1.5	+	418	418	1.49	31.15±0.98

SCE：姉妹染色分体交換
 MMC：マイトマイシンC
 CP：シクロホスファミド

3) ジベレリン原体の細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 33)

試験機関：残留農薬研究所

[GLP 非対応]

報告書作成年：1978 年

検体純度：

試験方法：枯草菌(*Bacillus subtilis*)の組換え修復機構野生株(H17)と欠損株(M45)を用い、薬物代謝酵素系(S9 mix)の非存在下で、賀田らの Rec-assay 法を用いて DNA 損傷誘発性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、20、100、200、500、1000、及び 2000 $\mu\text{g/disk}$ の 6 濃度で 1 回試験した。なお、溶媒対照群には DMSO のみ、陰性対照群としてカナマイシン(10 $\mu\text{g/disk}$)、陽性対照群としてマイトマイシン C(0.1 $\mu\text{g/disk}$)を用いた。

試験結果：結果を次表に示した。

検体はいずれの濃度においても、M45、H17 両株に対して全く生育阻止帯を示さなかった。一方、陽性対照として用いたマイトマイシン C では、両株の間に著明な生育阻止帯の差を生じ、陰性対照として用いたカナマイシンでは、両株に同程度の生育阻止帯を認めた。

薬物	濃度 ($\mu\text{g/disk}$)	S9 mix の有無	阻止帯 (mm)		差 (mm)
			M45	H17	
溶媒対照 (DMSO)	0	—	0	0	0
ジベレリン原体	20	—	0	0	0
	100	—	0	0	0
	200	—	0	0	0
	500	—	0	0	0
	1000	—	0	0	0
	2000	—	0	0	0
陰性対照 (カナマイシン)	10	—	5.5	4	1.5
陽性対照 (マイトマイシン C)	0.1	—	7	0.5	6.5

以上の結果より、ジベレリン原体は本試験条件下で DNA 損傷誘発性を有しないと判断された。

4) ジベレリン原体のマウスを用いた小核試験

(資料 42)

試験機関：(財) 残留農業研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：2004 年

検体純度：

供試動物：ICR 系雄マウス、7 週齢、体重 28.7~39.0 g、1 群 5 匹

試験方法：検体を 0.5%メチルセルロース(MC)水溶液に懸濁し、500、1000 及び 2000 mg/kg の投与量で、単回強制経口投与した。投与液量は 10 mL/kg とした。なお、溶媒対照群には 0.5 %MC 水溶液を、陽性対照群にはマイトマイシン C (10 mg/kg) を同様に投与した。

投与 24 時間後 (500、1000 及び 2000 mg/kg) 及び 48 時間後 (2000 mg/kg) に各動物から大腸骨の骨髓を採取して、スライドガラス上にメタノールで固定後、3 %ギムザ溶液で染色し骨髓標本を作製した。

各個体あたり 2000 個の多染性赤血球を観察し、小核を有する細胞の出現頻度を調べた。また、骨髓細胞に対する毒性を調べるため、各個体あたり 1000 個の赤血球 (多染性赤血球及び正常性赤血球) を観察し、全赤血球に対する多染性赤血球の割合を算出した。

投与量設定根拠：

結果：骨髓標本の観察結果を次表に示した。

観察結果

採取時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg)	観察動物数	MNPCE ^{a)} % (平均値±SD)	PCE/ (PCE+NCE) ^{b)} % (平均値±SD)
24	溶媒対照(0.5% MC)	10 mL/kg	5	0.19±0.08	58.3±4.7
	検体	500	5	0.24±0.13	62.8±2.4
		1000	5	0.18±0.10	60.9±4.9
		2000	5	0.17±0.13	61.3±8.4
	陽性対照 (MMC)	10	5	♁4.05±1.83	↑ 50.5±1.9
48	溶媒対照 (0.5% MC)	10 mL/kg	5	0.14±0.05	56.1±2.8
	検体	2000	5	0.18±0.07	56.2±6.1

小核を有する多染性赤血球の出現頻度については Kastenbaum-Bowman の方法 (検体投与群) 及び χ^2 二乗検定 (陽性対照群) を行い、全赤血球に対する多染性赤血球の割合については Wilcoxon の順位和検定を行った (↓↑: P<0.05、♁♂: P<0.01、♁♁: P<0.001)。

PCE：多染性赤血球

NCE：正常性赤血球

MNPCE：小核を有する多染性赤血球

MC：メチルセルロース MMC：マイトマイシン C

a) 1 個体につき 2000 個の多染性赤血球を観察した。

b) 1 個体につき 1000 個の赤血球を観察した。

試験期間中、いずれの検体投与群においても死亡は認められなかった。毒性症状として 2000 mg/kg 群の 5 例に軟便が認められた。溶媒対照群と比較して、いずれの投与量、標本採取時間においても小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、統計学的に有意な増加は認められなかった。また、全赤血球中の多染性赤血球の割合にも有意な変化は認められず、検体は骨髓細胞に

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

毒性を示さないと考えられた。

一方、陽性対照であるマイトマイシンCでは、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、顕著な増加が認められた。

以上の結果から、ジベレリン原体は本試験条件下において、マウス骨髄細胞に対して小核を誘発しないと判断された。

4) -1 ジベレリン原体のマウスを用いた小核試験 (TLT-0032)

(資料 59)

試験機関：ICI Central Toxicology Laboratory
[GLP 対応]

報告書作成年：1991 年

検体純度：

供試動物：C57BL/6JfBL10/Alpk 系雌雄マウス (6~11 週齢、体重 17.2~29.4 g)、1 群雄 5 匹

試験方法：検体を 0.5% ヒドロキシプロピルメチルセルロース水溶液 (HPMC) に懸濁し、3130、5000 mg/kg の用量で強制的に単回経口投与した。なお、対照群に 0.5% HPMC を同様に投与した。投与 24、48 および 72 時間後に動物を安楽死させ、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メタノールで固定後、ポリクロームメチレンブルーおよびエオジンで染色し骨髄標本を作製した。陽性対照群にはシクロホスファミド (CP) 65mg/kg を単回経口投与して 24 時間後に標本を作製した。各個体あたり 2000 個の多染性赤血球を観察して小核を有する多染性赤血球の出現頻度を求めた。また、骨髄細胞に対する毒性を調べるため、各個体あたり 1000 個の赤血球を観察して赤血球 (多染性赤血球および正染性赤血球) 中の多染性赤血球の割合を調べた。

用量設定根拠：

試験結果：投与 24、48 および 72 時間後の骨髄標本の観察結果を表に示した。

5000mg/kg 群の雄において、尿失禁および円背位が認められた。投与 24 時間後の 5000mg/kg 群の雌に小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。また、全赤血球中の多染性赤血球の割合について投与 72 時間後の 3130mg/kg 群、投与 24 および 72 時間後の 5000mg/kg の雄に有意な減少が見られたことから、検体は骨髄細胞に毒性を示すものと考えられた。陽性対照であるシクロホスファミド投与群では、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な小核の増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において、検体はマウス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。

結果

被験物質	投与量 (mg/kg)	性	MNPCE% (平均±SD)		
			24 時間	48 時間	72 時間
溶媒対照 (HPMC)	—	雄	1.8±1.6	2.8±1.6	1.8±2.2
		雌	0.8±0.8	1.6±1.1	0.8±0.8
ジベレリン原体	3130	雄	3.0±4.6	3.8±2.2	3.4±3.2
		雌	1.4±2.1	1.8±2.5	1.0±0.7
	5000	雄	1.6±1.3	1.6±1.1	2.8±1.9
		雌	3.2±0.8**	0.8±0.8	1.0±1.0
陽性対照 (CP)	65	雄	23.6±7.4**		
		雌	16.0±2.8**		
			PCE/(PCE+NCE)% (平均±SD)		
溶媒対照 (HPMC)	—	雄	46.9±6.3	40.2±7.4	45.8±12.5
		雌	45.4±9.8	42.5±3.9	40.8±3.7
ジベレリン原体	3130	雄	40.7±6.5	37.2±3.8	37.9±5.6
		雌	44.7±2.3	39.7±4.7	39.4±5.7
	5000	雄	38.3±5.7*	42.6±3.8	29.7±8.1**
		雌	43.0±4.7	43.5±5.5	38.7±3.5
陽性対照 (CP)	65	雄	37.2±8.4**		
		雌	42.8±4.6		

統計学的解析:小核を有する多染性赤血球の出現頻度および多染性赤血球の割合については Student's t 検定を行った。*: p < 0.05、 **: p < 0.01

MNPCE: 多染性赤血球 1000 個のうち、小核を有する多染性赤血球

PCE: 多染性赤血球 NCE: 正染性赤血球

HPMC: 0.5% ヒドロキシプロピルメチルセルロース水溶液

CP: シクロホスファミド

5) ジベレリン原体の哺乳類培養細胞を用いる突然変異試験(マウスリンホーマ TK 試験)(TLT-0033)
(資料 60)

試験機関：ICI Central Toxicology Laboratory
[GLP 対応]

報告書作成年：1991 年

検体純度：

試験方法：マウスリンホーマ L5178Y TK⁺ (-3.7.2C 株) 細胞を用い、チミジンキナーゼ遺伝子座における検体の突然変異誘発性を評価した。試験はマイクロウェル法により、トリフルオロチミジン (TFT) の存在下で、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下、2 反復で 3 回実施した。

溶媒対照はジメチルスルホキシド (DMSO) および陽性対照は S9 mix 非存在下ではメタン
スルホン酸メチル (EMS) 、存在下では N-ニトロソジメチルアミン (NDMA) を用
いた。

用量設定根拠：

試験結果：結果を表 1~3 に示す。

試験 1 および試験 2 のいずれの用量でも 95~121% の生存率であった。試験 3 の S9mix 存在下
における 2500µg/mL の用量では、生存率が 58% であった。

突然変異頻度には全試験濃度で有意な増加は認められなかった。

陽性対照物質 (EMS および NDMA) では、いずれの試験においても突然変異頻度に有
意な増加が誘発された。

以上の結果から、本剤は代謝活性化系の有無に関わらず本試験条件下で、突然変異原性を有しないと判
断される。

表 1. 本試験-試験 1

薬物		濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix の有無	生存率	突然変異 頻度
溶媒対照(DMSO)		0	-	100	0.00083
検体		313	-	99	0.00097
		625	-	102	0.00092
		1250	-	101	0.00096
		2500	-	106	0.00131
溶媒対照(DMSO)		0	+	100	0.00074
検体		313	+	95	0.00086
		625	+	112	0.00048
		1250	+	111	0.00048
		2500	+	102	0.00046
陽性 対照	EMS	750	-	49	0.00530
	NDMA	600	+	58	0.00246

DMSO : ジメチルスルホキシド
 EMS : メタンスルホン酸エチル
 NDMA : N-ニトロソジメチルアミン

表 2. 本試験-試験 2

薬物		濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix の有無	生存率	突然変異 頻度
溶媒対照(DMSO)		0	-	100	0.00050
検体		313	-	95	0.00039
		625	-	116	0.00050
		1250	-	109	0.00051
		2500	-	121	0.00039
溶媒対照(DMSO)		0	+	100	0.00056
検体		313	+	113	0.00051
		625	+	112	0.00050
		1250	+	97	0.00042
		2500	+	112	0.00047
陽性 対照	EMS	750	-	25	0.00281
	NDMA	600	+	46	0.00338

DMSO : ジメチルスルホキシド
 EMS : メタンスルホン酸エチル
 NDMA : N-ニトロソジメチルアミン

表 3. 本試験—試験 3

薬物		濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix の有無	生存率	突然変異 頻度
溶媒対照(DMSO)		0	-	100	0.00016
検体		313	-	104	0.00017
		625	-	114	0.00024
		1250	-	125	0.00043
		2500	-	101	0.00020
溶媒対照(DMSO)		0	+	100	0.00017
検体		313	+	80	0.00017
		625	+	71	0.00014
		1250	+	67	0.00022
		2500	+	58	0.00016
陽性 対照	EMS	750	-	28	0.00140
	NDMA	600	+	57	0.00107

DMSO : ジメチルスルホキシド

EMS : メタンスルホン酸エチル

NDMA : N-ニトロソジメチルアミン

5) -1 ジベレリン原体のヒト末梢リンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (TLT-0039)

(資料 61)

試験機関：ICI Central Toxicology Laboratory

[GLP 対応]

報告書作成年：1991 年

検体純度：

試験方法：ヒト末梢リンパ球細胞を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下において染色体異常誘発性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して用いた。観察は 1 濃度あたり 200 個 (2 反復) の分裂中期像について行い、試験は 2 回行った。

用量設定根拠：

試験結果：結果を表 1、2 および 3 に示した。

いずれの処理群においても S9mix の有無に関わらず異常細胞の割合、ギャップを除く細胞あたりの異常数および平均分裂指数で統計学的有意差は認められなかった。

一方、陽性対照は両試験とも、ギャップを除く異常細胞の割合が有意に増加した。

以上の結果から、ジベレリン原体は S9 mix の有無に関わらず 2500 μ g/mL の濃度で染色体異常誘発性を示さなかった。

表 1. 異常細胞の割合、キ'ャップ'を除く細胞あたりの異常数および平均分裂指数

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9mix の 有無	キ'ャップ'を除く 異常細胞の 割合 (%)	異常数/キ'ャップ'を 除く細胞	平均分裂指数 (%)
溶媒対照 (DMSO)	-	-	0.50	0.010	8.1
			0.50	0.005	8.8
ジベレリン原体	250	-	1.00	0.010	9.2
			0.00	0.000	11.0
	1250	-	0.00	0.000	9.0
			2.00	0.025	9.5
	2500	-	1.50	0.015	8.1
			3.00	0.030	8.8
陽性対照 MMC	1.0	-	61.00**	1.260	3.2
			67.00**	1.410	3.3
溶媒対照 (DMSO)	-	+	1.00	0.010	6.4
			1.00	0.010	6.8
ジベレリン原体	250	+	0.50	0.005	5.8
			1.00	0.010	6.7
	1250	+	1.00	0.010	6.0
			0.50	0.005	8.5
	2500	+	1.00	0.010	7.6
			1.00	0.010	9.7
陽性対照 CP	50	+	29.00**	0.390	2.7
			33.00**	0.700	2.0

表中数値は2反復の平均値

Fisher の直接確率計算法 ** : $p < 0.01$

1培養あたり1000個の分裂中期像を観察

DMSO : ジメチルスルホキシド

MMC : マイトマイシンC

CP : シクロホスファミド

表 2. 1回目試験の結果—分裂中期像解析データ

被験物質	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	観察 細胞数	S9mix の 有無	染色体異常を有する細胞数				
				ギャップ	切断	微小断片	交換	その他
溶媒対照 (DMSO)		100	-	1		1		
		100	-	1				
ジベリノ原体	250	100	-			1		
		100	-			1		
	1250	100	-	1				
		100	-	1				
	2500	100	-	2	2			
		100	-	1		1		
陽性対照 (MMC)	1	100	-	3	25	40	2	19
溶媒対照 (DMSO)		100	+					
		100	+	3	2			
ジベリノ原体	250	100	+			1		
		100	+					
	1250	100	+			2		
		100	+	2				
	2500	100	+	1		3		
		100	+	2	2	1		
陽性対照 (CP)	1	100	+	4	9	24		2

DMSO : ジメチルスルホキシド

MMC : マイトマイシン C

CP : シクロホスファミド

表 3. 2回目試験の結果—分裂中期像解析データ

被験物質	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	観察 細胞数	S9mix の 有無	染色体異常を有する細胞数				
				ギャップ	切断	微小断片	交換	その他
溶媒対照 (DMSO)		100	-			1		
		100	-	1				
ジベリノ原体	250	100	-					
		100	-	1				
	1250	100	-	1	1	2		
		100	-		1			
	2500	100	-	1		3		
		100	-	2	2	1		
陽性対照 (MMC)	1	100	-	8	36	42		15
溶媒対照 (DMSO)		100	+	2				
		100	+			2		
ジベリノ原体	250	100	+	2	1	1		
		100	+	1				
	1250	100	+	2	1			
		100	+	1				
	2500	100	+		1			
		100	+	2		1		
陽性対照 (CP)	1	100	+	2	11	25		7

Fisher の直接確率計算法 ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$

DMSO: ジメチルスルホキシド

MMC: マイトマイシン C

CP: シクロホスファミド

5) -2 ジベレリン原体のラット肝細胞を用いた *in vivo/in vitro* 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験
(TLT-0027)
(資料 62)

試験機関：ICI central toxicology laboratory
[GLP 対応]
報告書作成年：1991 年

検体純度：

試験方法：検体を単回経口投与した6～8週齢のAlpk：ApfSD系雄ラット（5匹/群、体重；206～254g）の肝細胞を用いてUDS誘発を調べることによりDNA損傷性を検定した。検体はHPMCに懸濁して用いた。

用量設定根拠：

肝細胞の調製：検体を投与したラットの肝臓をコラゲナーゼ溶液で灌流した後摘出した。肝細胞を分離し、ウイリアムスE培地（WME、10%牛胎児血清を含む）中に懸濁した。

肝細胞生存率測定および培養：肝細胞浮遊液の一部を同容量の0.4%トリパン青と混合し、血球計算板を用いて顕微鏡下で生細胞数を計数した。細胞濃度を 1.5×10^5 細胞/mLに調製した後、カバーガラスを1枚ずつ含む6穴培養プレートの各穴に細胞浮遊液を3mLずつ播種し、細胞をカバーガラス上に付着させた。

UDS試験：1.5～2時間培養した肝細胞をWMEで洗浄した後、 ^3H -チミジン 37MBq/mL の濃度で含むWME中で4時間培養した。 ^3H -チミジン処理後、細胞を非標識チミジンを 0.25mM 含むWMEで3回洗浄し、さらにこの培地中少なくとも12時間培養した。培養後、細胞はWMEまたは生理食塩水で洗浄し、固定液（エタノール：酢酸=3：1）で固定した。写真用乳剤に浸して乳剤被膜を形成させ、暗箱中で14日間露出（4℃）した後、現像した。 ^3H -チミジンを取り込み部位を検出し、さらに細胞核をヘマトキシリンで染色し、UDSの測定を行った。

UDSの測定は標本当り細胞を100個ずつ計測した。観察は顕微鏡下で行い、銀粒子の測定には自動イメージ分析装置を用いた。核内銀粒子数（NG）は核銀粒子数から細胞質銀粒子数を引いて求め、NGが5以上の細胞はUDS陽性細胞とみなし、修復細胞数として細胞数を計数した。

試験結果：試験結果を次表にまとめた。

経過時間（4時間後および12時間後）および用量反応性において有意な増加は認められなかった。

一方、陽性対照の6-BTおよびNDMAはNG値およびUDS陽性細胞数の両方を顕著に増加させた。

以上の結果から、ジベレリン原体は本試験条件下においてラット肝細胞に対して不定期DNA合成を誘発せず、DNA損傷性を示さないと結論した。

化合物	投与量 (mg/kg)	処理時間	動物数	核内銀粒子数	UDS陽性細胞数 ^{a)}
溶媒対照 (HPMC)	-	12時間	2	-3.6±0.9	1/100
		4時間	2	-2.3±0.4	4/100
ジベレリン原体	1250	12時間	5	-3.9±1.0	0/100
		4時間	5	-2.8±0.8	2/100
	2000	12時間	5	-3.6±0.8	1/100
		4時間	5	-3.0±0.7	1/100
6BT	40	12時間	2	+19.0±3.5	93/100
		4時間	1	+17.1	95/100
NDMA	10	4時間	1	+25.1	97/100

a) 核内銀粒子数を5個以上もつ細胞数/観察した細胞数。

HPMC：ヒドロキシプロピルメチルセルロース

6BT：6-ジメチルアミノフェニルアゾベンズチアゾール

NDMA：N-ニトロソジメチルアミン

5) -3 ジベレリン原体のラット肝細胞を用いた *in vitro* 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験 (TLT-0036)
(資料 63)

試験機関: Hazleton Biotechnologies

[GLP 対応]

報告書作成年: 1986 年

検体純度:

供試動物: Fischer 344 系雄ラット、成体、150~300g

試験方法: ラットの初代培養肝細胞を用いて、肝細胞 DNA 中への ³H-チミジンの取り込みをオートラジオグラフィ法で銀粒子として検出することによって不定期 DNA 合成 (UDS) の誘発を検出し、DNA 損傷性を検定した。

ラットから *in situ* コラゲナーゼ灌流法により肝細胞を分離し、5%牛胎児血清を含むウィリアムス E 培地 (WME) を用いて 0.5×10^6 個/3mL の細胞浮遊液を調製した。

細胞浮遊液を 5%CO₂ 存在下 37°C で 1.5~2 時間培養後、³H-チミジン (1μCi/mL) を含む WME 培地中で、検体で 18~19 時間処理した。検体はエタノールに溶解し、処理濃度は 50、100、250、500、602、1000 および 1260 μg/mL の 7 濃度とした。検体処理した肝細胞の生存率はトリパンブルー色素排除法により調べた。

検体処理後、細胞を低張処理 (1%クエン酸ナトリウム溶液 8~10 分間) し、固定液 (酢酸: エタノール=1:3) で固定して、少なくとも 24 時間乾燥した。細胞標本を暗箱中で 7~10 日間露出 (4°C) した後現像し、ヘマトキシリンおよびエオジンで染色した。

各標本について核粒子面積と細胞質粒子面積 (核に隣接した核と同じ面積の細胞質) を測定し、粒子面積と粒子数との相関式から核内総粒子数と細胞質粒子数を求め、正味の核内粒子数 (NG) を算出した。また、NG が 5 以上の細胞を DNA 修復が起こっている細胞 (修復細胞) とし、その数を評価した。

各処理につき 3 枚の標本を使用し、観察は各標本 50 個の細胞について行い、試験は 3 回行った。

試験結果: 結果を次表に示した。

検体処理群と溶媒対照群の間において、正味の核内粒子数および修復細胞の出現頻度に差は認められなかった。

一方、陽性対照の 2-アセチルアミノフルオレンは、正味の核内粒子数および修復細胞の出現頻度をいずれも著明に増加させた。

以上の結果から、ジベレリン原体は本試験条件下でラット初代培養肝細胞に不定期 DNA 合成を誘発せず、DNA 損傷性を有しないと判断された。

観察結果

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	細胞 生存率 ^{a)} (%)	正味の核内 粒子数 ^{b)} (平均値)	正味の核内粒子 数 6 個以上の核 の割合 (%) ^{b)} (平均値)	正味の核内粒子 数 20 個以上の核 の割合 (%) ^{b)} (平均値)
溶媒対照 (エタノール)	1%	100.0	0.39	0.0	0.0
ジペリン原体	50	ND	0.33	0.0	0.0
	100	ND	0.36	0.0	0.0
	250	95.2	0.39	0.0	0.0
	500	91.0	0.35	0.0	0.0
	602	86.0	0.29	0.0	0.0
	1000	84.7	0.44	0.0	0.0
	1260	85.2	0.69	0.0	0.0
陽性対照 (2-AAF)	0.1	84.4	9.82	72.7	8.7

2-AAF : 2-アセチルアミノフルオレン

a) : 処理開始 21 時間後の溶媒対照群に対する相対細胞生存率

b) : 3 標本 (正味の核内粒子数については合計 150 個の細胞) の平均値

ND : 確定しなかった。