

1 1. 1年間反復経口投与毒性および発がん性

(1) イヌを用いた1年間反復経口投与毒性試験

(資料 No. 毒性-16)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2009年

検体純度： %

供試動物：ビーグル犬 1群雌雄各4匹

投与開始時 約8ヶ月齢、体重；雄6.3~8.6kg、雌4.7~7.3kg

投与期間：1年間（2007年10月16日~2008年10月16日）

投与方法：検体を0（対照群）、200、1000および10000ppmの濃度で飼料に混入し、1年間にわたって摂食させた。飼料は約6週毎に調製した。

用量設定根拠；用量は、雌雄のイヌに検体を180、1800および18000ppm

観察・検査項目および結果：

一般状態および死亡率；全動物について毎日一般状態を観察した。行動の変化、健康障害、瀕死状態および死亡の兆候は1日2回（週末および祝日は1日1回）検査した。また、毎週1回、行動および外観、皮膚および被毛、歯および歯肉、眼、耳、粘膜、歩行、姿勢、ハンドリングに対する反応など、詳細に観察した。月に1回は詳細な身体検査も実施した。

雌雄いずれにも投与に関連した一般状態の変化や身体検査での変化は認めなかった。また、試験中に死亡例は認めなかった。

体重；馴化期間および投与期間中の給餌前、週に1回測定した。また、最終剖検の前にも測定した。

10000 ppmの雌では、1日あたりの平均体重増加量および平均体重が対照群をわずかに下回った。この結果、雌の総平均体重増加量は、対照群に比して低かった（-54%、有意差なし）。また、試験364日目の平均体重は対照群の8.4 kgに対して6.9 kgであった（-18%、有意差なし）。10000ppm雄および雌雄の200および1000ppm群では影響は認めなかつ

た。

体重変化 (図) と平均体重および平均体重増加量 (表) を以下に示す。

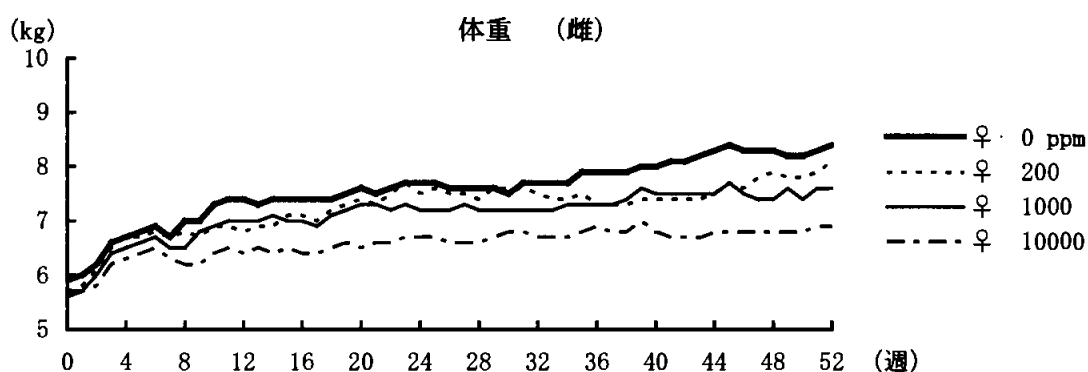
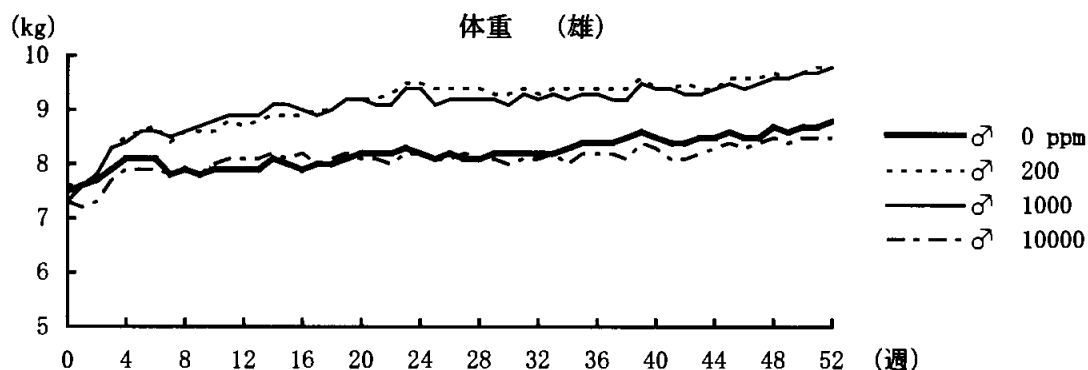


表. 平均体重および平均体重増加量 (kg)

性		雄				雌			
		0	200	1000	10000	0	200	1000	10000
体重	開始時(1日目)	7.5	7.6 (101)	7.3 (97)	7.3 (97)	5.9	5.7 (97)	5.6 (95)	5.7 (97)
	終了時(364日目)	8.8	9.8 (111)	9.8 (111)	8.5 (97)	8.4	8.1 (96)	7.6 (90)	6.9 (82)
体重増加量	1週目 [1~8日目]	0.1	0.1	0.3	-0.1	0.1	0.1	0.1	-0.1
	1~13週 [1~92日目]	0.4	1.3	1.7	0.8	1.5	1.2	1.4	0.7
	13~26週 [92~183日目]	0.3	0.5	0.3	0.0	0.3	0.7	0.2	0.2
	26~52週 [183~364日目]	0.6	0.5	0.6	0.4	0.9	0.5	0.4	0.3
	1~52週 [1~364日目]	1.3	2.3 (177)	2.5 (192)	1.2 (92)	2.6	2.4 (92)	2.0 (77)	1.2 (46)

() 内の数値は対照群に対する割合(%)

(Bartlett+ ANOVA または Kruskal-Wallis および Dunnett または Dunn 検定)

摂餌量；投与期間中は、各動物に与えた飼料の重量と食べ残した飼料の重量を毎日記録した。また、投与開始直前にも連続する少なくとも5日間をわたって摂餌量を測定した。

10000 ppm では、投与開始後1週目の平均摂餌量が、対照群と比して雄で有意に低く (-33% $p \leq 0.05$)、雌においても低かった (-21% 有意差なし)。この投与初期における摂餌量低下は、検体を処理した飼料に順応できなかったためと考えられた。その後の平均摂餌量は雌雄共に対照群と同等であった。

表. 平均摂餌量 (g/日)

性	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	200	1000	10000	0	200	1000
1週 [1~8日目]	695	570 (82)	664 (96)	↓465 (67)	594	589 (99)	588 (99)	467 (79)
1~52週 [1~364日目]	769	749 (97)	702 (91)	704 (92)	666	671 (101)	649 (97)	677 (102)

() 内の数値は対照群に対する割合 (%)

↓: $p \leq 0.05$ (Bartlett+ANOVA および Dunnett 検定)

検体摂取量：各群の試験期間を通じた平均検体摂取量は以下の通りであった。

投与量 (ppm)		200	1000	10000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	6.8	32.0	357
	雌	7.7	37.9	425

眼科学的検査；順化期間中および投与終了時に全生存動物について眼科学的検査を実施した。

雌雄いずれにおいても変化は認められなかった。

血液学的検査；投与前、投与4ヶ月 (98~99日目)、7ヶ月 (189~190日目) および12ヶ月 (357~358日目) に全生存動物の頸静脈より採血し、EDTA またはクエン酸ナトリウム処理して以下の項目について検査した。

赤血球数 (RBC)、血色素量 (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、網状赤血球 (数および%)、白血球総数 (WBC)、白血球百分率 (Differential.C)、血小板数 (PLT)、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)

投与に関連のある変化は認められなかった。

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清および血漿（リチウムヘパリン処理）を用い、以下の項目について検査した。

外観、総ビリルビン(TBIL)、グルコース(GLUC)、尿素(UREA)、クレアチニン(CREA)、総コレステロール(CHOL)、トリグリセリド(TRIG)、塩素(CL)、ナトリウム(NA)、カリウム(K)、カルシウム(CA)、無機リン(PHOS)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALAT)、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)、アルカリホスファターゼ(ALP)、総蛋白(TPRO)、アルブミン(ALB)。なお、グロブリン(GLOB)、アルブミン/グロブリン比(A/G)を計算により求めた。

10000ppm では、雌雄ともに試験期間を通じて ALP が対照群に比して有意（雄 7 および 12 ヶ月を除く）に高かった。一方、雌雄ともに試験期間を通じて ALB 濃度の有意（雄 7 ヶ月を除く）な低値がみられ、CA 濃度もわずかに低下（雄 4 ヶ月、雌 12 ヶ月では有意）した。また、A/G 比の低下傾向（雌でのみ有意）も観察された。さらに、12 ヶ月の測定でのみ、雄において PHOS 濃度が有意に低かった。

1000ppm では、有意差は認めなかったが、試験期間を通じて雄 1 匹で ALP 活性がわずかに高かった。しかし、変化の程度は小さく、単独で認められたものなので有害影響ではないと考えられた

その他の変化は変動の程度が小さく、対照群での変動を考慮すると、偶発的で検体の投与とは関連しないものと考えられた。

200ppm では、投与に関連した有害な影響^{注)}は認めなかった。

注) 申請者注：

雌 200ppm の A/G 比に統計学的有意差が認められているが、総蛋白およびアルブミン濃度に顕著な変動が無く、投与前と比して大きな変動がないことから報告にあるように毒性的に意義のあるものではないと考えられた。

以下に統計学的に有意差を認めた項目を示した。

表. 生化学的検査結果

性	雄								
用量 (ppm)	200			1000			10000		
検査時期 (月)	4	7	12	4	7	12	4	7	12
ALP							↑258		
ALB							↓88		↓85
CA							↓94		
PHOS									↓71
GLUC					↑115				

性	雌								
用量 (ppm)	200			1000			10000		
検査時期 (月)	4	7	12	4	7	12	4	7	12
ALP							▲454	↑544	▲724
ALB							▼88	▼88	▼83
CA									↓94
A/G		↓87	▼83			↓88		▼81	▼78
K					↓92				
Cl									↑103

表中の数値は対照群に対する比(%)

↑↓:p≤0.05、▲▼:p≤0.01

(Bartlett+ ANOVA または Kruskal-Wallis および Dunnett または Dunn 検定)

尿検査；投与前、95日目、185または186日目および365日目の朝に、全群の全動物から一晚、尿サンプルを採取し、以下の項目について検査した。採尿中は、水の摂取を制限しなかった。

外観、尿量、pH、比重/浸透圧/屈折率、グルコース、ビリルビン、ケトン体、潜血/赤血球、蛋白、ウロビリノーゲン、沈渣(赤血球、白血球、上皮細胞、細菌、円柱および結晶)

雌雄いずれにも投与の影響は認められなかった。

最終体重および臓器重量；投与365~368日目に、前日の給餌後絶食させた全動物をアセプロマジンの筋肉注射による沈静化後、ペントバルビタールの静注による深麻酔下で放血致死させて剖検した。以下の臓器について重

量を測定した。

肝臓、心臓、脾臓、腎臓、精巣、精巣上体、卵巣、子宮（および子宮頸部）、脳、副腎、甲状腺（および上皮小体）、胸腺、前立腺、下垂体

最終体重において 10000ppm 雌では、対照群に比して低値であった（-17%、有意差なし）。

10000ppm の雄ならびに 1000ppm および 200ppm の雌雄では投与に関連した最終体重の変化を示さなかった。

臓器重量測定において、10000ppm 雌では肝対体重比および対脳重量比が対照群に比して統計学的に有意に高かった。この変化は病理組織学的所見との間に関係が認められたため、検体投与に関連したものと考えられた。雄の肝重量でも同様な傾向が観察されたが、統計学的に有意ではなかった。

1000ppm および 200ppm では、検体投与に関連した臓器重量の変化は観察されなかった。

以下に統計学的有意差を認めた肝重量を示した。

表. 肝重量

性別	雄			雌		
	200	1000	10000	200	1000	10000
用量 (ppm)						
対体重比 (%)			(132)			▲151
対脳重量比 (%)			(133)			↑138

表中の数値は対照群に対する比 (%) () 内は参考として示した。

↑: p<0.05、▲: p<0.01

(Bartlett+ANOVA または Kruskal-Wallis および Dunnett または Dunn 検定)

肉眼的病理検査；計画屠殺したすべての動物について剖検し、外表、開口部、体腔および主要な臓器、組織について検査を行った。

10000ppm において、雄 4 例中 1 例で肝臓肥大が観察された。また、雌雄共に 4 例中 1 例、甲状腺の暗色化が観察された。これらの所見は、組織学的検査で明らかにされた肝細胞肥大ならびに甲状腺濾胞上皮細胞肥大と関係しており、検体投与に関連したものと考えられた。

その他に認められた肉眼的変化はすべて偶発的で検体投与とは関連しないものと考えられた。

1000ppm および 200ppm では、投与に関連した変化は観察されなかった。

病理組織学的検査；全ての動物について、以下の組織を採取し、10%中性緩衝ホルマリンに浸漬して固定した。眼、視神経、精巣上部および精巣はダビドソン固定液に固定した。全ての組織（喉頭／咽頭を除く）についてヘマトキシリン・エオジン（HE）染色標本を作製して病理組織学的検査を実施した。

舌、顎下（唾液）腺、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、肝臓、膵臓、胆嚢、気管、肺、咽頭、喉頭、大動脈、心臓、骨髄（胸骨）、腸間膜リンパ節、咽頭後リンパ節、脾臓、胸腺、腎臓、膀胱、精巣、精巣上部、前立腺、卵巣、子宮（子宮頸部を含む）、乳腺、膈、卵管、脳（小脳を含む）、坐骨神経、脊髄（頸部、胸部、腰部）、眼、視神経、下垂体、副腎、上皮小体、甲状腺（上皮小体と共に重量を測定）、骨（胸骨）、骨格筋、皮膚、関節面（大腿骨頭）、肉眼的病変部および腫瘍

10000ppm の雌雄において、肝臓に汎小葉性肝細胞肥大が観察され、対照群に比して、肝細胞グリコーゲン蓄積の低下が認められた。さらに肝細胞褐色色素沈着（リポフスチン¹）が観察された。これら肝の変化は、血液生化学的検査での変化と関係しており、検体投与に関連したものと考えられた。

また、雌雄の甲状腺に投与に関連すると考えられる軽微ないし軽度の濾胞上皮細胞肥大が観察された。

1000ppm の雌 1 例において、肝臓に汎小葉性肝細胞肥大が観察された。また、雄 1 例で、肝細胞褐色色素沈着（リポフスチン¹）が観察された。しかし、孤立した変化であったため、有害影響ではないと考えられた。

200ppm では、検体投与に関連した組織学的変化は観察されなかった。

主な病理組織学的変化／肝および甲状腺での発生数および程度

性別			雄				雌			
用量 (ppm)			0	200	1000	10000	0	200	1000	10000
検査動物数			4	4	4	4	4	4	4	4
肝臓	肝細胞肥大 ：汎小葉性	軽微	0	0	0	3	0	0	1	3
		軽度	0	0	0	0	0	0	0	1
		合計	0	0	0	3	0	0	1	*4

* :p<0.05 (Fisher 検定 / 申請者により実施)

<続く>

¹ リポフスチンは加齢や化学物質投与などでみられる色素として知られる細胞質のリソソーム内に蓄積される不溶性色素で長期間投与試験ではよく認められる。他に可能性の考えられる色素沈着としてヘモジデリンあるいは胆汁色素があるが、その原因となり得る溶血性貧血や肝細胞障害などの徴候は無く、組織観察の特徴などから褐色色素はリポフスチンと判断した。

<続き>

性別		雄				雌				
用量 (ppm)		0	200	1000	10000	0	200	1000	10000	
検査動物数		4	4	4	4	4	4	4	4	
肝臓	肝細胞褐色色素沈着 (リポフスチン) : 巣状	軽微	0	0	1	2	0	0	0	3
		合計	0	0	1	2	0	0	0	3
	肝細胞グリコーゲン蓄積 : びまん性	軽微	2	2	2	1	3	2	1	1
		軽度	2	2	2	0	1	2	2	0
		合計	4	4	4	1	4	4	3	1
	甲状腺	濾胞細胞肥大 : びまん性	軽微	0	0	0	1	1	0	0
軽度			0	0	0	0	0	0	0	1
合計			0	0	0	1	1	0	0	3

(Fisher 検定 / 申請者により実施)

本検体を雌雄のビーグル犬に最低 52 週間にわたって混餌投与した結果、死亡および一般状態の変化、また、身体検査、眼科学的検査、血液学的検査および尿検査で投与に関連した変化は見られなかった。

10000ppm 投与においては雌で体重増加量の低下および低体重が観察され、最終体重も対照群より低かった。雌雄でアルカリホスファターゼ活性が著しく上昇した。雌雄とも肝対体重比が増加（雌でのみ有意）した。肉眼検査では雄 1 例に肝臓肥大、雌雄各 1 例に甲状腺の暗色化が観察され、組織学的検査で肝臓および甲状腺に投与に関連した変化が認められた。

1000ppm および 200ppm では投与による有害な影響は認めなかった。

以上の結果より、無毒性量は、雌雄共に 1000 ppm（雄では 32.0 mg/kg/日、雌では 37.9 mg/kg/日）と考えられた。

(2) ラットを用いた慢性毒性/発がん性併合試験 (資料 No. 原体-17)

試験機関:

[GLP]

報告書作成年: 2009 年

検体純度: %

供試動物: Wistar Rj: WI (IOPS HAN)系ラット、1 群雌雄各 80 匹
(中間屠殺群および回復群 1 群雌雄各 10 匹、最終屠殺群 1 群雌雄各 60 匹)

投与開始時 6 週齢

投与 52 週および 65 週 (3 ヶ月回復群) に雌雄各 10 匹を中間屠殺した。
104 週後、雌雄各 60 匹を最終屠殺した。

投与期間: 最終屠殺群 24 ヶ月 (2007 年 1 月 18 日~2009 年 2 月 1 日)

中間屠殺群 12 ヶ月 (2007 年 1 月 18 日~2008 年 1 月 23 日)

回復群 12 ヶ月+3 ヶ月回復 (2007 年 1 月 18 日~2008 年 1 月 22 日)

投与方法: 検体を雌雄共に 0、100、2000 および 7000ppm の濃度で飼料に混入し、投与期間全般にわたり随時摂取させた。飼料は 6~8 週毎に調製した。

用量設定根拠:

観察・検査項目および結果:

一般状態および死亡: 全ての動物について毎日 2 回 (週末および休祭日は 1 回)、生死および瀕死状態を確認し、毎日 1 回、一般状態について観察した。また、触診を含む詳細な身体検査を試験期間を通じて毎週 1 回実施した。

雌雄共にいずれの用量でも、投与に起因する一般状態の変化は試験期間中を通して認めなかった。

雌雄共にいずれの投与群においても有意な死亡の増加は認めなかった。

体重: 各動物について、投与開始後 13 週間は毎週 1 回、その後は約 4 週間に 1 回体重を測定した。さらに剖検前 (一晚絶食後) にも測定し、最終体重とした。

7000ppm において雄では、平均体重が投与 5 週目から試験終了までの間、対照群に比して 3~9% (ほとんどの場合、 $p \leq 0.05$ または $p \leq 0.01$) 低かったが、試験終了時は有意差を認めなかった。雌では、試験 8 日目から試験終

了時まで平均体重が対照よりも7~17% ($p \leq 0.01$) 低かった。

1日あたりの平均体重増加量が雄で15日目以降、試験終了まで低下する傾向 ($p \leq 0.05$ または $p \leq 0.01$ の有意差を散見) がみられた。雌では試験1~8日目で対照群3.5g/日の体重増加に対し1.4g/日 ($p \leq 0.01$) であった。その後は試験15日目以降、試験終了まで低下傾向 ($p \leq 0.05$ または $p \leq 0.01$ を散見) を示した。

累積体重増加量は雄で22日目より試験終了まで対照群に比して6~14%低下 (ほとんどの場合が $p \leq 0.05$ または $p \leq 0.01$) したが試験期間(1~102週)を通した累積体重増加では有意な差を認めなかった。雌では対照群に比して試験8日目で58%低く ($p \leq 0.01$)、試験15日目から試験終了までは15~32% ($p \leq 0.01$) 低かった。

2000ppm 投与において雄では体重に影響は認めなかった。

雌では、平均体重が8日目から試験終了まで3~12%低かった (ほとんどの場合が $p \leq 0.05$ または $p \leq 0.01$)。一日当たりの平均体重増加量は1~8日目で対照群の3.5g/日に対し2.6g/日と低く ($p \leq 0.01$)、その後も試験終了まで低下傾向 ($p \leq 0.05$ または $p \leq 0.01$ を散見) であった。

累積体重増加量では試験8日目から試験終了まで対照を7~25%下回った (ほとんどの場合が $p \leq 0.05$ または $p \leq 0.01$) が、試験期間(1~102週)を通した累積体重増加では対照群と比較して11%低かったものの有意差は認めなかった。

100ppm および回復段階では体重への影響は認めなかった。

申請者注

雄7000ppmで認めた体重への影響は概して大きなものでなく、試験終了時では有意差を認めなかったが、試験期間を通して有意な低体重が認められていることから安全サイドに立ち毒性影響と捉えた。また、雌2000ppm以上の体重変化についても同様に毒性影響と考えた。

体重および体重増加量の推移を次の表に示した。

表. 体重の推移

性		雄				雌			
用量 (ppm)		0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
体重	2週時							↓96	↓92
	14週時				↓95			↓95	↓91
	26週時				↓95			↓95	↓91
	54週時				↓94			↓91	↓87
	78週時				↓91			↓88	↓84
	最終								↓88

↓ $p \leq 0.01$

(Bartlett, Kruskal-Wallis または ANOVA + Dunn または Dunnett 検定)

数値は対照群に対する割合

表. 体重増加量の推移

性		雄				雌			
用量 (ppm)		0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
増 体 重	1-2週							↓75	↓42
	1-14週				↓92			↓90	↓80
	14-26週								
	26-54週							↓71	↓71
	54-79週								↓60
	78-102週								
	全期間								↓82

↓ p≤0.05、↓ p≤0.01

(Bartlett, Kruskal-Wallis または ANOVA + Dunn または Dunnett 検定)

数値は対照群に対する割合

摂餌量：摂餌量は投与開始6週までは週2回、その後13週までは週1回、以降は4週毎に1回記録した。

7000ppmにおいて雄では4週目から投与終了まで摂餌量のわずかな減少傾向が認められ、有意差を散見した(4-8及び12週)。雌では、12週目以降、有意な減少が試験終了までほぼ持続して認められた。

2000ppm投与において雄では摂餌量に影響は認めなかった。雌では45週目以降有意な減少が散見された。

100ppmおよび回復段階では摂餌量への影響は認めなかった。

有意差を認めた摂餌量減少を以下の表に示した。

表. 摂餌量の推移

性	雄					
	週	2000ppm	7000ppm	週	2000ppm	7000ppm
	4週		↓95	13週以降 有意差は認められ なかった。		
	5週		↓95			
	6週		↓96			
	7週		↓96			
	8週		↓96			
	12週		↓96			

性	雌								
	週	2000ppm	7000ppm	週	2000ppm	7000ppm	週	2000ppm	7000ppm
	12週		↓95	45週	↓95	↓92	81週		↓90
	13週		↓92	57週	↓92	↓89	85週		↓86
	17週		↓95	61週	↓92	↓89	89週		↓90
	21週		↓87	65週	↓92	↓84	97週		↓88
	25週		↓92	69週		↓89	102週	↓88	↓84
	29週		↓90	73週	↓90	↓83			
	33週		↓95	77週	↓91	↓85			

↓ p≤0.05、↓ p≤0.01 (Bartlett, Kruskal-Wallis または ANOVA + Dunn または Dunnett 検定)
数値は対照群に対する割合

検体摂取量：各群の検体摂取量は下表の通りであった。

表. 検体摂取量 (mg/kg/日)

性	雄			雌		
	用量 (ppm)	100	2000	7000	100	2000
1- 53 週	4.6	90	327	6.3	126	446
1-104 週	4.0	79	288	5.6	113	399

眼科学的検査：馴化期間中は全動物、投与 12 ヶ月時には雄の全動物および雌の対照群と 7000ppm 投与群について、また、24 ヶ月時は全生存動物について眼科学的検査を実施した。

投与に起因する所見は認めなかった。

採血：一晚絶食させた動物をイソフルランで麻酔し、後眼窩静脈叢への穿刺により血液を採取した。血液は各 EDTA (血液学的検査用)、リチウムヘパリン (生化学的検査/血漿用) および凝固活性剤 (生化学的検査/血清用) 処理した。また、血液凝固検査用にはクエン酸ナトリウム処理をした。

最終屠殺時、全動物について血液塗沫標本を作製した。

可能な場合は、瀕死動物についても、屠殺直前に血液塗沫標本を作製した。

血液学的検査および血液生化学的検査は中間屠殺群については全生存動物について 4、6 および 12 ヶ月に、回復屠殺群の対照および高用量群の全生存動物については、4、6、12 ヶ月および回復段階の 13 週目に実施した。

最終屠殺群については、生存動物のうち動物番号が若い 10 匹について、4、6、12、18 および 24 ヶ月に実施した。

血液学的検査：採取した血液試料について以下の項目を検査した。

ヘマトクリット (Ht)、ヘモグロビン (Hb)、白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、血小板数 (PLT)、白血球百分率、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、平均赤血球容積 (MCV)、網状赤血球数 (RET/ RET%)、プロトロンビン時間 (PT)

雌雄共にいずれの投与群においても投与に関連する変動は認めなかった。

7000ppm 投与群雌雄において、いくつかの検査時期でプロトロンビン時間および/または網状赤血球数が対照群に比して有意な低値が認められた。

しかし、これらの変化は、発生が不規則および/または変化の程度が小さかったことから、投与に起因するものではないと考えられた。また、24 ヶ月目に雄で認められた赤血球関連パラメータおよび血小板数の有意な変動は、対照値が通常この系統および年齢の対照雄ラットで認められる範囲を越えていたことによるものと考えられた。

その他の変化も発生が散発的および/あるいは用量に関連していないことから、偶発的なものと考えられた。

次の表に統計学的有意差を認めた血液学的検査項目を示す。

表. 血液学的検査結果

性別	雄															
	100					2000					7000					
投与量 (ppm)	100					2000					7000					
検査時期 (月)	4	6	12	18	24	4	6	12	18	24	4	6	12	Re	18	24
検査数	20	20	20	10	10	20	18	19	10	10	28	27	27	9	9	9
RBC														↓96		↑122
WBC	↑115															
Hb																↑124
Ht																↑120
MCV			↑104	↑104										↑102		
MCH			↑103											↑104		
PLT																↓75
RET			↑113											↓90		↓43
RET%														↓86		↓31
好中球																↓64
リンパ球	↑117															
検査数	20	19	17	10	10	20	18	19	9	9	30	26	27	10	9	9
PT			↑107			↑105						↓96		↓91		

性別	雌															
	100					2000					7000					
投与量 (ppm)	100					2000					7000					
検査時期 (月)	4	6	12	18	24	4	6	12	18	24	4	6	12	Re	18	24
検査数	19	20	20	9	10	20	20	19	10	9	29	27	28	9	10	9
RET											↓85		↓81			
RET%											↓79		↓79		↓79	
好中球%															↑128	
検査数	18	19	16	10	10	19	20	18	10	9	27	28	24	10	10	9
PT											↓96	↓96	↓96			

表中の数値は対照群に対する割合(%)

Re : 回復期間 (対照および 7000ppm について検査実施)

↑ ↓ p<0.05、↑ ↓ p<0.01

(Bartlett, Kruskal-Wallis または ANOVA + Dunn または Dunnett 検定)

血液生化学的検査：血漿を用いて、カルシウム(CA)、塩素(CL)、無機リン(PHOS)、カリウム(K)、ナトリウム(NA)、アルカリホスファターゼ(AP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALAT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT)、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)、クレアチニン(CREA)、尿素(UREA)、総コレステロール(CHOL)、グルコース(GLUC)、総ビリルビン(TBIL)、トリグリセリド(TRIG)を測定した。血清を用いて総タンパク(TPRO)およびアルブミン(ALB)濃度を測定し、グロブリン(GLOB)およびアルブミン/グロブリン比(A/G)を算出した。また、血漿および血清の外観に異常があった場合には記録した。

7000ppm および 2000ppm では雌雄の TBIL 濃度が投与期間中を通して有意に低かった。この変動は、回復期間に雌では完全に回復し、雄では軽減した。試験動物に機能障害が全く認められなかったこと、また TBIL は増加時が毒性学的により重要な意義があると考えられることから、TBIL の低値は有害な変化とは考えられなかった。

CHOL 濃度が 7000ppm 雌においてのみ、4、6、12 ヶ月で対照に比して有意に ($p \leq 0.01$) 高かった。この変動は可逆性で、回復および 18 ヶ月以降では観察されなかった。

雌 2000 ppm においても 12 ヶ月の検査で CHOL 濃度は有意であったが、発生が一過性であったことから、この変化は偶発的なものと考えられた。

雄 2000ppm 以上、雌 7000ppm で ASAT 活性および/または ALAT 活性の有意な低値が観察された。しかし、変化の程度は小さく、これら酵素活性の低値は毒性学的に意味のあるものではないと考えられた。

その他、認められた統計学的有意差は、その程度が小さく、発生が散発的であり偶発的、および/または生理的変動範囲のものと考えられ、投与とは関係しないものと考えられた。

表. 血液生化学的検査結果

性別	雄															
	100					2000					7000					
投与量 (ppm)																
検査時期 (月)	4	6	12	18	24	4	6	12	18	24	4	6	12	Re	18	24
検査数	20	20	20	10	10	20	20	19	10	10	30	30	30	10	10	9
TBIL						↓67	↓81		↓57		↓47	↓50	↓50	↓71	↓48	
ASAT								↓71			↓89	↓84	↓63			
ALAT							↓83					↓80	↓67			
AP								↓82					↓86			

<続く>

<続き>

性別	雄															
	100					2000					7000					
投与量 (ppm)																
検査時期 (月)	4	6	12	18	24	4	6	12	18	24	4	6	12	Re	18	24
検査数	20	20	20	10	10	20	20	19	10	10	30	30	30	10	10	9
CHOL				↓82					↓78							
TPRO											↑103	↑103				
ALB											↑103	↑103	↑103			↑112
GLOB									↓93		↑104					
A/G										↑115						↑116
Na						↑101				↑101	↑101	↑101				
K												↑103				
CA				↓97		↑102										↓97
PHOS													↑105			

表中の数値は対照群に対する割合(%)

Re : 回復期間終了時 (対照および7000ppmについて検査実施)

↑ ↓ p<0.05、↑ ↓ p<0.01

(Bartlett, Kruskal-Wallis または ANOVA + Dunn または Dunnett 検定)

表. 血液生化学的検査結果 (続き)

性別	雌															
	100					2000					7000					
投与量 (ppm)																
検査時期 (月)	4	6	12	18	24	4	6	12	18	24	4	6	12	Re	18	24
検査数	20	20	20	10	10	20	20	20	10	9	30	30	29	10	10	10
TBIL						↓67	↓56	↓59		↓58	↓43	↓36	↓41		↓40	↓67
ASAT												↓81	↓70			
ALAT											↓59	↓74	↓58		↓58	
AP													↓75			
GLUC											↓90					
CHOL								↑116			↑126	↑123	↑125			
TRIG											↑135					
TPRO											↑105	↑105				
GLOB							↑108				↑108	↑108	↑107			
A/G		↓96				↓95	↓93	↓95			↓95	↓94	↓96			
CL	↑101															

表中の数値は対照群に対する割合(%)

Re : 回復期間終了時 (対照および7000ppmについて検査実施)

↑ ↓ p<0.05、↑ ↓ p<0.01

(Bartlett, Kruskal-Wallis または ANOVA + Dunn または Dunnett 検定)

尿検査： 中間屠殺群は全生存動物について4、7および12ヶ月に検査した。
回復屠殺群については対照および高用量群の全生存動物について、4、7、12ヶ月および回復段階の12週目に検査した。
また、最終屠殺各群の生存動物10匹(動物番号の若い方から選択)について4、6、12、18および24ヶ月に検査した。
尿は一晚(約16時間)採取し、採尿の間、飼料および水は与えなかった。
採取した尿について以下の項目を検査した。
外観、尿量、屈折率、pH、タンパク質、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン、尿沈渣

7000ppmにおいて、雄では投与に関連した変化は認められなかった。
7000ppm雌では、7および12ヶ月目の尿pH値が統計学的に有意に高く、7ヶ月の尿pHは、対照5.9に対して6.3($p \leq 0.05$)、12ヶ月の尿pHは、対照6.0に対して6.3($p \leq 0.01$)であった。また、12ヶ月までは期間を通して、尿沈渣に結晶が幾分多く観察されたが、結晶の性質は対照群ラットで通常観察されるものと同様であった。これらの変動は可逆的であり、回復および18ヶ月以降では観察されなかったことから、検体による毒性作用とは考えられなかった。

2000ppmおよび100ppmいずれの用量でも、雌雄共に変化は観察されなかった。

屠殺：試験12ヶ月(中間屠殺)、12ヶ月+回復3ヶ月(回復群)および24ヶ月(最終屠殺群)に、全生存動物をイソフラン吸入による深麻酔下で放血致死させた。動物は屠殺前1晩絶食させた。

臓器重量：計画殺動物について以下の組織の重量を測定した。

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

中間(12ヶ月)屠殺群；

7000ppm投与では雌雄共に平均最終体重が対照群に比して低かったが統計学的有意差は認めなかった。肝臓重量において、雌雄共に対体重比が有意に高かった。また、雄では、対脳重量比も有意に対照群を上回った。これらの変化は、鏡検で肝細胞肥大を伴っていたため、投与に起因するものと考えられたが、肝の変化はこの後の回復期間後で認められず、回復性があることから適応反応と考えられ、有害影響とは捉えなかった。
2000ppmでは肝臓重量において、雄で対脳重量比が、雌では対体重比が有意に対照群を上回った。これらの変化は投与に起因するものと考えられ

たが、鏡検において肝細胞肥大が認められなかったことから、有害影響ではないと考えられた。

その他認められた有意差は、わずかな変動であり、用量と関連していないため、投与とは関係しないものと考えられた。

100ppm においては雌雄共に変化は認めなかった。

表. 中間計画殺動物で有意差が認められた臓器重量

性		雄			雌		
用量 (ppm)		100	2000	7000	100	2000	7000
体重		104	108	93	105	101	90
肝臓	対体重比			▲125		↑110	▲130
	対脳重量比		↑116	▲118			
脳	対体重比		↓92				

表中の数値は対照群に対する割合 (%)

↑ ↓ p<0.05、▲◆ p<0.01

(Bartlett, Kruskal-Wallis または ANOVA + Dunn または Dunnett 検定)

回復 (12+3ヶ月) 群;

投与に起因する変化は認めなかった。

2000ppm の雌において、最終体重が有意に高かった (p<0.05)。しかし、用量と関係しないことから、投与と関係しないものと考えられた。

2000ppm および 100ppm 雌の肝重量において、実重量および対脳重量比が有意 (p<0.01) に高かった。しかし、最高濃度 7000ppm では肝重量の変化も肝組織所見も認められず、用量と関係がなかったため、投与とは関係しないものと考えられた。

その他、認められた有意差についても用量に関係がなく、投与とは関係しないものと考えられた。

表. 回復動物で有意差が認められた臓器重量

性		雄			雌		
用量 (ppm)		100	2000	7000	100	2000	7000
体重						↑115	
肝臓	実重量				▲119	▲120	
	対脳重量比				▲119	▲122	
脳	対体重比					◆86	
心臓	実重量				↑108	▲111	
	対脳重量比				↑109	▲113	

表中の数値は対照群に対する割合 (%)

↑ ↓ p<0.05、▲◆ p<0.01

(Bartlett, Kruskal-Wallis または ANOVA + Dunn または Dunnett 検定)

最終 (24 ヶ月) 屠殺群 ;

7000ppm 投与において、雌の平均最終体重が有意に低かった ($p \leq 0.01$)。肝重量では、雌雄で対体重比 ($p \leq 0.01$) が、雄ではさらに実重量および対脳重量比 ($p \leq 0.05$) が、有意に高かった。これらの変化は鏡検において肝細胞肥大が伴っていたことから投与に起因するものと考えられた。2000ppm おいて、雌でのみ平均最終体重が有意 ($p \leq 0.05$) に低かった。その他、認められた有意差は鏡検において所見を伴わないことから投与とは関係しないものと考えられた。

表. 最終屠殺動物で有意差が認められた臓器重量

性		雄			雌		
		100	2000	7000	100	2000	7000
用量 (ppm)							
体重						↓92	↓88
肝臓	実重量			↑114			
	対体重比			▲117			▲113
	対脳重量比			↑114			
脳	対体重比					▲112	
心臓	実重量						↓89
	対脳重量比						↓90
脾臓	実重量					↓79	↓77
	対体重比					↓87	
	対脳重量比					↓81	↓78
腎臓	実重量						↓88
	対脳重量比						↓88
副腎	実重量						↓88
	対脳重量比						↓89

表中の数値は対照群に対する割合 (%)

↑ ↓ $p \leq 0.05$, ▲ ▼ $p \leq 0.01$

(Bartlett, Kruskal-Wallis または ANOVA + Dunn または Dunnett 検定)

肉眼的病理検査：全ての動物について剖検し、外表、全開口部、主要臓器・組織および体腔を検査し、肉眼的異常はすべて（可能な場合、腫瘍およびその所属リンパ節を含む）記録した。

中間 (12 ヶ月) 屠殺群および回復群 (12 ヶ月+3 ヶ月回復) ;

7000ppm 中間屠殺群雌雄において、肝臓の肥大および暗色化を認め、鏡検で肝細胞肥大の高い発生率を伴っていた。また、甲状腺の肥大が認められ、鏡検における濾胞上皮細胞肥大の発生と関係していた。

2000ppm 雌で肝臓肥大を認めたが、鏡検で肝細胞の肥大を伴ってはいなかったため、投与との関連はないと判断した。

回復群の雌雄においても肝に数例の肥大を認めたが最高濃度 7000ppm でも鏡検所見を伴わないことから投与と関係しないものと考えられた。また、甲状腺肥大が数例にみられたが、この動物に対応する鏡検所見がないことから投与と関係しないものと考えられた。

その他、認めた所見も、鏡検所見を伴わないことから投与と関係しないものと考えられた。

次の表に中間屠殺動物および回復動物における主な肉眼的所見を示した。

表. 中間屠殺動物における主な肉眼的所見数

性		雄				雌			
用量(ppm)		0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
検査動物数		10	10	9	10	10	10	10	9
肝臓	肥大	1	1	1	**8	0	1	*4	**7
	暗色化	0	0	0	2	0	0	1	2
甲状腺	肥大	0	0	0	2	0	0	0	1

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

表. 回復動物における主な肉眼的所見数

性		雄				雌			
用量(ppm)		0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
検査動物数		10	10	9	10	9	10	9	9
肝臓	肥大	0	1	1	2	0	2	1	0
	暗色化	0	0	0	0	0	0	1	2
甲状腺	肥大	0	0	0	2	0	0	0	1

(Fisher 検定 / 申請者により実施)

最終 (24 ヶ月) 屠殺群 ;

7000ppm 雌の肝臓において、肥大および白色巣が多く認められ (p<0.05)、暗色化の発生もやや多かった (有意差なし)。また、7000ppm では雌雄で、甲状腺の暗色化が各 3 例に認められた。

2000ppm では雌の肝臓に肥大および白色巣の発生数が幾分多かった。(有意差なし)。

その他に認められた所見は鏡検で明らかな変化を認めない事などから投与と関連しないものと考えられた。

表. 最終屠殺動物における主な肉眼的所見数

性		雄				雌			
用量 (ppm)		0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
検査動物数		19	24	21	24	29	37	43	43
肝臓	肥大	1	0	1	2	5	1	10	*19
	暗色化	0	0	1	2	1	3	3	7
	白色巣	6	10	3	5	6	10	16	*21
肺	白色巣	1	3	1	4	3	5	7	12
甲状腺	暗色化	0	0	1	3	0	0	0	3

* ; p<0.05 (Fisher 検定 / 申請者により実施)

病理組織学的検査: 以下の臓器/組織を採取し、10%中性緩衝ホルマリンに固定した。
また、眼、視神経、ハーダー腺、精巣上体および精巣についてはダビドソン液で固定した。

舌、顎下(唾液)腺、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、肝臓、膵臓、気管、肺、鼻腔、咽頭、喉頭、胸部大動脈、心臓、骨髄、胸骨、腸間膜リンパ節、下顎リンパ節、脾臓、胸腺、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、精囊、卵巣、子宮(頸部と共に)、乳腺、膈、脳(3切片)、坐骨神経、脊椎(頸部、胸部、腰部)、眼(網膜)、視神経、下垂体、副腎、眼窩外涙腺、甲状腺(上皮小体含む)、ハーダー腺、骨(胸骨)、骨格筋、皮膚、関節面(大腿脛骨関節)、肉眼的病変部および腫瘍(可能ならリンパ節を含める)

上記の全組織(眼窩外涙腺、喉頭/咽頭および鼻腔を除く)についてパラフィン包埋して以下の通りヘマトキシリン-エオジン染色した病理組織スライドを作製し、まず、試験に関係する病理学者が鏡検した後、別の病理学者によりピアレビューする方法で病理組織学的に検査した。

- ・ 中間屠殺群は対照および高用量群について全臓器を、中間用量群は肝臓、肺、腎臓および甲状腺を検査した。
- ・ 回復屠殺群は対照および高用量群の肝臓および甲状腺、2000ppm群の甲状腺を検査した
- ・ 最終屠殺群は全動物について全組織(眼窩外涙腺、喉頭/咽頭および鼻腔を除く)について検査した。
- ・ 死亡または切迫屠殺した動物は、全臓器および肉眼的異常部位を全動物について検査した。

中間屠殺（12ヶ月）群および回復群（12ヶ月+3ヶ月回復）；

非腫瘍性病変

中間屠殺群 7000 ppm において、雌雄の肝臓で小葉中心性ないし汎小葉性の肝細胞肥大が有意に多かった。また、小葉中心性肝細胞巨大空胞の発生率が雄で有意に高く、雌でも幾分多かった。さらに雌でのみ、肝細胞の褐色色素（リポフスチン¹）沈着が有意に認められた。また、雌雄共に甲状腺濾胞上皮細胞肥大の発生がやや多く、雌でのコロイド変化（軽度の凝集）は他の群に比して多かったが、いずれも統計学的に有意ではなかった。

回復群では中間屠殺群で認めた肝臓の変化は見られなかった。また、7000ppm 雄で甲状腺濾胞上皮細胞肥大を1例認めたのみで、甲状腺の変化も可逆的であった。

上記のとおり、7000ppm で12ヶ月間投与したラットには雌雄共に肝に所見が認められたが、その後3ヶ月間の回復期間で消失しており、肝の変化は回復性があり、投与検体の肝代謝による適応反応と考えられることから、有害影響とは捉えなかった。また、甲状腺の所見は検体の肝代謝に伴って甲状腺ホルモンの肝代謝が二次的に亢進したことによるものと考えられた。

表. 中間屠殺(12ヶ月)群で認めた主な組織学的所見数

性別		雄				雌			
		0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
用量 (ppm)		0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
検査した動物数		10	10	10	10	10	10	10	10
肝臓	肝細胞肥大：(軽微～軽度) 小葉中心性～汎小葉性	0	0	0	**10	0	0	0	**9
	肝細胞巨大空胞化： 主に小葉中心性	1	1	2	**7	1	0	1	3
	肝細胞褐色色素沈着 ^{a)}	0	0	0	0	0	0	0	*4
甲状腺	濾胞上皮細胞肥大：びまん性	0	0	0	3	0	0	1	3
	コロイド変化 ^{b)}	7	3	5	7	0	0	0	3

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

^{a)}リポフスチン、^{b)}コロイドの軽度な凝集

表. 回復群で認めた主な組織学的所見数

性別		雄				雌			
		0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
用量 (ppm)		0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
検査した動物数		10	-	9	10	9	-	9	9
甲状腺	濾胞上皮細胞肥大：びまん性	0	0	0	1	0	0	0	0

-: 未実施 (Fisher 検定 / 申請者により実施)

¹ リポフスチンは加齢や化学物質投与などでみられる色素として知られる細胞質のリソソーム内に蓄積される不溶性色素で長期間投与試験ではよく認められる。他に可能性の考えられる色素沈着としてヘモジデリンがあるが、その原因となり得る溶血性貧血などの徴候は無く、組織観察の特徴などから褐色色素はリポフスチンと判断した。

腫瘍性病変

中間屠殺および回復群で、投与に起因する腫瘍性所見は認めなかった。

最終（24ヶ月）屠殺群；

非腫瘍性病変

7000 ppm において雌雄共に肝臓における小葉中心性ないし汎小葉性肝細胞肥大が認められ、肝重量パラメータの有意な増加を伴っていた。ならびに小葉中心性肝細胞巨大空胞化の発生率が雌雄共に対照群を有意に上回った。雌では、肝細胞への褐色色素沈着の発生が有意に認められ、門脈周囲性肝細胞空胞化の発生率が有意に低下した。雌雄で甲状腺濾胞上皮細胞肥大（有意差なし）がみられ、コロイド変化（軽度の凝集）の発生が有意であった。また、雌では濾胞上皮細胞への褐色色素沈着（リポフスチン）も有意であった。

2000ppm では雌雄共に、小葉中心性ないし汎小葉性肝細胞肥大ならびに小葉中心性巨大空胞化の発生が有意であった。また、雌では肝細胞への褐色色素沈着も有意であった。甲状腺コロイド変化の発生率が雌においてのみ有意であった。

100ppm では雄でのみ、肝小葉中心性ないし汎小葉性肝細胞肥大を少数例のみに認め、統計学的には有意となった。

上記した全ての投与群での肝臓に認められた所見は、投与に対する適応であり、可逆的な反応^{註)}と考えられ、有害影響ではないと考えられた。

好酸性変異肝細胞巣が対照群を含めた全ての群で、雌雄共に高い発生率で観察され、雌の 2000ppm および 7000ppm で有意差 ($p \leq 0.01$ または $p \leq 0.05$) が認められた。しかし、最も多い発生率であったのは雌の 2000ppm で、最高用量 7000ppm での発生率は 2000ppm よりも低く、発生に用量との関係が無かった。また、背景対照データにおける好酸性変異肝細胞巣の発生率は () であるのに対し、最高用量 7000ppm 雌での発生数は

60 例中 39 例 (65%) と背景対照データに近似していた。これらのことから、投与に起因するものではないと考えられた。

なお、その他の変異細胞巣所見や過形成所見の有意な増加は認めなかった。

最終屠殺群で認めた肝臓および甲状腺の主な非腫瘍性病変を次の表に示す。

^{註)} 申請者注

肝細胞に認められた所見は、いずれも変化の程度が主に軽微に分類されたわずかな変化である。また、12ヶ月間投与群（中間屠殺群）7000ppm においても 24ヶ月間投与群（最終屠殺群）と同様な肝変化の有意な発生が認められているが、12ヶ月間投与後の3ヶ月間の回復期間によりこれらの肝臓所見は認められなくなり、12ヶ月間投与後の肝変化は可逆的な変化であることが確認され、さらに、

定期的実施された生化学的検査でも肝への障害を反映する酵素等の上昇等はいずれの検査時期にも認められていない。このため、肝に認めた変化は生体異物に対する適応にとどまったものであり、有害影響とはみなされていない。

しかし一方、24ヶ月間投与（試験終了）後のラットでは肝変化の回復性は明らかでない。この様なことから、申請者は安全サイドに立ち、24ヶ月間投与の2000ppm以上の頻度の増加は検体投与による毒性影響とみなした。しかし、100ppmの雄（全動物[途中死亡+最終屠殺]）に肝細胞肥大の統計学的に有意な増加が認められたが、生化学検査で肝への障害を示唆する変動は認めていない。また、重量変化を認めないほどにその肝細胞肥大の程度も軽微で、発生数も5例と少なく、最終屠殺あるいは途中死亡別に発生数を見た場合、統計学的に有意ではなく、他に有意な肝臓の組織所見を伴わないことから、100ppm雄でみられたこの肝細胞肥大のわずかな増加は、毒性影響を示すものではなく、生体異物に対する適応反応と捉えてよいものと考えた。

表. 最終屠殺群で認めた肝臓および甲状腺の主な非腫瘍性病変

性別		雄				雌			
		0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
用量 (ppm)		0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
検査した動物数		60	60	60	60	60	60	60	60
肝臓	肝細胞肥大：小葉中心性～汎小葉性								
	軽微	0	5	20	39	0	0	21	26
	軽度	0	0	1	11	0	0	1	20
	中等度	0	0	0	0	0	0	0	1
	合計	0	*5	**21	**50	0	0	**22	**47
	(死亡・屠殺)	(0)	(2)	(#12)	(#27)	(0)	(0)	(2)	(#9)
	(計画屠殺)	(0)	(3)	(#9)	(#23)	(0)	(0)	(#20)	(#38)
	肝細胞巨大空胞化：主に小葉中心性/びまん性								
	軽微	0	1	8	21	0	0	13	19
	軽度	0	0	1	2	0	0	3	8
	中等度	0	0	0	0	0	0	2	2
	強度	0	0	0	0	0	0	0	1
	合計	0	1	**9	**23	0	0	**18	**30
	肝細胞褐色色素沈着 ^{a)} ：巣状								
	軽微	0	0	0	2	1	0	8	9
	軽度	0	0	0	0	0	0	1	2
	合計	0	0	0	2	1	0	*9	**11
	肝細胞空胞化：主に門脈周囲性/びまん性								
	軽微	2	9	2	2	15	14	12	7
軽度	3	0	5	3	16	13	12	3	
中等度	3	3	0	1	5	4	2	0	
強度	0	2	0	1	0	1	1	0	
合計	8	14	7	7	36	32	27	#10	

<続く>

<続き>

性別		雄				雌			
用量 (ppm)		0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
肝臓	検査した動物数	60	60	60	60	60	60	60	60
	好酸性変異細胞巢								
	軽微	22	26	26	20	25	24	23	23
	軽度	1	4	6	9	2	14	22	15
	中等度	0	0	0	1	0	0	1	1
	合計	23	30	32	30	27	38	**46	*39
甲状腺	検査した動物数	60	59	59	59	60	59	60	59
	濾胞上皮細胞肥大：びまん性								
	軽微	0	1	1	3	0	0	0	3
	中等度	0	1	0	0	0	0	0	0
	合計	0	2	1	3	0	0	0	3
	コロイド変化 ^{b)}	25	27	30	**48	2	4	**17	**29
濾胞上皮細胞褐色色素沈着 ^{c)}	11	8	14	15	4	1	6	*13	

a)、^{c)}リボフラビン、^{b)}コロイドの軽度な凝集

** : p<0.01 ; * : p<0.05 : (Fisher 検定 / 増加した発生率について解析(生存数により調整))

; p<0.01 (Fisher 検定 / 申請者により実施)

腫瘍性病変

少数例の肝細胞腫瘍(腺腫+癌)が雄の対照を含めて雌雄ほとんどの群で認められた。しかし、最も多い発生率で有意差を認めたのは雌の2000ppmのみで、最高用量7000ppmに有意差は認められず、用量と影響の関係はなかった。また、背景対照データにおける肝細胞腺腫の発生率は最高で

であるのに対し、本試験の最高用量7000ppmでは60例中4例(雌)と背景対照データに近似しており、肝細胞腫瘍に関して投与の影響はないと結論した。

表. 最終屠殺群で認めた主な肝臓腫瘍

性別		雄				雌			
用量 (ppm)		0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
検査数		60	60	60	60	60	60	60	60
肝臓	肝細胞腺腫	1	1	0	2	0	2	*5	4
	肝細胞癌	1	1	0	0	0	0	1	0
	肝細胞腺腫+癌	2	2	0	2	0	2	*6	4

* : p<0.05 (Fisher 検定)

申請者注

肝所見のヒトに対する影響を確認する目的で

また、これらに基づき、海外での評価（EU/ACP）において、本試験でラットに認めた肝腫瘍性変化はヒトに対して関連性は無いと評価（2011）されている。

雌 7000ppm では卵巢管間質性腫瘍（腺腫および腺腫+腺癌）の発生数が対照群を上回った（有意差なし）。しかし、用量-反応関係が認められず、投与用量が上昇するにつれて腺腫から腺癌へと移行する証拠がないこと、また、投与関連性の管間質の増殖であれば、管間質過形成の発生数および重症度が倍増ではなく指数関数的に増加すると推定されることから、投与に起因するものではないと考えられた。

表. 最終屠殺群 卵巢に認めた主な腫瘍および過形成の重症度

性別		雌				
		用量 (ppm)	0	100	2000	7000
検査数		60	60	60	59	
卵巢	管間質腺腫	2	1	1	7	
	管間質腺癌	0	1	1	0	
	管間質腺腫+腺癌	2	2	2	7	
	管間質過形成	軽微	2	0	0	5
		軽度	0	2	0	0
		中等度	0	2	0	1
強度		1	0	1	1	
合計		3	4	1	7	

(Fisher 検定)

申請者注

化学物質処置に関連した管間質腺腫は一般に、ホルモンバランスを障害する物質で誘発され、過形成から腺腫や腺癌の増加に至る連続性があり、明らかな発癌物質では管間質腺腫の増加に関連して管間質過形成が際立って増加すると考えられる。しかし、本試験においては、卵巢重量に変化はなく、組織学的にも卵巢にエストロゲン刺激による卵胞嚢胞様の変化あるいはプロゲステロン刺激による黄体の変化などのホルモンバランスの障害を示唆する形態変化は他の試験を含めて認められていない。また、一般に言われている化学物質処置に関連した卵巢管間質の際立った過形成の増加、腺腫あるいは癌に至る連続性のある

増殖変化とは本試験の結果は異なっている。対照群を含めて雌の全投与群にみられた本試験での卵巣管間質性腫瘍の発生は投与用量に関連がなく、卵巣管間質性腫瘍の統計学的有意差のないわずかな発生数の増加は本検体投与に関連したものではないと考えられる。

組織球性肉腫が、雄の対照群で認めなかったことに対し、雄の検体投与群では100、2000 および 7000ppm 群で60例中各3(5%)、3(5%) および5(8.3% $p \leq 0.05$) 例認められた。しかし、最終屠殺時での発生が100ppm および 7000ppm で同数であるのに中間濃度 2000ppm では発生がなく、投与用量に関連性を認めなかった。また、雌の対照群での発生率が60例中3例(5%)であること、また、Rita データベース (Registry of Industrial Toxicology Animal-data) からの背景対照データ (Wistar ラットにおいて最高で、
で同等の発生率) を考慮し、組織球性肉腫は投与に起因するものではないと考えられた。

表. 最終屠殺群で認めた組織球性肉腫

性別		雄				雌				
		用量 (ppm)				用量 (ppm)				
		0	100	2000	7000	0	100	2000	7000	
造血 臓器	組織球性 肉腫	検査数(合計)	60	60	60	60	60	60	60	60
		全動物	0	3	3	*5	3	0	0	0
		検査数	19	24	21	24	29	37	43	43
		最終屠殺	0	3	0	3	1	0	0	0

*: $p \leq 0.05$ (Fisher 検定)

申請者注

組織球肉腫について、以下に示す5点を考慮し検体に起因するものではないものと考えた。

1. 雄で認めた組織球性肉腫を個別別にみた場合、皮膚、皮下など限られた組織に認めた動物と全身に組織球性肉腫を認めている動物があり、両者では生物学的増殖態度が異なっていると考えられた。このことから両者を分けた発生頻度について統計解析を実施したところ、以下の表に示したようにいずれの投与群においても対照群に比して統計学的有意差は認められなかった。

表. 発生部位による組織球性肉腫の発生頻度 (雄)

用量 (ppm)		0	100	2000	7000
動物数		60	60	60	60
組織球性肉腫	(合計)	0	3	3	*5
	(皮膚/皮下のみ)	0	1	2	1
	(その他全身性)	0	2	1	4

*: $p \leq 0.05$ (Fisher 検定)

2. 最終屠殺時での発生頻度に用量に関連した増加が認められていないこと
3. 雄の最高用量群での組織球性肉腫の発生頻度は、背景値を超えてはいるものの、近似したものであること
4. ラットでの組織球性肉腫の発生は性別に依存したものではないとの報告 (Firth C. and al, 1993)があるが、本試験では雄のみに頻度の増加が認められ、雌では検体投与群で1例も認められず、対照群でのみ3例認められており、雌での頻度の増加が認められないこと。
5. 一般に変異原性を有する化学物質によってもラットでの組織球性肉腫の誘発は知られていない (Greaves P, 2007)

脳の星状膠細胞腫が雄で60例中対照群1例、および7000 ppm群で3例が認められた。背景対照データでもこの星状膠細胞腫の発生率は同程度 () であったこと、また、これら腫瘍の発生が7000ppmでは計画外死亡・屠殺動物のみで認められ、最終計画屠殺では発生は認められなかったことから、この所見は投与とは関係しないものと考えられた。

表. 最終屠殺群で認めた脳の星状膠細胞腫

性別			雄				雌			
			0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
脳	星状膠細胞腫	検査数(合計)	60	60	59	60	60	59	60	60
		全動物	1	1	0	3	0	1	0	0
		検査数	19	24	21	24	29	37	43	43
		最終屠殺	1	1	0	0	0	1	0	0
		検査数	41	36	38	36	31	22	17	17
		死亡・屠殺	0	0	0	3	0	0	0	0

(Fisher 検定)

本検体を2年間にわたってラットに混飼投与したが、投与に起因する一般状態の変化および死亡率に対する投与の影響は雌雄共にいずれの投与群においても認められなかった。また雌雄いずれにおいても、投与に起因する腫瘍性変化は観察されず、腫瘍発生数や腫瘍を有する動物の数に対照群との差は無かった。

7000ppmにおいて、試験期間を通して、雌雄の体重および体重増加量、摂餌量が低く、雌でより顕著であった。雌雄共に肝重量が増加し、肝の組織検査で肝細胞肥大、巨大空胞化がみられ、雌では褐色色素の沈着も認められた。また、甲状腺では、雌雄とも濾胞上皮細胞肥大、コロイド変化が観察された。尚、肝臓および甲状腺の変化は、1年間投与後3ヶ月間の回復期間の後は、消失ないし減少した。

2000ppmでは雌でのみ、体重パラメータが試験期間を通して低く、摂餌量の低下も認

められた。雌雄で肝細胞肥大、巨大空胞化がみられ、雌では褐色色素の沈着も認められた。最終屠殺時のみ、雌で甲状腺のコロイド変化が有意に多かった。

100ppm においては投与に関連する有害な影響は認めなかった。

以上の結果から、Wistar ラットに本検体を 1 年間投与した無毒性量は雌雄共に 7000ppm (雄: 327 mg/kg 体重/日、雌: 446 mg/kg 体重/日)、2 年間混餌投与した無毒性量は、雌雄共 100ppm (雄: 4.0 mg/kg 体重/日、雌: 5.6 mg/kg 体重/日) であった。

なお、本検体は Wistar ラットに対する 2 年間の投与において、発がん性を有しないものと考えられる。

申請者注

1 年間投与でも雄の 7000ppm、雌 2000ppm 以上では軽度ながら体重が持続して有意な低値が認められていたことから、安全サイドに立ち、申請者は 1 年間投与での無毒性量を雄 2000ppm (90 mg/kg 体重/日)、雌 100ppm (6.3 mg/kg 体重/日) と考えた。なお、1 年間投与群でみられた肝組織変化は 7000ppm まで回復性を確認できており可逆性であることから適応反応と捉えたが、2 年間投与後では回復性が確認できないことから毒性影響と考えた。しかし、100ppm での肝細胞肥大については、その程度が軽微であり、発生数も少なく、他に有意な肝の組織所見を伴わないことから毒性影響を示すものではなく、適応反応と捉えてよいものと考えた。

主な非腫瘍性病変

検査時期	性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
	検査動物数	41	36	39	36	31	23	17	17
最終屠殺群 ・ 死亡／屠殺動物	胸骨 検査数	41	36	38	36	31	23	17	17
	軟骨変性	34	23	30	24	19	13	7	5
	脳 検査数	41	36	38	36	31	22	17	17
	腹側湾入	10	9	5	8	15	14	7	6
	精巣上体 検査数	41	36	39	36				
	生殖細胞剥離	24	8	15	12				
	ハダ腺 検査数	41	36	39	34	31	23	17	17
	色素沈着	37	27	33	23	22	18	14	13
	心臓 検査数	41	36	39	36	31	23	17	17
	慢性心筋症	39	33	38	30	25	20	17	12
	血管炎/血管周囲炎	4	0	1	0	0	0	1	1
	腎臓 検査数	41	36	39	36	31	23	17	17
	集合管過形成	9	2	9	6	4	3	2	4
	慢性腎症	31	17	18	21	9	8	3	3
	好塩基性尿細管	8	15	11	8	13	8	8	9
	髓質鉍質沈着	1	0	0	0	15	6	2	6
	移行上皮鉍質沈着	15	12	11	5	17	14	10	6
	腎盂/混合細胞浸潤	2	0	2	1	3	1	3	0
	肝臓 検査数	41	36	39	36	31	23	17	17
好酸性変異細胞巣	12	10	15	14	10	10	10	4	
肝細胞肥大	0	2	12	27	0	0	2	9	
肝細胞褐色色素沈着	0	0	0	1	1	0	1	2	
胆管線維化	27	18	15	10	8	2	2	1	
肝細胞空胞化	4	7	1	3	12	7	4	1	
肝細胞巨大空胞化	0	0	7	15	0	0	0	4	
肝細胞壊死巣	1	2	9	1	1	3	1	1	
間質細胞浸潤	5	1	7	7	1	4	2	4	
門脈周囲混合細胞浸潤	7	2	0	1	2	1	1	1	
靱帯下脂肪化	1	3	1	5	1	1	0	2	
肺 検査数	41	36	38	36	21	23	17	17	
間質性肺炎	3	0	2	1	1	0	1	0	
うっ血	0	0	0	0	0	0	0	0	

主な非腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
最終屠殺群・死亡/屠殺動物	検査動物数	41	36	39	36	31	23	17	17
	乳腺 検査数	40	35	35	33	31	23	17	17
	腺房過形成	0	6	1	1	21	16	13	8
	上皮褐色色素沈着	30	25	26	24	6	1	1	2
	腸間膜リンパ 検査数	41	36	39	36	30	23	17	16
	肥大マクロファージ	34	36	35	34	29	23	16	12
	卵巣 検査数					31	23	17	16
	黄体減少					16	12	12	12
	卵胞性嚢腫					5	2	2	2
	黄体変性					2	1	0	1
	管間質過形成					1	1	0	3
	脾臓 検査数	38	34	36	35	29	21	16	16
	血管炎/血管周囲炎	3	0	0	3	3	2	1	1
	下垂体 検査数	41	36	38	36	31	21	17	17
	前葉過形成	20	10	11	15	7	5	6	6
	細胞内褐色色素沈着	5	4	5	2	7	7	6	4
	前立腺 検査数	41	36	39	35				
	腺房内鈣質沈着	27	34	33	29				
	坐骨神経 検査数	41	34	39	36	31	23	17	17
	髄鞘線維変性	33	29	35	26	20	16	15	8
	骨格筋 検査数	40	35	39	36	31	23	17	17
	筋線維萎縮/変性	40	35	38	32	29	23	16	16
	胃 検査数	41	36	37	36	31	23	17	16
	腺胃びらん	1	2	1	1	5	1	0	0
	角化亢進	4	6	4	7	7	6	3	2
	漿膜/混合細胞浸潤	3	3	1	2	5	3	0	0
顎下リンパ 検査数	41	36	39	36	31	22	16	16	
形質細胞増加	24	19	21	20	26	13	14	12	
精巣 検査数	41	36	39	36					
精細管変性	19	12	9	10					
膀胱 検査数	39	35	36	35	29	23	15	17	
上皮下单核細胞浸潤	4	3	2	0	5	4	4	4	
胸腺 検査数	33	34	37	36	31	21	17	16	
嚢胞性変化	5	4	6	1	11	10	6	5	

主な非腫瘍性病変（続き）

検査時期	性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
	検査動物数	41	36	39	36	31	23	17	17
最終屠殺群・死亡／屠殺動物	気管 検査数	41	36	38	36	31	23	17	17
	単核細胞浸潤	6	5	7	6	3	3	5	1
	甲状腺 検査数	41	35	38	35	31	22	17	16
	コロイド変化	16	13	16	26	0	1	3	5
	濾胞上皮細胞褐色色素沈着	5	3	8	4	2	0	2	3
	嚢胞様濾胞	2	2	8	4	2	0	2	1
	後嚢胞	12	8	5	11	5	3	5	5
	濾胞上皮細胞肥大	0	0	0	2	0	0	0	1
	子宮 検査数					31	23	17	17
	子宮角拡張					6	2	2	1
	膈 検査数					31	23	15	17
	粘液分泌					14	14	10	10
	萎縮					7	3	1	4

主な非腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
	検査動物数	19	24	21	24	29	37	43	43
最終屠殺群	胸骨 検査数	19	24	20	24	29	37	43	43
	軟骨変性	14	23	13	19	20	30	32	24
	脳 検査数	19	24	21	24	29	37	43	43
	腹側湾入	1	4	6	1	9	13	19	8
	精巣上体 検査数	19	24	21	24				
	生殖細胞剥離	10	13	10	14				
	ハダ腺 検査数	19	24	21	24	29	37	43	43
	色素沈着	18	24	21	22	28	32	40	37
	心臓 検査数	19	24	21	24	29	37	43	43
	慢性心筋症	19	23	20	24	27	35	43	42
血管炎/血管周囲炎	1	2	1	0	2	2	1	0	
計画屠殺動物	腎臓 検査数	19	24	21	24	29	37	43	43
	集合管過形成	3	1	2	3	3	2	2	0
	慢性腎症	14	18	17	18	9	14	23	13
	好塩基性尿細管	3	6	4	6	17	20	16	26
	髓質鉍質沈着	0	0	0	1	9	7	12	12
	移行上皮鉍質沈着	9	11	8	5	20	28	29	21
	腎盂/混合細胞浸潤	0	1	1	0	6	4	5	2
肝臓 検査数	19	24	21	24	29	37	43	43	
好酸性変異細胞巣	11	20	17	16	17	28	36	35	
肝細胞肥大	0	3	9	23	0	0	20	38	
肝細胞褐色色素沈着	0	0	0	1	0	0	8	9	
胆管線維化	16	16	14	17	8	9	9	6	
肝細胞空胞化	4	7	6	4	24	25	23	9	
肝細胞巨大空胞化	0	1	2	8	0	0	18	26	
肝細胞壊死巣	0	4	2	0	0	1	1	3	
間質単核細胞浸潤	12	11	10	17	19	22	27	37	
門脈周辺部混合細胞浸潤	0	0	0	0	1	0	0	0	
靱帯下脂肪化	5	7	5	6	6	8	14	13	
肺 検査数	19	24	21	24	29	37	42	43	
管質性肺炎	3	0	0	1	1	2	0	7	
うっ血	11	10	13	8	9	14	21	16	

主な非腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
	検査動物数	19	24	21	24	29	37	43	43
最終屠殺群・計画屠殺動物	乳腺 検査数	17	22	19	22	29	37	42	43
	腺房過形成	1	1	1	3	13	17	23	10
	上皮褐色色素沈着	15	19	14	20	2	1	1	2
	腸間膜リンパ 検査数	19	24	21	24	29	37	43	43
	肥大マクロファージ	19	24	21	24	28	36	42	40
	卵巣 検査数					29	37	43	43
	黄体減少					12	18	30	23
	卵胞性嚢腫					10	17	23	19
	黄体変性					6	5	2	9
	管間質過形成					2	3	1	4
	脾臓 検査数	19	24	21	24	29	37	43	43
	血管炎/血管周囲炎	4	1	2	1	4	4	4	2
	下垂体 検査数	19	24	21	23	29	37	43	43
	前葉過形成	14	12	11	10	13	20	18	15
	細胞内褐色色素沈着	1	3	5	4	8	13	19	4
	前立腺 検査数	19	24	21	24				
	腺房内鉍質沈着	17	20	15	19				
	坐骨神経 検査数	19	24	21	24	29	37	43	43
	髄鞘線維変性	18	24	21	24	29	35	42	42
	骨格筋 検査数	19	24	21	24	29	37	43	43
筋線維萎縮/変性	19	24	20	22	29	36	43	43	
胃 検査数	19	24	21	24	29	37	43	43	
腺胃びらん	0	0	2	0	0	1	4	0	
角化亢進	3	2	4	4	4	0	5	0	
漿膜/混合細胞浸潤	0	1	0	2	0	0	2	0	
顎下リンパ 検査数	19	23	21	24	29	37	43	43	
形質細胞増加	19	15	15	16	23	24	32	33	
精巣 検査数	19	24	21	24					
精細管変性	6	11	7	10					
膀胱 検査数	19	24	21	24	28	36	41	43	
上皮下单核細胞浸潤	4	1	3	0	7	6	8	10	
胸腺 検査数	18	24	21	23	29	36	41	43	
嚢胞性変化	4	3	4	2	14	19	18	20	

主な非腫瘍性病変（続き）

検査時期	性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
	検査動物数	19	24	21	24	29	37	43	43
最終屠殺群・計画屠殺動物	気管 検査数	19	24	21	24	29	37	42	43
	単核細胞浸潤	5	4	8	6	7	6	14	5
	甲状腺 検査数	19	24	21	24	29	37	43	43
	コロイド変化	9	14	14	22	2	3	14	24
	濾胞上皮細胞褐色色素沈着	6	5	6	11	2	1	4	10
	嚢胞様濾胞	2	2	4	3	4	11	7	7
	後嚢嚢胞	4	4	1	5	4	6	10	12
	濾胞上皮細胞肥大	0	2	1	1	0	0	0	2
	子宮 検査数					29	36	43	43
	子宮角拡張					10	5	7	9
	膈 検査数					29	36	42	43
	粘液分泌					25	29	37	36
萎縮					0	3	0	0	

主な非腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
	検査動物数	60	60	60	60	60	60	60	60
最終屠殺群	胸骨 検査数	60	60	58	60	60	60	60	60
	軟骨変性	48	46	43	43	39	43	39	*29
	脳 検査数	60	60	59	60	60	59	60	60
	腹側湾入	11	13	11	9	24	27	26	*14
	精巣上体 検査数	60	60	60	60				
	生殖細胞剥離	34	*21	25	26				
	ハダ腺 検査数	60	60	59	58	60	60	60	60
	色素沈着	55	51	54	*45	50	50	54	50
	心臓 検査数	60	60	59	58	60	60	60	60
	慢性心筋症	58	56	58	54	52	55	**60	54
血管炎/血管周囲炎	5	2	2	*0	2	2	2	1	
最終屠殺群	腎臓 検査数	60	60	60	60	60	60	60	60
	集合管過形成	12	*3	11	9	7	5	4	4
	慢性腎症	45	*35	*35	39	18	22	26	16
	好塩基性尿細管	11	*21	15	14	30	28	24	35
	髓質鉍質沈着	1	0	0	1	24	*13	*14	18
	移行上皮鉍質沈着	24	23	19	**10	37	42	39	*27
	腎盂/混合細胞浸潤	2	1	3	1	9	5	8	*2
全動物	肝臓 検査数	60	60	60	60	60	60	60	60
	好酸性変異細胞巢	23	30	32	30	27	38	**46	*39
	肝細胞肥大	0	*5	**21	**50	0	0	**22	**47
	肝細胞褐色色素沈着	0	0	0	2	1	0	**9	**11
	胆管線維化	43	34	**29	**27	16	11	11	*7
	肝細胞空胞化	8	14	7	7	36	32	27	10
	肝細胞巨大空胞化	0	1	**9	**23	0	0	**18	**30
	肝細胞壊死巢	1	6	**11	1	1	4	2	4
	間質単核細胞浸潤	28	32	31	36	30	28	37	*40
	門脈周辺部混合細胞浸潤	7	2	**0	*1	3	1	1	1
靱帯下脂肪化	6	10	6	11	7	9	14	*15	
全動物	肺 検査数	60	60	59	60	60	60	59	60
	間質性肺炎	6	*0	2	2	2	2	1	7
	うっ血	34	31	33	*24	20	26	29	21

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

主な非腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
	検査動物数	60	60	60	60	60	60	60	60
最終屠殺群 ・ 全動物	乳腺 検査数	57	57	54	55	60	60	59	60
	腺房過形成	2	*8	2	1	45	46	46	46
	上皮褐色色素沈着	45	44	40	44	8	*2	2	4
	腸間膜リンパ 検査数	60	60	59	60	59	60	60	60
	肥大マクロファージ	53	**60	56	58	57	59	58	52
	卵巣 検査数					60	60	60	59
	黄体減少					28	30	**42	35
	卵胞性嚢腫					15	19	*25	21
	黄体変性					8	6	*2	10
	管間質過形成					3	4	1	7
	脾臓 検査数	57	58	57	59	58	58	59	59
	血管炎/血管周囲炎	7	*1	2	4	7	6	5	3
	下垂体 検査数	60	60	59	59	60	58	60	60
	前葉過形成	34	*23	*22	25	22	*31	28	24
	細胞内褐色色素沈着	6	7	10	6	15	20	*25	18
	前立腺 検査数	60	60	60	59				
	腺房内鉍質沈着	44	*54	48	48				
	坐骨神経 検査数	60	58	60	60	60	60	60	60
	髄鞘線維変性	51	53	56	50	49	51	*57	50
	骨格筋 検査数	59	59	60	60	60	60	60	60
筋線維萎縮/変性	59	59	58	*54	58	59	59	59	
胃 検査数	60	60	58	60	60	60	60	59	
腺胃びらん	1	2	3	1	6	5	3	*0	
角化亢進	7	8	8	11	11	6	8	**2	
漿膜/混合細胞浸潤	3	4	1	4	5	3	2	*0	
顎下リンパ 検査数	60	59	60	60	60	59	59	59	
形質細胞増加	43	34	36	36	49	*37	46	45	
精巣 検査数	60	60	60	60					
精細管変性	25	23	16	20					
膀胱 検査数	58	59	57	59	57	59	56	60	
上皮下单核細胞浸潤	8	4	5	**0	12	10	12	14	
胸腺 検査数	51	58	58	59	60	57	58	59	
嚢胞性変化	9	7	10	*3	25	29	24	25	

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

主な非腫瘍性病変（続き）

検査時期	性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
	検査動物数	60	60	60	60	60	60	60	60
最終屠殺群 ・ 全動物	気管 検査数	60	60	59	60	60	60	59	60
	単核細胞浸潤	11	9	15	12	10	9	*19	6
	甲状腺 検査数	60	59	59	59	60	59	60	59
	コロイド変化	25	27	30	**48	2	4	**17	**29
	濾胞上皮細胞褐色色素沈着	11	8	14	15	4	1	6	*13
	嚢胞様濾胞	4	4	*12	7	6	11	9	8
	後嚢嚢胞	16	12	*6	16	9	9	15	17
	濾胞上皮細胞肥大	0	2	1	3	0	0	0	3
	子宮 検査数					60	59	60	60
	子宮角拡張					16	*7	9	10
	膾 検査数					60	59	57	60
	粘液分泌					39	43	*47	46
	萎縮					7	6	*1	4

* p≤0.05、** p≤0.01 (Fisher 検定 / 申請者により実施)

全ての腫瘍性病変

検査時期	性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
	検査動物数	10	10	10 [#]	10	10	10	10	10 [#]
中間屠殺群・全動物	回腸 検査数	10	1	0	10	10	0	0	9
	平滑筋肉腫[M]	0	1	0	0	0	0	0	0
	下垂体 検査数	10	2	0	10	9	0	2	9
	前葉腺腫 [B]	0	1	0	0	0	0	0	0
	皮下組織 検査数	10	1	0	10	10	1	0	9
	線維肉腫[M]	0	1	0	0	0	0	0	0
	脂肪腫[B]	1	0	0	0	0	0	0	0
	子宮 検査数					10	5	4	10
子宮内膜間質ポリープ[B]					0	1	0	1	

検査時期	性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
	検査動物数	10	10	10 [#]	10	10 [#]	10	10 [#]	10 [#]
回復群・全動物	乳腺 検査数	0	0	1	0	1	0	1	1
	腺腫[M]	0	0	0	0	0	0	1	0

#死亡・切迫屠殺動物を含む

[B] : 良性腫瘍

[M] : 悪性腫瘍

全ての腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
	検査動物数	41	36	39	36	31	23	17	17
最終屠殺群・死亡/屠殺動物	腹腔 検査数	2	1	0	1	0	0	0	0
	神経内分泌腫瘍[M]	1	0	0	0	0	0	0	0
	中皮腫[M]	0	1	0	2	0	0	0	0
	副腎 検査数	41	36	39	35	31	23	17	17
	褐色細胞腫[M]	1	0	0	0	0	0	0	0
	皮質：腺腫[B]	1	0	0	2	0	0	0	1
	褐色細胞腫[B]	3	0	0	0	0	1	0	0
	脳 検査数	41	36	38	36	31	22	17	17
	星状膠細胞腫[M]	0	0	0	3	0	0	0	0
	上衣細胞腫[M]	0	0	0	0	0	0	0	1
	顆粒細胞腫[B]	1	0	0	0	0	0	0	0
	陰核腺 検査数					1	0	0	0
	扁平上皮癌[M]					1	0	0	0
	十二指腸 検査数	31	30	28	28	29	20	15	14
	腺癌[M]	0	0	1	0	0	0	0	0
	耳 検査数	0	1	0	0	0	0	0	0
	神経堤腫瘍[B]	0	1	0	0	0	0	0	0
	精巣上体 検査数	41	36	39	36				
	シュワン細胞腫[M]	1	0	0	0				
	心臓 検査数	41	36	39	36	31	23	17	17
シュワン細胞腫[M]	1	1	0	0	0	1	0	0	
シュワン細胞腫[B]	0	0	1	0	0	1	0	0	
造血組織 検査数	41	36	39	36	31	23	17	17	
リンパ腫[M]	2	0	0	0	0	0	0	0	
組織球性肉腫[M]	0	0	3	2	2	0	0	0	
顆粒球性白血病[M]	0	0	0	0	0	0	1	0	
腎臓 検査数	41	36	39	36	31	23	17	17	
腎芽腫[M]	0	0	0	0	1	0	0	0	
血管肉腫[M]	1	0	1	0	0	0	0	0	
移行上皮乳頭腫[B]	0	0	0	0	0	1	0	0	
肝臓 検査数	41	36	39	36	31	23	17	17	
胆管癌[M]	1	0	0	0	0	0	0	0	
肝細胞腺腫[B]	0	0	0	1	0	0	1	0	
肺 検査数	41	36	38	36	31	23	17	17	
扁平上皮癌[M]	1	0	0	0	0	0	0	0	
細気管支-肺胞腺腫[B]	1	0	0	2	0	0	0	0	

[B]：良性腫瘍

[M]：悪性腫瘍

全ての腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
	検査動物数	41	36	39	36	31	23	17	17
最終屠殺群 ・ 死亡／屠殺動物	乳腺 検査数	40	35	35	33	31	23	17	17
	腺癌[M]	0	0	0	0	2	3	0	3
	線維腺腫内腺癌[M]	0	0	0	0	2	0	2	3
	混合腫瘍[M]	0	0	0	0	1	0	0	0
	線維腺腫[B]	0	0	0	0	7	6	4	1
	異型性線維腺腫[B]	0	0	1	0	6	3	1	1
	腺腫[B]	0	0	0	0	0	1	0	0
	鼻腔 検査数	1	1	0	0	0	0	0	0
	扁平上皮癌[M]	0	1	0	0	0	0	0	0
	卵巣 検査数					31	23	17	16
	顆粒膜細胞腫[B]					1	0	0	0
	脾臓 検査数	38	34	36	35	29	21	16	16
	脾島細胞癌[M]	1	0	0	0	0	0	0	0
	脾島細胞腺腫[B]	3	4	1	2	0	0	0	1
	腺房-脾島細胞腺腫[B]	0	0	0	1	0	0	0	0
	腺房細胞腺腫[B]	0	1	0	0	0	0	0	0
	上皮小体 検査数	39	34	37	36	31	19	15	17
	腺腫[B]	0	0	1	0	0	0	0	0
	下垂体 検査数	41	36	38	36	31	21	17	17
	前葉/癌[M]	0	0	0	0	1	0	0	0
前葉/腺腫[B]	15	14	17	10	18	15	10	11	
精囊 検査数	40	35	39	36					
腺腫[B]	0	0	0	1					
血管腫[B]	0	0	1	0					
骨格筋 検査数	40	35	39	36	31	23	17	17	
線維肉腫[M]	0	0	0	0	0	1	0	0	
皮膚 検査数	40	36	38	36	31	22	16	17	
基底細胞癌[M]	0	0	1	0	0	0	0	0	
角化棘細胞腫[B]	2	5	2	2	0	0	0	0	
皮脂腺腫[B]	0	0	1	0	0	0	0	0	
乳頭腫[B]	0	0	1	0	0	0	0	0	
脊髓 検査数	41	35	38	36	31	23	17	17	
骨肉腫[M]	0	1	0	0	0	0	0	0	
脾臓 検査数	41	36	38	36	31	23	17	16	
血管肉腫[M]	0	0	0	0	0	1	0	0	

[B] : 良性腫瘍

[M] : 悪性腫瘍

全ての腫瘍性病変（続き）

検査時期	性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
	検査動物数	41	36	39	36	31	23	17	17
最終屠殺群・死亡／屠殺動物	胃 検査数	41	36	37	36	31	23	17	16
	肉腫 NOS [M]	0	0	0	0	0	1	0	0
	扁平上皮乳頭腫[B]	1	0	0	0	1	0	0	0
	皮下組織 検査数	8	7	8	6	1	5	0	1
	線維肉腫[M]	4	5	4	2	1	1	0	0
	肉腫 NOS[M]	1	0	1	0	0	0	0	0
	シュワン細胞腫[M]	0	1	2	0	0	0	0	1
	骨肉腫[M]	0	0	1	0	0	0	0	0
	線維腫[B]	1	1	0	1	0	0	0	0
	脂肪腫[B]	0	0	1	0	0	0	0	0
	血管腫[B]	0	0	0	1	0	0	0	0
	精巣 検査数	41	36	39	36				
	間細胞腺腫[B]	0	0	1	0				
	胸腺 検査数	33	34	37	36	31	21	17	16
	胸腺腫[B]	1	2	1	0	0	2	0	2
	甲状腺 検査数	41	35	38	35	31	22	17	16
	濾胞上皮細胞癌[M]	0	0	0	1	0	0	0	0
	C細胞癌[M]	1	1	1	0	0	1	0	0
	濾胞上皮細胞腺腫[B]	0	0	0	1	0	0	0	0
	C細胞腺腫[B]	2	0	1	1	3	2	0	0
子宮 検査数					31	23	17	17	
子宮内膜腺癌[M]					0	1	0	0	
シュワン細胞腫[M]					1	0	0	1	
子宮内膜間質ポリープ[B]					7	3	4	3	
子宮内膜腺腫[B]					1	0	0	0	
膈 検査数					31	23	15	17	
シュワン細胞腫[M]					2	0	2	0	
顆粒細胞腫[B]					2	0	0	0	
外耳道皮脂腺 検査数	2	0	0	0	1	2	0	0	
扁平上皮癌[M]	2	0	0	0	1	1	0	0	
皮脂腺癌[M]	0	0	0	0	0	1	0	0	

[B]：良性腫瘍

[M]：悪性腫瘍

全ての腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
	検査動物数	19	24	21	24	29	37	43	43
最終屠殺群 ・ 計画屠殺動物	腹腔 検査数	1	0	0	2	0	0	1	0
	中皮腫[M]	1	0	0	0	0	0	0	0
	副腎 検査数	19	24	21	24	29	37	43	43
	皮質：腺腫[B]	0	0	1	0	1	1	1	1
	褐色細胞腫[B]	1	0	1	1	0	1	1	0
	骨 検査数	0	1	0	1	0	0	1	0
	骨肉腫[M]	0	1	0	0	0	0	0	0
	脳 検査数	19	24	21	24	29	37	43	43
	星状膠細胞腫[M]	1	1	0	0	0	1	0	0
	神経膠細胞腫 NOS [M]	0	0	0	0	1	0	0	0
	上衣細胞腫[M]	0	0	1	0	0	0	0	0
	稀突起膠細胞腫[M]	0	0	0	0	1	0	0	0
	顆粒細胞腫[B]	1	1	1	0	0	0	0	0
	松果体腫[B]	0	0	0	1	0	0	0	0
	耳 検査数	0	0	1	0	0	0	0	0
	神経堤腫瘍[B]	0	0	1	0	0	0	0	0
	眼 検査数	19	24	21	24	29	37	43	43
	平滑筋腫[B]	0	0	0	0	0	1	0	0
	心臓 検査数	19	24	21	24	29	37	43	43
	シュワン細胞腫[M]	0	0	0	1	0	0	0	0
シュワン細胞腫[B]	0	3	0	0	0	0	0	0	
造血組織 検査数	19	24	21	24	29	37	43	43	
リンパ腫[M]	0	1	0	0	2	0	0	0	
組織球性肉腫[M]	0	3	0	3	1	0	0	0	
空腸 検査数	19	24	21	24	29	37	43	43	
平滑筋腫[B]	0	0	0	0	0	1	3	1	
腎臓 検査数	19	24	21	24	29	37	43	43	
腎間葉腫瘍[M]	0	0	0	0	0	0	1	0	
血管肉腫[M]	0	0	0	0	0	0	1	0	
脂肪肉腫[M]	0	0	0	0	0	1	0	0	
血管腫[B]	0	0	0	0	0	0	0	1	
肝臓 検査数	19	24	21	24	29	37	43	43	
肝細胞癌[M]	1	1	0	0	0	0	1	0	
肝細胞腺腫[B]	1	1	0	1	0	2	4	4	

[B]：良性腫瘍

[M]：悪性腫瘍

全ての腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
	検査動物数	19	24	21	24	29	37	43	43
最終屠殺群 ・ 計画屠殺動物	肺 検査数	19	24	21	24	29	37	42	43
	神経内分泌腫瘍[B]	0	1	0	1	0	0	0	0
	乳腺 検査数	17	22	19	22	29	37	42	43
	腺癌[M]	0	0	0	0	2	3	2	2
	線維腺腫内腺癌[M]	0	0	0	0	0	9	5	2
	混合腫瘍[M]	0	0	0	0	0	0	0	1
	線維腺腫[B]	0	1	1	0	5	6	4	7
	異型性線維腺腫[B]	0	0	0	0	3	4	9	4
	腺腫[B]	0	0	0	0	0	1	0	1
	腸間膜リンパ 検査数	19	24	21	24	29	37	43	43
	血管腫[B]	0	0	0	0	1	0	0	0
	卵巣 検査数					29	37	43	43
	顆粒膜細胞腫[M]					0	0	0	1
	混合型性索間質腫瘍[M]					1	0	0	0
	管間質腺癌[M]					0	1	1	0
	混合型性索間質腫瘍[B]					1	0	1	1
	管間質腺腫[B]					2	1	1	7
	顆粒膜細胞腫[B]					0	1	0	0
	セルトリ細胞腫[B]					0	0	1	0
	脾臓 検査数	19	24	21	24	29	37	43	43
脾島細胞癌[M]	1	2	0	0	0	0	0	0	
脾島細胞腺腫[B]	1	3	5	4	1	3	1	1	
腺房-脾島細胞腺腫[B]	1	0	0	0	0	1	0	0	
腺房細胞腺腫[B]	3	2	2	0	0	0	0	0	
上皮小体 検査数	17	20	20	24	25	34	38	39	
腺腫[B]	0	0	0	0	0	0	0	1	
下垂体 検査数	19	24	21	23	29	37	43	43	
前葉/腺腫[B]	7	9	12	8	17	24	33	25	
前立腺 検査数	19	24	21	24					
腺腫[B]	0	1	2	1					
直腸 検査数	19	24	21	24					
顆粒細胞腫[B]	0	0	0	0	0	0	2	0	
唾液腺 検査数	0	0	0	0	0	0	0	1	
扁平上皮癌[M]	0	0	0	0	0	0	0	1	

[B] : 良性腫瘍

[M] : 悪性腫瘍

全ての腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
最終屠殺群 ・ 計画屠殺動物	検査動物数	19	24	21	24	29	37	43	43
	骨格筋 検査数	19	24	21	24	29	37	43	43
	顆粒細胞腫[B]	0	0	0	0	0	1	0	0
	皮膚 検査数	19	24	21	24	29	37	42	43
	角化棘細胞腫[B]	5	2	3	2	1	0	0	0
	毛包腫[B]	2	0	0	0	0	0	0	0
	血管腫[B]	0	0	1	0	0	0	0	0
	皮下組織 検査数	0	4	1	7	4	0	3	3
	線維肉腫[M]	0	2	1	3	2	1	1	0
	肉腫 NOS[M]	0	0	0	1	1	0	0	0
	骨肉腫[M]	0	0	0	0	0	0	1	0
	脂肪肉腫[M]	0	0	0	0	1	0	0	0
	線維腫[B]	0	0	0	2	0	0	1	1
	脂肪腫[B]	0	2	0	0	0	2	0	1
	血管腫[B]	0	0	1	0	0	0	0	0
	尾 検査数	1	1	0	1	0	0	0	0
	黒色腫[M]	0	1	0	0	0	0	0	0
	脊索腫[M]	0	1	0	0	0	0	0	0
	精巣 検査数	19	24	21	24				
	間細胞腺腫[B]	0	0	1	0				
	胸腺 検査数	18	24	21	23	29	36	41	43
	胸腺腫[B]	0	0	2	0	0	1	2	1
	甲状腺 検査数	19	24	21	24	29	37	43	43
	濾胞上皮細胞癌[M]	1	0	0	0	0	0	2	0
	C細胞癌[M]	0	0	0	0	0	2	2	0
	濾胞上皮細胞腺腫[B]	0	0	1	0	0	0	0	1
C細胞腺腫[B]	2	5	0	4	4	5	3	3	
子宮 検査数					29	36	43	43	
子宮内膜腺癌[M]					0	1	0	0	
シュワン細胞腫[M]					0	0	0	1	
子宮内膜間質ホリフ [B]					8	6	6	7	
子宮内膜/腺様ホリフ [B]					1	0	0	1	
子宮内膜腺腫[B]					0	0	1	0	
膣 検査数					29	36	43	43	
シュワン細胞腫[M]					0	0	0	1	
顆粒細胞腫[B]					2	1	2	1	
線維腫[B]					0	1	0	0	

[B]: 良性腫瘍

[M]: 悪性腫瘍

全ての腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
	検査動物数	60	60	60	60	60	60	60	60
最終屠殺群・全動物	腹腔 検査数	3	1	0	3	0	0	0	0
	神経内分泌腫瘍[M]	1	0	0	0	0	0	0	0
	中皮腫[M]	1	1	0	2	0	0	0	0
	副腎 検査数	60	60	60	59	60	60	60	60
	褐色細胞腫[M]	1	0	0	0	0	0	0	0
	皮質：腺腫[B]	1	0	1	2	1	1	1	2
	褐色細胞腫[B]	4	0	1	1	0	2	1	0
	骨 検査数	1	1	0	2	0	0	1	0
	骨肉腫[M]	0	1	0	0	0	0	0	0
	脳 検査数	60	60	59	60	60	59	60	60
	星状膠細胞腫[M]	1	1	0	3	0	1	0	0
	神経膠細胞腫 NOS[M]	0	0	0	0	1	0	0	0
	上衣細胞腫[M]	0	0	1	0	0	0	0	1
	稀突起膠細胞腫[M]	0	0	0	0	1	0	0	0
	顆粒細胞腫[B]	2	1	1	0	0	0	0	0
	松果体腫瘍[B]	0	0	0	1	0	0	0	0
	陰核腺 検査数					1	0	0	0
	扁平上皮癌[M]					1	0	0	0
	十二指腸 検査数	50	54	49	52	58	57	58	57
	腺癌[M]	0	0	1	0	0	0	0	0
	耳 検査数	0	1	1	0	0	0	0	0
	神経堤腫瘍[B]	0	1	1	0	0	0	0	0
	精巣上体 検査数	60	60	60	60				
	シュワン細胞腫[M]	1	0	0	0				
	眼 検査数	60	60	60	57	60	60	60	60
	平滑筋腫[B]	0	0	0	0	0	1	0	0
心臓 検査数	60	60	60	60	60	60	60	60	
シュワン細胞腫[M]	1	1	0	1	0	1	0	0	
シュワン細胞腫[B]	0	3	1	0	0	1	0	0	
造血組織 検査数	60	60	60	60	60	60	60	60	
リンパ腫 [M]	2	1	0	0	2	0	0	0	
組織球性肉腫[M]	0	3	3	*5	3	0	0	0	
顆粒球性白血病[M]	0	0	0	0	0	0	1	0	
回腸 検査数	50	50	50	50	56	56	58	56	
平滑筋肉腫[M]	0	0	0	0	0	0	0	0	

[B]：良性腫瘍

* p<0.05 (Fisher 検定 / 申請者により実施)

[M]：悪性腫瘍

全ての腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
	検査動物数	60	60	60	60	60	60	60	60
最終屠殺群・全動物	空腸 検査数	49	51	47	50	58	57	56	56
	平滑筋腫[B]	0	0	0	0	0	1	3	1
	腎臓 検査数	60	60	60	60	60	60	60	60
	腎間葉腫瘍[M]	0	0	0	0	0	0	1	0
	腎芽腫[M]	0	0	0	0	1	0	0	0
	血管肉腫[M]	1	0	1	0	0	0	1	0
	脂肪肉腫[M]	0	0	0	0	0	1	0	0
	移行上皮乳頭腫[B]	0	0	0	0	0	1	0	0
	血管腫[B]	0	0	0	0	0	0	0	1
	肝臓 検査数	60	60	60	60	60	60	60	60
	肝細胞癌[M]	1	1	0	0	0	0	1	0
	胆管癌[M]	1	0	0	0	0	0	0	0
	肝細胞腺腫[B]	1	1	0	2	0	2	*5	4
	肺 検査数	60	60	60	60	60	60	60	60
	扁平上皮癌[M]	1	0	0	0	0	0	0	0
	神経内分泌腫瘍[B]	0	1	0	1	0	0	0	0
	細気管支-肺胞腺腫[B]	1	0	0	2	0	0	0	0
	乳腺 検査数	57	57	54	55	60	60	59	60
	腺癌[M]	0	0	0	0	4	6	2	5
	線維腺腫内腺癌[M]	0	0	0	0	2	*9	7	5
	混合腫瘍[M]	0	0	0	0	1	0	0	1
	線維腺腫[B]	0	1	1	0	12	12	8	8
	異型性線維腺腫[B]	0	0	1	0	9	7	10	5
	腺腫[B]	0	0	0	0	0	2	0	1
腸間膜リンパ 検査数	60	60	60	60	59	60	60	60	
血管腫[B]	0	0	0	0	1	0	0	0	
鼻腔 検査数	1	1	0	0	0	0	0	0	
扁平上皮癌[M]	0	1	0	0	0	0	0	0	
卵巣 検査数					60	60	60	59	
顆粒膜細胞腫[M]					0	0	0	1	
混合型性索間質腫瘍[M]					1	0	0	0	
管間質腺癌[M]					0	1	1	0	
混合型性索間質腫瘍[B]					1	0	1	1	

[B] : 良性腫瘍

* p<0.05 (Fisher 検定 / 申請者により実施)

[M] : 悪性腫瘍

全ての腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
	検査動物数	60	60	60	60	60	60	60	60
最終屠殺群・全動物	卵巣 検査数					60	60	60	59
	管間質腺腫[B]					2	1	1	7
	顆粒膜細胞腫[B]					1	1	0	0
	セルトリ細胞腫[B]					0	0	1	0
	膵臓 検査数	57	58	57	59	58	58	59	59
	腺房細胞腺癌[M]	0	0	0	0	0	0	0	0
	膵島細胞癌[M]	2	2	0	0	0	0	0	0
	膵島細胞腺腫[B]	4	7	6	6	1	3	1	2
	腺房-膵島細胞腺腫[B]	1	0	0	1	0	1	0	0
	腺房細胞腺腫[B]	3	3	2	0	0	0	0	0
	上皮小体 検査数	56	54	57	60	56	53	53	56
	腺腫[B]	0	0	1	0	0	0	0	1
	下垂体 検査数	60	60	59	59	60	58	60	60
	前葉/癌[M]	0	0	0	0	1	0	0	0
	前葉/腺腫[B]	22	23	29	18	35	39	43	36
	前立腺 検査数	60	60	60	59				
	腺腫[B]	0	1	2	1				
	直腸 検査数	56	58	59	60	59	59	59	60
	顆粒細胞腫[B]	0	0	0	0	0	0	2	0
	唾液腺 検査数	0	0	0	0	0	0	0	1
	扁平上皮癌[M]	0	0	0	0	0	0	0	1
	精囊 検査数	59	59	60	60				
	腺腫[B]	0	0	0	1				
血管腫[B]	0	0	1	0					
骨格筋 検査数	59	59	60	60	60	60	60	60	
線維肉腫[M]	0	0	0	0	0	1	0	0	
顆粒細胞腫[B]	0	0	0	0	0	1	0	0	
皮膚 検査数	59	60	59	60	60	59	58	60	
基底細胞癌[M]	0	0	1	0	0	0	0	0	
角化棘細胞腫[B]	7	7	5	4	1	0	0	0	
皮脂腺腫[B]	0	0	1	0	0	0	0	0	
乳頭腫[B]	0	0	1	0	0	0	0	0	
毛包腫[B]	2	0	0	0	0	0	0	0	
血管腫[B]	0	0	1	0	0	0	0	0	

[B] : 良性腫瘍 (Fisher 検定 / 申請者により実施)
 [M] : 悪性腫瘍

全ての腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
最 終 屠 殺 群 ・ 全 動 物	検査動物数	60	60	60	60	60	60	60	60
	脊髄 検査数	60	59	59	60	60	60	60	60
	骨肉腫 [M]	0	1	0	0	0	0	0	0
	脾臓 検査数	60	59	59	60	60	60	60	59
	血管肉腫 [M]	0	0	0	0	0	1	0	0
	胃 検査数	60	60	58	60	60	60	60	59
	肉腫 NOS [M]	0	0	0	0	0	1	0	0
	扁平上皮乳頭腫 [B]	1	0	0	0	1	0	0	0
	皮下組織 検査数	8	11	9	13	5	5	3	4
	線維肉腫 [M]	4	7	5	5	3	2	1	0
	肉腫 NOS [M]	1	0	1	1	1	0	0	0
	シュワン細胞腫 [M]	0	1	2	0	0	0	0	1
	骨肉腫 [M]	0	0	1	0	0	0	1	0
	脂肪肉腫 [M]	0	0	0	0	1	0	0	0
	線維腫 [B]	1	1	0	3	0	0	1	1
	脂肪腫 [B]	0	2	1	0	0	2	0	1
	血管腫 [B]	0	0	1	1	0	0	0	0
	尾 検査数	2	1	2	4	0	0	0	0
	黒色腫 [M]	0	1	0	0	0	0	0	0
	脊索腫 [M]	0	1	0	0	0	0	0	0
精巣 検査数	60	60	60	60					
間細胞腺腫 [B]	0	0	2	0					
胸腺 検査数	51	58	58	59	60	57	58	59	
胸腺腫 [B]	1	2	3	0	0	3	2	3	
甲状腺 検査数	60	59	59	59	60	59	60	59	
濾胞上皮細胞癌 [M]	1	0	0	1	0	0	2	0	
C細胞癌 [M]	1	1	1	0	0	3	2	0	
濾胞上皮細胞腺腫 [B]	0	0	1	1	0	0	0	1	
C細胞腺腫 [B]	4	5	1	5	7	7	3	3	
子宮 検査数					60	59	60	60	
子宮内膜腺癌 [M]					0	2	0	0	
シュワン細胞腫 [M]					1	0	0	2	
子宮内膜間質ホリフ [B]					15	9	10	10	
子宮内膜/腺様ホリフ [B]					1	0	0	1	
子宮内膜腺腫 [B]					1	0	1	0	

[B] : 良性腫瘍

Fisher 検定 / 申請者により実施)

[M] : 悪性腫瘍

全ての腫瘍性病変（続き）

検査時期	性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
	検査動物数	60	60	60	60	60	60	60	60
最終屠殺群・全動物	腫 検査数					60	59	57	60
	シュワン細胞腫[M]					2	0	2	1
	顆粒細胞腫[B]					4	1	2	1
	線維腫[B]					0	1	0	0
	外耳道皮脂腺 検査数	2	0	0	0	1	2	0	0
	扁平上皮癌[M]	2	0	0	0	1	1	0	0
皮脂腺癌[M]	0	0	0	0	0	1	0	0	

[B] : 良性腫瘍 (Fisher 検定 / 申請者により実施)

[M] : 悪性腫瘍

腫瘍数のまとめ

性別		雄				雌			
用量 (ppm)		0	100	2000	7000	0	100	2000	7000
検査動物数		60	60	60	60	60	60	60	60
腫瘍数	良性	46	51	58	41	66	67	65	60
	悪性	23	24	17	18	27	31	22	18
総腫瘍数		69	75	75	59	93	98	87	78
担腫瘍動物数	良性	40	39	42	32	47	51	52	49
	悪性	22	20	17	16	24	24	17	15
担腫瘍動物数		47	46	49	40	53	55	54	53

(3) マウスを用いた発がん性試験

(資料 No. 原体-18)

試験機関：

[GLP]

報告書作成年：2009年

純度： %

供試動物：C57BL/6J系マウス

1群雌雄各60匹（最終屠殺1群雌雄各50匹、中間屠殺1群雌雄各10匹）
投与開始時7週齢

投与期間：最終屠殺群 約18ヶ月（2007年3月20日～2008年10月6日）

中間屠殺群 約12ヶ月（2007年3月20日～2008年3月26日）

投与方法：検体を0、100、1000および6000ppmの濃度で飼料に混入し、投与期間全般にわたり随時摂取させた。飼料は7あるいは8週毎に調製した。

用量設定根拠：

観察・検査項目および結果：

一般状態および死亡率：全ての動物について毎日2回（週末および休日は1回）、生死および瀕死状態について確認し、毎日1回、一般状態について観察した。また、触診を含む詳細な検査を試験80週までは毎週1回実施し、その後は毎日観察した。

一般状態について雌雄共に全ての群で差異は認めなかった。

また、対照群と比較していずれの用量でも投与に関連した死亡率の増加は認められなかった。

投与53週および試験終了時における死亡率を次の表に示す。

表. 53 週までの死亡率 (全動物)

性	雄				雌			
	0	100	1000	6000	0	100	1000	6000
用量 (ppm)	0	100	1000	6000	0	100	1000	6000
検査動物数	60	60	60	60	60	60	60	60
死亡数 (死亡率 %)	6 (10)	5 (8.3)	2 (3.3)	1 (1.7)	3 (5.0)	3 (5.0)	3 (5.0)	3 (5.0)

表. 最終屠殺動物における死亡率

性	雄				雌			
	0	100	1000	6000	0	100	1000	6000
用量 (ppm)	0	100	1000	6000	0	100	1000	6000
検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50
死亡数 (死亡率 %) [#]	15 (28)	13 (26)	8 (16)	5 (10)	6 (12)	8 (16)	4 (8)	5 (8)

[#] 試験打ち切り動物について調整後に Kaplan-Meier 法で推定した試験終了時の死亡率

体重 ; 各動物について馴化期間中は 3 および 10 日目に、投与開始後 13 週間は毎週 1 回、その後は 4 週間毎に体重を測定した。さらに剖検前(一晚絶食後)にも測定し、最終体重とした。

6000ppm の雌で、試験開始直後の 2 週間 (8 および 15 日目) の累積体重増加量が対照に比べてわずかに有意 ($p \leq 0.05$ または $p \leq 0.01$) に低かった。

その他に観察された統計学的有意差は、散発的に観察されたが、投与群での値の方が大きかったため、投与に関連した影響を反映したものではないと考えられた。また、投与終了時にはこれらのパラメータに対する明らかな影響は見られなかった。

統計学的有意差を認めた体重推移を次の表に示す。

表. 平均体重

性別 用量(ppm)	雄			雌		
	100	1000	6000	100	1000	6000
4週目 (22日目)				↑102	↑102	
5週目 (29日目)				↑103		
7週目 (43日目)			↓96		↓96	↓95
10週目 (64日目)						↓98
13週目 (85日目)						↓98
18週目 (120日目)						↓98
30週目 (204日目)	↑103					
50週目 (344日目)			↓97			
54週目 (372日目)		↓97	↓97			
58週目 (400日目)		↓98				
78週目 (540日目)	102	100	97	99	98	98

数値は対照群に対する割合

↑ ↓ p≤0.05、↓ p≤0.01

(Bartlett, Kruskal-Wallis または ANOVA + Dunn または Dunnett 検定)

表. 累積体重増加量

性別 用量(ppm)	雄			雌		
	100	1000	6000	100	1000	6000
1~2週目 (1~8日目)	115	92	92	118	118	↓73
1~3週目 (1~15日目)	↑120	110	100	96	96	↓83
1~14週目 (1~92日目)	107	102	103	100	96	93
14~26週目 (92~176日目)	100	72	94	120	130	130
26~54週目 (176~372日目)	94	↓71	↓59	↓78	104	91
54~78週目 (372~540日目)	75	↑250	125	87	↓60	80
1~78週目 (1~540日目)	105	100	94	95	95	93

数値は対照群に対する割合

↑ ↓ p≤0.05、↑ ↓ p≤0.01

(Bartlett, Kruskal-Wallis または ANOVA + Dunn または Dunnett 検定)

摂餌量；与えた飼料の重量と摂取期間の終了時に残っている飼料重量を記録した。

摂餌量は投与開始13週までは週1回、その後は4週に1回記録した。

試験期間を通して、摂餌量に対する投与の影響はみられなかった。

検体摂取量；各群の検体摂取量は以下の通りであった。

投与量(ppm)		100	1000	6000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	14.3	146	880
	雌	18.4	182	1101

血液学的検査；投与 54 または 55 週目（約 13 ヶ月）に中間屠殺群の全生存動物および最終屠殺群の生存動物から各群雌雄 10 匹（動物番号の若い 10 匹）から、また、80 週目（約 19 ヶ月）の最終屠殺群の生存動物から各群雌雄 20 匹（動物番号の若い 20 匹）についてイソフラン麻酔下で後眼窩静脈叢への穿刺により EDTA 処理した試験管に血液を採取し、以下の項目を検査した。
動物は採血前夜絶食させた。

ヘマトクリット (Ht)、ヘモグロビン (Hb)、白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、血小板数 (PLT)、平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)、平均赤血球容積 (MCV)、白血球百分率

6000ppm では雄で中間屠殺および最終屠殺時の MCV および MCH が、また雌では最終屠殺時の MCH が有意に高かった。最終屠殺時ではまた雌雄で MCHC が有意に高かった。1000ppm 雄の最終屠殺時の MCHC も有意に高かった。しかし、いずれの変動も対照に比してわずかな差であるため、毒性学的に意味のあるものとは考えられなかった。また、雄 1000ppm および 6000ppm の中間屠殺時の検査で WBC とリンパ球が有意に低かったが一過性のものであり、有害な影響とは思われなかった。

表. 血液学的検査結果

性別	雄						雌					
	100		1000		6000		100		1000		6000	
投与量 (ppm)	13	19	13	19	13	19	13	19	13	19	13	19
検査時期 (月)												
MCV					↑ 104	▲ 102						
MCH					▲ 103	▲ 105						▲ 106
MCHC				↑ 101		▲ 102						↑ 103
WBC			↓ 70		▼ 64							
リンパ球			↓ 74		▼ 63							

表中の数値は対照群に対する割合 (%)

↑ ↓ p ≤ 0.05、▲ ▼ p ≤ 0.01

(Bartlett, Kruskal-Wallis または ANOVA + Dunn または Dunnett 検定)

屠殺および剖検；中間屠殺群（12 ヶ月目）、最終屠殺群（18 ヶ月目）について全ての生存動物を屠殺前夜絶食させ、イソフラン吸入による深麻酔下放血致死させた。全動物について剖検して、主要臓器、組織および体腔を検査し、肉眼的異常所見を記録した。

臓器重量；計画屠殺動物について以下の組織の重量を測定した。また、対体重比および対脳重量比も求めた。

肝臓、心臓、脾臓、腎臓、精巣、精巣上体、卵巣、子宮(子宮頸部を含む)、脳、副腎

中間（12ヶ月）屠殺群；最終体重に投与に関連した変化は見られなかった。

6000ppm において雄の肝実重量が、雌雄で肝対体重比が対照に比べて統計学的に有意に高かった。

100ppm 雌の腎対体重比、6000ppm 雌の腎臓の実重量および対体重比、対脳重量比が有意に低かった。しかし、最終屠殺群で腎臓に検体投与に関連した組織学的変化が観察されなかったことから偶発的なものと考えられた。

最終（18ヶ月）屠殺群；最終体重に投与に関連した変化は見られなかった。

6000ppm の雌雄において、肝臓の実重量および対体重・脳重量比が対照に比べて統計学的に有意に高かった。

上記した以外に認めた統計学的に有意な変化は用量依存性がないか、関連する組織学的所見を伴わなかったため、偶発的なものと考えられた。

統計学的に有意差を認めた臓器重量を以下の表に示した。

表. 臓器重量の変化

性別		雄						雌					
		100		1000		6000		100		1000		6000	
投与量 (ppm)		12	18	12	18	12	18	12	18	12	18	12	18
肝臓	実重量					↑111	▲119						▲123
	対体重比					▲109	▲120					▲121	▲124
	対脳重量比						▲119						▲124
腎臓	実重量									▼91	▼84	▼93	
	対体重比							▼93		▼91	▼88	▼95	
	対脳重量比									▼90	▼86	▼94	
心臓	実重量						▼94						
脾臓	実重量						▼75						
	対体重比						▼76						
	対脳重量比						▼75						

表中の数値は対照群に対する割合 (%)

↑ ↓ p<0.05、▲ ▼ p<0.01

(Bartlett, Kruskal-Wallis または ANOVA + Dunn または Dunnett 検定)

肉眼的病理検査：全動物について剖検して、主要臓器、組織および体腔を検査し、肉眼的異常所見を記録した。

中間（12ヶ月）屠殺群；途中死亡動物に投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

計画屠殺 6000ppm では、雌雄において肝肥大の発生率がわずかに高く、また、雌においては肝臓の蒼白化もわずかに多く観察された。

最終屠殺群（18ヶ月）；途中死亡動物に投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

計画屠殺動物では肝肥大が雌で対照群を含む全ての群で認められ、全ての投与群で統計学的有意であった。雄では6000ppmで2例のみに認められた。雌100ppmおよび1000ppmでの肝肥大は肝重量に有意な変化がなく、病理組織学的検査でも有害影響所見をみない事から有害な影響とは思われなかった。

雄では対照群を含む全ての投与群で肝臓に結節/腫瘤が認められたがその発生数は多くなく、有意差も認めなかった。

6000 ppm 雌では、甲状腺肥大の発生数がわずかに多く、統計学的に有意であった。

その他の変化は偶発的なもので、検体投与とは関係しないものと考えられた。

表. 計画屠殺動物の主な肉眼的病理所見

性別		雄				雌			
		0	100	1000	6000	0	100	1000	6000
用量 (ppm)		0	100	1000	6000	0	100	1000	6000
中間屠殺	動物数	8	10	10	10	8	10	8	9
	肝：肥大	0	0	0	2	2	1	3	6
	肝：蒼白	0	1	1	1	1	0	0	3
最終屠殺	動物数	35	37	42	45	44	42	46	45
	肝：肥大	0	0	0	2	5	*12	*15	**33
	肝：結節/腫瘤	2	3	3	5	0	0	1	1
	甲状腺：肥大	1	0	0	2	1	2	2	**9

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

病理組織学的検査：全動物について以下の臓器および組織を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンに浸漬して固定した。眼、視神経、ハーダー腺、精巣上体および精巣はダビドソン液に固定した。摘出臓器は眼窩外涙腺、喉頭/咽頭および鼻腔を除いて全てパラフィン包埋し、最終屠殺群の動物について、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して病理組織学的に検査した。

舌、顎下腺、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、肝臓、胆嚢、膵臓、気管、肺、鼻腔、咽頭、喉頭、胸部大動脈、心臓、骨髓（胸骨）、腸間膜リンパ節、下顎リンパ節、脾臓、胸腺、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣、子宮（頸部を含む）、乳腺、膣、脳、座骨神経、脊椎（頸部、胸部、腰部）、眼（網膜）、視神経、下垂体、副腎、眼窩外涙腺、上皮小体、甲状腺、ハーダー腺、骨（胸骨）、骨格筋、皮膚、関節面（大腿脛骨関節）、肉眼的病変部および腫瘤

最終屠殺群の検査結果を計画屠殺および計画外死亡を併せて示す。

非腫瘍性所見

6000 ppm において、雌雄で小葉中心性肝細胞肥大の発生が有意に認められ、その程度も用量に関連して認められた。更に雌では、主に門脈周囲性の肝細胞巨大空胞化の発生数が統計学的に有意で、その程度も高かった。また、雄はびまん性の肝細胞空胞化が有意に多かった。

1000ppm および 100ppm では、雌雄で小葉中心性肝細胞肥大が統計学的に有意（雌 100ppm を除く）に認められた。しかし、1000 ppm および 100ppm での変化はその程度は低く、肝重量の増加なども伴っていなかった。また、その他有意な肝所見を認めないことから有害な影響ではないと考えられた。

申請者注) 雄 1000ppm および 6000ppm で脾臓に髄外造血が有意 ($p < 0.05$) に認められているが、対照群と比べても僅かな発生率（対照群 86% に対し、いずれの群も 98%）の差であり、血液学的検査でも明らかな変化を認めないことから、意義のあるものとは考えられなかった。

雌雄で肝変異細胞巣（好酸性、好塩基性および空胞化変異細胞巣）が散見されたが用量に関連した増加も統計学的な有意差も認めなかった。

表. 肝臓の主な非腫瘍性所見

性別		雄				雌			
投与用量 (ppm)		0	100	1000	6000	0	100	1000	6000
検査数		48	49	49	48	50	50	50	50
肝細胞肥大 : 小葉中心性	軽微	0	9	17	2	0	2	4	20
	軽度	0	3	9	15	0	1	1	10
	中等度	0	1	3	29	0	0	0	1
	合計	0	**13	**29	***46	0	3	*5	**31
肝細胞巨大空胞化 : 主に門脈周囲性	軽微	0	0	1	1	11	8	7	9
	軽度	0	0	0	0	3	3	0	22
	中等度	0	0	0	0	0	0	0	10
	合計	0	0	1	1	14	11	7	**41
肝細胞空胞化 : びまん性	軽微	8	10	7	13	16	7	14	12
	軽度	2	2	4	6	20	24	16	18
	中等度	0	0	1	0	2	9	14	14
	合計	10	12	12	*19	38	40	44	44
好酸性変異細胞巣		0	1	0	1	0	1	0	0
好塩基性変異細胞巣		0	1	4	2	0	0	0	0
空胞化変異細胞巣		0	0	1	0	0	0	0	0

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Fisher 検定)

雌 6000ppm においてのみ甲状腺濾胞細胞過形成の発生が統計学的有意に認められ、その程度も高かった。

表. 甲状腺の主な非腫瘍性所見

性別		雄				雌			
投与用量 (ppm)		0	100	1000	6000	0	100	1000	6000
検査数		49	50	49	50	50	48	50	50
濾胞細胞過形成 : 単状/多巢性	軽微	0	1	0	2	16	13	19	18
	軽度	0	1	0	0	6	3	6	16
	中等度	0	0	0	0	1	1	1	2
	強度	0	0	0	0	0	0	2	2
	合計	0	2	0	2	23	17	26	**38

** p<0.01 (Fisher 検定)

6000 ppm では、雌雄共に特に消化器系および胃腸管へのアミロイド沈着の発生率が高い傾向があった。しかし、アミロイド沈着は C57BL/6J マウスに高い発生率で自然発生することが知られており、検体投与とは関係しないものと考えられた^{注)}。

注) 申請者注

アミロイド沈着所見を認めた動物の発生数を申請者が以下の表にまとめた。アミロイド沈着所見を認めた動物の発生数に投与量と関連した増加はなく、統計学的にも有意差を認めないことから、上記のとおりアミロイド沈着は、検体投与とは関係しないものと考えられる。

アミロイド沈着所見を認めた動物数

性別		雄				雌			
投与用量 (ppm)		0	100	1000	6000	0	100	1000	6000
全動物	動物数	50	50	50	50	50	50	50	50
	アミロイド沈着	46	48	49	48	50	49	49	48
計画屠殺	動物数	35	37	42	45	44	42	46	45
	アミロイド沈着	34	37	42	45	44	42	46	45
死亡・切迫	動物数	15	13	8	5	6	8	4	5
	アミロイド沈着	12	11	7	3	6	7	3	3

(Fisher 検定 / 申請者により実施)

腫瘍性所見

対照群での発生数と比較したとき全投与群の雄で、肝腫瘍（腺腫および癌）の発生数がわずかに多かった（有意差なし）。しかし、これらの腫瘍性所見は、用量に関係した影響は見られず、前腫瘍性変化の発生率上昇も伴っていなかった。肝細胞腺腫の雄の最高濃度 6000ppm での発生数は 48 例中 5 例で、試験施設における背景対照データ（HCD）の と近似していた。

肝細胞癌では雄 1000ppm および 6000ppm での発生数が対照に比べてわずかに多かったが、雄のこれらの群では対照群に比べて動物の生存率が高かった事に関連するものと考えられた。したがって、対照群での発生数に比べて投与群でわずかに多かった肝腫瘍の発生は検体の投与とは関係しないものと考えられた。

雌では、肝腫瘍が増加する傾向は見られなかった。

肝腫瘍の発生数を以下に示した。

表. 肝臓の主な腫瘍性所見の発生数

性別 投与用量 (ppm)	雄					雌				
	0	100	1000	6000	HCD	0	100	1000	6000	HCD
動物数	48	49	49	48		50	50	50	50	
肝細胞腺腫 (%)	1 (2.1)	5 (10.2)	1 (2.0)	4 (8.3)	(0-8.0)	1 (2.0)	0 (0.0)	1 (2.0)	0 (0.0)	
肝細胞癌 (%)	1 (2.1)	1 (2.0)	3 (6.1)	3 (6.3)	(0-0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (2.0)	
合計	2	5 ^a	4	5 ^b		1	0	1	1	

(Fisher 検定 / 申請者により実施)

^a 1 例の動物は腺腫および癌を持つ

^b 2 例の動物は腺腫および癌を持つ

申請者注)

尚、表 3 に示したように、担腫瘍動物数や腫瘍発生数、また良性および悪性別での腫瘍発生について、対照群と検体投与群の間に差は認められない。

6000ppm においては雌で試験開始初期の体重増加がわずかに低かった。剖検時は雌雄共に肝肥大が認められ、肝重量が統計学的に有意に高かった。最終屠殺動物では雌で甲状腺肥大が観察された。また、肝および甲状腺の変化に一致して肝細胞肥大、肝細胞空胞化、甲状腺濾胞細胞過形成などの病理組織学的所見も認められた。

1000 および 100ppm においては、投与による有害な影響は認められなかった。

以上、C57BL/6J マウスへ18ヶ月間にわたり検体を混餌投与したが、最高濃度 6000 ppm（雄：880 mg/kg 体重/日、雌：1101 mg/kg 体重/日）までの用量において発がん性を示さなかった。

また、無毒性量は、雌雄ともに 1000 ppm（雄：146 mg/kg/日、雌：182 mg/kg/日）であると結論した。

表 1-1 主な非腫瘍性病変

検査時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	100	1000	6000	0	100	1000	6000
	検査動物数	15	13	8	5	6	8	4	5
死亡・切迫	脳 検査数	15	13	8	5	6	8	4	5
	視床鉾質沈着	2	1	0	0	0	0	0	0
	盲腸 検査数	15	11	5	5	5	6	3	4
	アミロイド沈着	0	1	0	0	0	1	0	1
	結腸 検査数	13	12	6	3	6	8	4	4
	アミロイド沈着	0	1	0	0	0	1	0	1
	十二指腸 検査数	12	12	6	3	6	7	4	4
	アミロイド沈着	2	0	1	1	0	2	3	0
	心臓 検査数	15	13	8	5	6	8	4	5
	アミロイド沈着	5	3	3	1	1	2	1	2
	弁膜アミロイド沈着	5	3	2	1	0	0	1	0
	心筋変性	2	4	2	0	1	1	1	0
	空腸 検査数	13	14	6	3	6	8	4	4
	アミロイド沈着	3	5	0	0	1	1	1	2
	腎臓 検査数	15	13	8	5	6	8	4	5
	好塩基性尿細管	3	0	2	0	0	1	1	2
	間質単核細胞浸潤	2	1	4	0	1	0	1	1
	慢性腎症	0	0	1	0	0	1	0	0
	肝臓 検査数	13	12	7	3	6	8	4	5
	好酸性変異細胞巢 巢状/多巢性	0	0	0	0	0	1	0	0
好塩基性変異細胞巢 巢状/多巢性	0	0	0	0	0	0	0	0	
空胞化変異細胞巢 巢状/多巢性	0	0	0	0	0	0	0	0	
肝細胞肥大 /小葉中心性	0	0	1	1	0	1	0	1	
肝細胞空胞化 /びまん性	0	0	1	0	1	0	0	2	
肝細胞巨大空胞化 /門脈周囲性	0	0	0	0	0	0	0	2	
アミロイド沈着	1	0	1	0	1	1	0	2	

表 1-1 主な非腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	100	1000	6000	0	100	1000	6000
	検査動物数	15	13	8	5	6	8	4	5
死亡・切迫	腸間膜リンパ節 検査数	12	8	5	2	6	6	3	4
	マクロファージ沈着	2	4	3	0	2	0	1	3
	上皮小体 検査数	14	8	6	5	4	5	1	5
	マクロファージ沈着	3	3	2	1	1	2	0	2
	下垂体 検査数	12	10	8	5	5	8	4	4
	前葉/嚢胞・偽性嚢胞	2	2	1	1	0	1	1	0
	直腸 検査数	13	11	6	5	6	8	4	4
	マクロファージ沈着	0	1	0	0	0	1	1	0
	脾臓 検査数	14	11	6	4	6	8	4	4
	髄外造血	10	10	5	3	5	7	3	4
	ヘモジデリン沈着増加	9	8	6	3	5	7	3	3
	顎下腺 検査数	15	13	8	5	6	8	4	5
マクロファージ沈着	2	1	2	0	0	1	1	2	
精巣 検査数	14	13	8	5					
マクロファージ沈着	0	0	0	0					
甲状腺 検査数	15	13	8	5	6	8	4	5	
濾胞細胞過形成	0	1	0	0	1	1	3	5	
子宮 検査数					6	7	3	5	
内膜(嚢胞状)過形成					5	1	1	3	
マクロファージ沈着					5	3	1	3	

表 1-2 主な非腫瘍性病変

検査時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	100	1000	6000	0	100	1000	6000
	検査動物数	35	37	42	45	44	42	46	45
最終屠殺	脳 検査数	35	37	42	45	44	42	46	45
	視床鉉質沈着	9	6	4	5	8	4	1	1
	盲腸 検査数	35	37	42	45	44	42	46	45
	アミロイド沈着	27	36	38	42	43	39	44	45
	結腸 検査数	35	37	42	45	44	42	46	45
	アミロイド沈着	25	29	29	36	32	33	36	39
	十二指腸 検査数	35	37	42	45	44	42	46	45
	アミロイド沈着	13	20	16	21	20	15	25	30
	心臓 検査数	35	37	42	45	44	42	46	45
	アミロイド沈着	32	33	38	41	32	36	39	43
	弁膜アミロイド沈着	11	8	5	11	4	3	5	5
	心筋変性	0	4	3	4	2	4	3	0
	空腸 検査数	35	37	42	45	44	42	46	45
	アミロイド沈着	4	1	1	5	3	0	1	6
	腎臓 検査数	35	37	42	45	44	42	46	45
	好塩基性尿細管	12	4	5	8	14	14	9	12
	間質単核細胞浸潤	9	10	8	4	19	11	18	15
慢性腎症	8	5	6	2	1	0	3	0	
肝臓 検査数	35	37	42	45	44	42	46	45	
好酸性変異細胞巢 巢状/多巢性	0	1	0	1	0	0	0	0	
好塩基性変異細胞巢 巢状/多巢性	0	1	4	2	0	0	0	0	
空胞化変異細胞巢 巢状/多巢性	0	0	1	0	0	0	0	0	
肝細胞肥大 /小葉中心性	0	13	28	45	0	2	5	30	
肝細胞空胞化 /びまん性	10	12	11	19	37	40	44	42	
肝細胞巨大空胞化 /門脈周囲性	0	0	1	1	14	11	7	39	
アミロイド沈着	24	21	25	15	13	11	11	22	

表 1-2 主な非腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	100	1000	6000	0	100	1000	6000
	検査動物数	35	37	42	45	44	42	46	45
最終屠殺	腸間膜リンパ節 検査数	35	37	41	45	44	39	44	44
	アミロイド沈着	20	28	33	30	32	32	32	37
	上皮小体 検査数	25	32	34	37	36	33	38	34
	アミロイド沈着	18	23	21	30	27	26	36	33
	下垂体 検査数	35	37	42	45	44	41	46	45
	前葉/嚢胞・偽性嚢胞	21	17	14	23	5	6	3	4
	直腸 検査数	35	37	42	44	42	42	46	45
	アミロイド沈着	17	15	20	30	24	29	30	40
	脾臓 検査数	35	37	42	45	44	42	46	45
	髄外造血	32	33	42	45	42	39	42	40
	ヘモジデリン沈着増加	31	28	40	42	41	42	41	42
	顎下腺 検査数	35	37	42	45	44	42	46	45
アミロイド沈着	8	9	8	6	10	11	17	25	
精巣 検査数	35	37	42	45					
アミロイド沈着	12	13	24	16					
甲状腺 検査数	34	37	41	45	44	40	46	45	
濾胞細胞過形成	0	1	0	2	22	16	23	35	
子宮 検査数					44	42	45	45	
内膜(嚢胞状)過形成					41	37	38	37	
アミロイド沈着					31	36	40	41	

表 1-3 主な非腫瘍性病変

検査時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	100	1000	6000	0	100	1000	6000
	検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50
全動物	脳 検査数	50	50	50	50	50	50	50	50
	視床鉍質沈着	11	7	*4	5	8	4	*1	*1
	盲腸 検査数	50	48	47	50	49	48	49	49
	アミロイド [*] 沈着	27	*37	**38	**42	43	40	44	46
	結腸 検査数	48	49	48	48	50	50	50	49
	アミロイド [*] 沈着	25	30	29	*36	32	34	36	*40
	十二指腸 検査数	47	49	48	48	50	49	50	49
	アミロイド [*] 沈着	15	20	17	22	20	17	28	*30
	心臓 検査数	50	50	50	50	50	50	50	50
	アミロイド [*] 沈着	37	36	41	42	33	38	40	**45
	弁膜アミロイド [*] 沈着	16	11	*7	12	4	3	6	5
	心筋変性	2	*8	5	4	3	5	4	0
	空腸 検査数	48	49	48	48	50	50	50	49
	アミロイド [*] 沈着	7	6	*1	5	4	1	2	8
	腎臓	50	50	50	50	50	50	50	50
	好塩基性尿細管	15	*4	*7	8	14	15	10	14
	間質単核細胞浸潤	11	11	12	*4	20	*11	19	16
	慢性腎症	8	5	7	*2	1	1	3	0
	肝臓 検査数	48	49	49	48	50	50	50	50
	好酸性変異細胞巢 巢状/多巢性	0	1	0	1	0	1	0	0
好塩基性変異細胞巢 巢状/多巢性	0	1	4	2	0	0	0	0	
空胞化変異細胞巢 巢状/多巢性	0	0	1	0	0	0	0	0	
肝細胞肥大 /小葉中心性	0	**13	**29	**46	0	3	*5	**31	
肝細胞空胞化 /びまん性	10	12	12	*19	38	40	44	44	
肝細胞巨大空胞化 /門脈周囲性	0	0	1	1	14	11	7	**41	
アミロイド [*] 沈着	25	21	26	*15	14	12	11	*24	

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

表 1-3 主な非腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	100	1000	6000	0	100	1000	6000
	検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50
全動物	腸間膜リンパ節 検査数	47	45	46	47	50	45	47	48
	アミロイド沈着	22	*32	**36	30	34	32	33	40
	上皮小体 検査数	39	40	40	42	40	38	39	39
	アミロイド沈着	21	26	23	31	28	28	*36	*35
	下垂体 検査数	47	47	50	50	49	49	50	49
	前葉/嚢胞・偽性嚢胞	23	19	*15	24	5	7	4	4
	直腸 検査数	48	48	48	49	48	50	50	49
	アミロイド沈着	17	16	20	**30	24	30	31	**40
	脾臓 検査数	49	48	48	49	50	50	50	49
	髓外造血	42	43	*47	*48	47	46	45	44
	ヘムジデリン沈着増加	40	36	*46	45	46	49	44	45
	顎下腺 検査数	50	50	50	50	50	50	50	50
アミロイド沈着	10	10	10	6	10	12	18	**27	
精巣 検査数	49	50	50	50					
アミロイド沈着	13	14	*25	17					
甲状腺 検査数	49	50	49	50	50	48	50	50	
濾胞細胞過形成	0	2	0	2	23	17	26	**38	
子宮 検査数					50	49	48	50	
内膜(嚢胞状)過形成					46	*38	39	40	
アミロイド沈着					36	39	41	*44	

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

表 2-1 全ての腫瘍性病変

検査時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	100	1000	6000	0	100	1000	6000
	検査動物数	15	13	8	5	6	8	4	5
死亡・ 切迫 屠殺	関節面 検査数	13	11	7	5	6	8	4	5
	血管肉腫[M]	1	0	0	0	0	0	0	0
	ハーダー腺 検査数	15	13	8	5	6	8	4	5
	腺腫[B]	0	0	0	0	1	0	0	0
	造血器 検査数	15	13	8	5	6	8	4	5
	リンパ腫[M]	0	1	0	0	1	2	0	0
	組織球性肉腫[M]	0	0	0	0	0	0	1	0
	肝臓 検査数	13	12	7	3	6	8	4	5
	肝細胞癌[M]	0	0	1	0	0	0	0	0
	血管肉腫[M]	1	0	0	0	0	0	0	0
	肺 検査数	15	13	8	5	6	8	4	5
	細気管支・肺胞腺腫[B]	1	0	0	0	0	0	0	0
	卵巣 検査数					6	8	3	5
肉腫(NOS) [M]					0	0	0	1	
下垂体 検査数	12	10	8	5	5	8	4	4	
前葉腺腫[B]	0	0	0	0	0	2	0	1	
膝窩リンパ節 検査数	0	3	1	0	0	0	0	0	
肥満細胞腫[M]	0	1	0	0	0	0	0	0	
皮下組織 検査数	2	0	0	0	0	0	0	0	
血管肉腫[M]	1	0	0	0	0	0	0	0	

[B] : 良性腫瘍

[M] : 悪性腫瘍

表 2-2 全ての腫瘍性病変

検査時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	100	1000	6000	0	100	1000	6000
	検査動物数	35	37	42	45	44	42	46	45
最終屠殺	関節面 検査数	35	37	42	44	44	40	45	45
	血管肉腫[M]	1	0	0	0	0	0	0	0
	脳 検査数	35	37	42	45	44	42	46	45
	星状膠細胞腫[M]	0	0	0	0	0	0	1	0
	ハグー腺 検査数	35	37	42	45	44	42	46	45
	腺腫[B]	0	0	0	0	2	2	0	1
	造血器 検査数	35	37	42	45	44	42	46	45
	リンパ腫[M]	2	4	3	3	12	3	9	5
	組織球性肉腫[M]	0	0	0	0	0	0	1	0
	空腸 検査数	35	37	42	45	44	42	46	45
	腺腫[B]	0	0	0	1	0	0	0	0
	肝臓 検査数	35	37	42	45	44	42	46	45
	肝細胞癌[M]	1	1	2	3	0	0	0	1
	肝細胞腺腫[B]	1	5	1	4	1	0	1	0
	肺 検査数	35	37	42	45	44	40	46	45
	細気管支・肺胞腺腫[B]	4	1	2	4	2	2	1	1
卵巣 検査数					44	41	46	45	
管間質腺腫[B]					0	1	0	1	
黄体腫[B]					0	0	1	0	
上皮小体 検査数	25	32	34	37	36	33	38	34	
腺腫[B]	0	0	0	0	1	0	0	0	
下垂体 検査数	35	37	42	45	44	41	46	45	
前葉腺腫[B]	0	0	0	0	29	24	19	17	
中間部腺腫[B]	0	0	0	0	0	0	0	2	
脊髄 検査数	35	37	42	44	44	42	46	45	
骨肉腫[M]	0	0	0	0	0	0	1	0	
脾臓 検査数	35	37	42	45	44	42	46	45	
血管肉腫[M]	1	0	0	0	0	0	0	0	
甲状腺 検査数	34	37	41	45	44	40	46	45	
濾胞細胞腺腫[B]	0	0	0	0	1	1	0	0	
子宮					44	42	45	45	
組織球性肉腫[M]					0	1	0	0	

[B] : 良性腫瘍

[M] : 悪性腫瘍

表 2-3 全ての腫瘍性病変

検査時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	100	1000	6000	0	100	1000	6000
	検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50
全動物	関節面 検査数	48	48	49	49	50	48	49	50
	血管肉腫[M]	2	0	0	0	0	0	0	0
	脳 検査数	50	50	50	50	50	50	50	50
	星状膠細胞腫[M]	0	0	0	0	0	0	1	0
	ハゲ腺 検査数	50	50	50	50	50	50	50	50
	腺腫[B]	0	0	0	0	3	2	0	1
	造血器 検査数	50	50	50	50	50	50	50	50
	リンパ腫[M]	2	5	3	3	13	*5	9	*5
	組織球性肉腫[M]	0	0	0	0	0	0	2	0
	空腸 検査数	48	49	48	48	50	50	50	49
	腺腫[B]	0	0	0	1	0	0	0	0
	肝臓 検査数	48	49	49	48	50	50	50	50
	肝細胞癌[M]	1	1	3	3	0	0	0	1
	血管肉腫[M]	1	0	0	0	0	0	0	0
	肝細胞腺腫[B]	1	5	1	4	1	0	1	0
	肺 検査数	50	50	50	50	50	48	50	50
	細気管支・肺腺腫[B]	5	1	2	4	2	2	1	1
	卵巣 検査数					50	49	49	50
	肉腫(NOS) [M]					0	0	0	1
	管間質腺腫[B]					0	1	0	1
黄体腫[B]					0	0	1	0	
上皮小体 検査数	39	40	40	42	40	38	39	39	
腺腫[B]	0	0	0	0	1	0	0	0	
下垂体 検査数	47	47	50	50	49	49	50	49	
前葉腺腫[B]	0	0	0	0	29	26	*19	*18	
中間部腺腫[B]	0	0	0	0	0	0	0	2	
膝窩リンパ節 検査数	0	3	1	0	0	0	0	0	
肥満細胞腫[M]	0	1	0	0	0	0	0	0	

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

[B] : 良性腫瘍

[M] : 悪性腫瘍

表 2-3 全ての腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	100	1000	6000	0	100	1000	6000
	検査動物数		50	50	50	50	50	50	50	50
全動物	脊髄	検査数	50	50	50	48	50	50	50	50
	骨肉腫[M]		0	0	0	0	0	0	1	0
	脾臓	検査数	49	48	48	49	50	50	50	49
	血管肉腫[M]		1	0	0	0	0	0	0	0
	皮下組織	検査数	2	0	0	0	0	0	1	0
	血管肉腫[M]		1	0	0	0	0	0	0	0
	甲状腺	検査数	49	50	49	50	50	48	50	50
	濾胞細胞腺腫[B]		0	0	0	0	1	1	0	0
	子宮	検査数					50	49	48	50
	組織球性肉腫[M]						0	1	0	0

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

[B]: 良性腫瘍

[M]: 悪性腫瘍

表 3 腫瘍性病変の発生数

性別		雄				雌				
投与群 (ppm)		0	100	1000	6000	0	100	1000	6000	
検査動物数		50	50	50	50	50	50	50	50	
合計	腫瘍数	良性	6	6	3	9	37	32	22	23
		悪性	8	7	6	6	13	6	13	7
	腫瘍総数		14	13	9	15	50	38	35	30
	担腫瘍動物数	良性	6	6	2	9	32	29	21	22
		悪性	5	7	6	6	13	6	13	7
	担腫瘍動物数		11	12	8	12	35	32	29	26

12. 繁殖毒性及び催奇形成

(1) ラットを用いた 2 世代繁殖毒性試験 (資料 No. 原体-19)

試験機関：

[GLP]

報告書作成年：2009 年

検体純度： %

供試動物：Wistar Han Crl: WI(HAN)系ラット、1 群雌雄各 30 匹

投与開始時 8~9 週齢

投与期間：P、F₁ 世代：交配前期間-10 週間、交配期間-14 日間、妊娠期間-約 22 日間、哺育期間-21 日間、F₁ 世代離乳後 6 週間の生育期間
(2007 年 11 月 28 日~2008 年 10 月 31 日)

投与方法：検体を 0(対照群)、200、1000 および 4000ppm の濃度で飼料に混入し、上記の全生存段階を通して投与した。F₁ 世代については離乳後 6 週間の生育期間とし、その後第 2 世代を開始した。哺育期間中 (0~21 日目) の摂餌量増加による検体摂取量の大幅な増加を避け、試験期間を通して検体摂取量を一定に維持する為、雌については哺育期間中、検体濃度を半量とした。

用量設定根拠；

一般状態および死亡率：毎日 2 回 (休祭日は 1 回)、動物の死亡および一般状態を観察した。また、ケージ越しおよびケージから取り出しての詳細な観察を週 1 回実施した。

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

体重および摂餌量：体重を交配前期間 (10 週) は、雌雄の動物について、週 1 回測定した。交配期間中から屠殺までの間は雄および未交尾の雌の体重を週 1 回測定した。妊娠期間中の母動物の体重は、0、6、13 および 20 日目に測定

し、哺育期間中の母動物の体重は、0、4、7、14 および 21 日目に測定した。

摂餌量は 10 週間の交配前期間中、雌雄の動物について、週 1 回測定した。交配期間中は、雄および未交尾の雌に対し、週 1 回の頻度で新鮮な飼料を与えたが、摂餌量は測定しなかった。妊娠期間中は週 1 回摂餌量を測定した。哺育期間中では 1 週目は 2 回、その後は週 1 回摂餌量を測定した。

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

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

繁殖指標；

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

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

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

a 精子が確認されないが妊娠した雌または膣栓が確認された雌を含む。

b 出産しなかったが着床痕が確認された雌を含む。

出生児の生存指標；

$$\text{出生率 (\%)} = \frac{\text{同腹児あたりの総出生児数}}{\text{同腹児あたりの総着床痕数}} \times 100$$

$$\text{生児出生率 (\%)} = \frac{\text{同腹児あたりの生存児数}}{\text{同腹児あたりの総児数}} \times 100$$

$$\text{4日生存率 (\%)} = \frac{\text{4日目（間引き前）の同腹児あたりの生存児数}}{\text{同腹児あたりの生存児数}} \times 100$$

$$\text{哺育率 (\%)} = \frac{\text{21日目の同腹児あたりの生存児数}}{\text{4日目（間引き後）の同腹児あたりの生存児数}} \times 100$$

$$\text{妊娠期間} = \text{妊娠 0 日から哺育 0 日目までの日数}$$

発情周期：交配前 3 週間にわたり、P 世代および F₁ 世代のすべての雌について毎日膣

スミア検査を行い、発情周期を明らかにした。さらに、終了直前に、すべての雌について発情周期段階を決定した。

精子検査：試験終了時にP世代およびF₁世代の全ての雄について、片側の精巣および精巣上体から精子を採取し、均質化抵抗性のある精子細胞数および精巣上体尾部精子貯蔵数を数えた。また、輸精管から採取した精子について、形態および運動性を評価した。精子の運動性および精子数の評価は、Integrated Visual Operating System (IVOS) を用いて行った。精子の運動性の評価は全群について行い、形態および精子数の評価は対照群と最高用量群について行った。

剖検および検査：雄動物は同腹児の出生後、母動物は同腹児の離乳後（哺育21日目）に屠殺・剖検して脳、下垂体、肝臓、腎臓、脾臓、甲状腺、胸腺、副腎、精巣上体、凝固腺、卵巣、卵管、前立腺、精囊、精巣、子宮、精巣上体尾部、肺、膈、子宮頸部、肉眼的病変部位を採取して、重量を測定（卵管、肺、膈および肉眼的病変部位を除く）し、病理組織学的検査も実施（脳、甲状腺および胸腺を除く）した。また、F₁雌動物では対照および最高濃度群について、卵巣の原始（前胞状）卵胞、胞状卵胞あるいは黄体数を顕微鏡的に検査した。

児動物の観察：

哺育0日に児の性別を検査した。

哺育期間（21日間）中は毎日、生存児および死亡児を確認した。

哺育0、4、7、14および21日目に児の体重および外部異常を検査した。

児の離乳後に包皮分離および膈開口を測定した。また、F₁児の最高濃度群で膈開口や包皮分離に影響がうかがわれた為、F₂児については哺乳0日に肛門性器間の距離も測定した。

親動物に選ばれなかったF₁児およびすべてのF₂児は、21日齢で屠殺し、肉眼的剖検を行った。また、脳、胸腺、脾臓および子宮重量を測定した。肉眼で確認された病変があればサンプルを採取し、記録した。

交配、調整、選抜および観察・検査項目の概要を次頁の表にまとめた。

表. 試験の概要

世代	期間	交配・調整・選抜	観察・検査項目	
P	交配前 (10週)	雌雄1対1で交配。 交配は膣スメアで 確認(妊娠0日)	週1回体重および摂餌量測定 (雄および未交配雌の体重は屠殺まで測定) 雌: 交配3週前より発情周期検査	
	交配(2週)			
	妊娠 (約3週)		P雌: 妊娠0、6、13、20日目体重、 週1回摂餌量測定	
	出産		P雄: 屠殺・剖検、臓器重量、精子検査、 病理検査	
	哺育(3週)		雌: 哺育0、4、7、14、21日目体重 摂餌量(0-4および4-7日目、その後週1回) 児: 性別(0日) 体重および 外部(又は内部)異常検査(0、4、7、14、21日) 生死数(0-21日)	
	哺育4日目に各同 腹児数を雌雄各4 匹に調整	屠殺(間引き児)肉眼的に外部および内部 検査	一般状態 生死観察 (毎日)	
F ₁	離乳	F ₁ 親用雌雄動物の 選抜		P雌: 屠殺、剖検、臓器重量、着床痕検査、 鏡検 児: 包皮分離、膣開口(離乳後) 選抜されなかった児の剖検、臓器重量測定 鏡検(同腹児の雌雄各1匹)
	生育(6週)			
	交配前 (10週)			(P世代に準ずる)
	交配(2週)	(P世代に準ずる)		
	妊娠 (約3週)			
出産		肛門性器間距離検査(F ₂ 児)		
哺育(3週)	(P世代に準ずる)			
F ₂	離乳		F ₁ 雌親: 屠殺、剖検、臓器重量測定、 着床痕検査、鏡検 F ₂ 児: 剖検、臓器重量測定 鏡検(同腹児の雌雄各1匹)	

結果：概要を表に示した。

親動物：

検体に関連した死亡または一般状態の変化は観察されなかった。

雌の P 世代対照群 2 例、1000ppm 群 1 例および F₁ 世代対照群 1 例で検体投与に関連しない偶発性の計画外屠殺あるいは死亡が認められた。

P および F₁ 世代の雌の膣スメア検査で検体投与に関連した発情周期への影響は認めなかった。また、雄の精子検査においても影響は認めなかった。いずれの投与群においても、生殖パラメータ（交尾率、受胎率、出産率、受精までの日数、妊娠期間および着床数）に投与関連性の影響は認められなかった。剖検においても投与に関連した変化は認めなかった。F₁ 雌動物で実施した卵巣の検査で卵胞数あるいは黄体数に影響は認められなかった。

雄において、4000 ppm 群では F₁ 世代で対照群に比して平均体重の有意な低値が認められた。最終体重では P 世代では有意な影響は認めなかったが、F₁ 世代では有意に低かった。P 世代では摂餌量 (g/動物/日) がわずかに少なかった (有意差なし) が、F₁ 世代では、摂餌量 (g/kg/日) が対照群に比べて増加 (有意差なし) した。これは、F₁ 雄が児の時に生じた体重減少により、第 2 世代開始時の体重が低く、体重相対的に摂餌量増加を認めたものと推察された。

P および F₁ 共に肝重量 (実重量および対体重比) が有意に増加し、病理組織学的検査で小葉中心性肝細胞肥大が認められた。また、胸腺実重量の有意 (F₁) な低下も認められた。他にも臓器重量では有意な変化が認められたが、これらの変化は対照群と比べて僅かな差であるか病理組織学的検査で変化を認めないことから投与の影響と思われなかった。

雌において、4000 ppm 群では P および F₁ 世代で対照群に比して、試験期間を通して体重および体重増加量の有意な低値を認め、いずれの世代も最終体重が有意に低かった。また、摂餌量について P および F₁ 世代では交配前および哺乳期間で有意な低下、妊娠期間では有意な増加を認めた測定時期が散見された。しかし、交配前期間、妊娠期間および哺育期間のいずれも期間を通じた平均摂餌量に有意差は認めなかった。

P および F₁ 共に肝重量 (実重量および対体重比) が有意に増加し、病理組織学的検査で小葉中心性肝細胞肥大が認められた。また、胸腺重量の有意 (F₁) な低下も認められた。他にも臓器重量では有意な変化が認められたが、これらの変化は対照群と比べて僅かな差であるか病理組織学的検査で変化を認めないことから投与の影響と思われなかった。

1000ppm 以下の投与群においては P および F₁ 世代の雌雄共に投与に関連した影響は認めなかった。

児動物：

出生後の生存率や一般状態に投与に関連した影響は認めなかった。

4000 ppm 群の親動物 (P および F₁) で妊娠期間中に認めた体重増加量の低

下と関連して、F₁およびF₂のいずれも同腹児数がわずかに少なかった（平均数9.2～9.3/背景値9.4～12.8 有意差なし）。同腹児数が少ないことに関連して出生率がわずかに低かった（有意差なし）が、総着床痕数は対照群と同程度であったことから着床後胚死亡率の発生率が高まった可能性があることを示唆^{註1)}した。

F₁およびF₂いずれも出生時体重は、対照群と同等であったが、哺育期間中の体重および体重増加量が4000 ppmで有意に低かった。4000 ppmでの低体重の二次的な影響として、F₁およびF₂では膈開口の遅れ（F₁のみ有意）と包皮分離の有意差の無いわずかな遅れが観察された。F₂で測定した肛門性器間距離には変化は認めなかった。また、低体重に関係して脳の重量低下と相対重量増加、脾臓の重量低下と相対重量低下がいずれも有意に認められた。

投与に関連した肉眼的剖検所見や病理組織学的所見は認めなかった。

1000ppm以下の投与群においてはF₁およびF₂共に投与に関連した影響は認めなかった。

以上、4000ppm投与群において、親動物では雌雄で体重および体重増加量の低下、摂餌量の変化、肝重量の増加とそれに関連した肝細胞肥大および胸腺重量の低下などが認められた。また、母動物への影響による二次的な影響として、児動物に体重および体重増加の低下、膈開口および包皮分離の遅れや臓器重量の変化が認められたことから、無毒性量は親動物および児動物共に1000ppm（P世代：雄64.1 mg/kg/日、雌75.9 mg/kg 体重/日、F₁世代：雄58.4 mg/kg/日、雌71.2 mg/kg 体重/日）^{註2)}と判断された。

なお、繁殖性に関して雄では影響を認めなかったが、4000 ppm群のPおよびF₁世代で同腹児数がわずかに減少（有意差なし）したことから、繁殖性に対する雌の無毒性量は1000ppm^{註3)}と判断した。

^{註1)} 申請者注）：着床後胚死亡率の発生率について

ラット催奇形成試験（資料No. 毒性-20）およびウサギの催奇形成試験（資料No. 毒性-21）においては着床所見に有意な差は認められず、本繁殖性試験での同腹児数の変化も有意差を認めないわずかな差であることから、偶発性のものと考えられる。

^{註2）、註3)} 申請者注）：平均検体摂取量について

本報告書では親動物での生殖に対する影響と児動物に対する影響を妊娠期間中および哺育期間中の平均検体摂取量（mg/kg 体重/日）で表しているが、本抄録では一般的と考えられる交配前（生育）期間（本試験においては10週間）の平均検体摂取量から無毒性量（mg/kg 体重/日）を記載している。なお、報告書に記載されている生殖および児に対する無毒性量はいずれも1000 ppmでmg/kg 体重/日に換算すると、生殖に関する雌の無毒性量は73.4 mg/kg 体重/日（妊娠期間中の検体摂取量に基づく）および児の無毒性量は72.5 mg/kg 体重/日（哺育期間中の検体摂取量に基づく）となっている。

表：結果の概要

表 1. 親動物

世代		親：P				親：F ₁				
用量 (ppm)		0	200	1000	4000	0	200	1000	4000	
動物数	雄	30	30	30	30	30	30	30	30	
	雌	30	30	30	30	30	30	30	30	
死亡数		2 [#]	0	1 [#]	0	1 [#]	0	0	0	
一般状態		—	—	—	—	—	—	—	—	
平均検体摂取量 (交配前期間) (mg/kg/day)	雄	0	12.8	64.1	252.2	0	12.2	58.4	256.5	
	雌	0	15.0	75.9	294.5	0	14.9	71.2	293.4	
平均体重 (g)	♂	14週目	457.2	448.7	439.9	434.0	464.2	453.3	448.2	**426.8
	♀	10週目	242.9	238.8	235.9	**226.3	233.7	243.2	240.6	**217.8
	♀ 妊娠期間	0日目	242.1	239.4	237.2	**221.9	235.7	243.7	237.9	**215.8
		6日目	261.8	256.8	259.6	**237.4	251.2	260.6	251.9	**228.6
		13日目	286.7	279.5	278.0	**257.1	272.2	280.7	271.1	**247.5
	♀ 哺育期間	20日目	341.8	336.9	336.9	**306.5	329.5	335.8	332.0	**296.2
		0日目	269.4	264.6	259.1	**242.1	256.8	263.2	257.7	**232.8
		4日目	281.8	275.2	273.0	**251.4	268.3	276.7	271.5	**238.7
		7日目	287.7	281.4	281.3	**259.0	275.5	284.8	278.4	**249.1
		14日目	302.8	294.0	294.7	**275.4	290.6	298.0	290.1	**261.9
	21日目	297.3	289.2	286.3	**271.2	278.8	288.3	279.4	**261.6	
平均体重 増加量 (g)	♂	1-14週目	179.6	175.5	163.4	155.3	157.3	152.2	148	150.4
	♀	交配前	55	51.1	46.7	35.1	45.9	53.6	47.4	39.1
		妊娠期間	99.6	97.5	99.7	**84.6	93.3	92.0	94.2	**80.4
平均摂餌量 (g/動物/ 日)	♂	交配前	23.1	22.5	22.2	21.9	23	22.5	21.8	22.1
	♀	交配前	16.5	16.1	15.8	15.4	15.5	16.2	15.9	14.7
		妊娠期間	19.5	18.5	18.7	19.4	17.6	18.2	18.3	18.8
		哺育期間	44.8	43.2	44.2	41.5	42.6	42.6	42.8	38.5
平均摂餌量 (g/kg/日)	♂	交配前	63.7	63.6	62.9	63.0	60.3	60.6	59.8	64.2
	♀	交配前	76.0	74.9	74.5	73.5	72.7	74.3	72.9	73.4
		妊娠期間	74.3	71.4	72.6	81.5	69.5	69.5	72.1	81.4
		哺育期間	156.2	154.3	158.3	160.6	155.1	151.2	155.2	155.3

** : p<0.01 (Dunnett's test)

— : 著変なし [#]検体投与に関連しない偶発性の死亡例または屠殺例

表 1. 親動物 (続き)

世代		親 : P				親 : F ₁				
用量 (ppm)		0	200	1000	4000	0	200	1000	4000	
平均発情周期 (日)		4.2	4.0	4.1	4.1	4.0	4.2	4.2	4.2	
♂	精子 運動性	運動率(%)	82	82.1	82.7	82.6	82.1	81.1	82.4	79.9
		前進率(%)	54.4	55.6	57.3	56	55.9	54.6	56.8	55
	精子数 (精子/g)	精巢	37.3	—	—	32.2	41.1	—	—	38.4
		精巢上体	195	—	—	152.5	161.9	—	—	198.1
	精子形態 (平均総数)	正常	197.9	—	—	197.6	198.8	—	—	197.3
		異常	2.0	—	—	2.3	1.1	—	—	2.7
		頭部分離	0.1	—	—	0.1	0.1	—	—	0
	♀	同居させた雌雄数		30	30	30	30	30	30	30
		交尾数		29	27	30	29	30	28	30
出産した動物数		27	26	28	29	27	26	30	30	
着床した動物数		27	26	29	29	27	26	30	30	
交尾率(%)		96.7	90	100	96.7	100	93.3	100	100	
受胎率(%) ^{a)}		100	96.3	96.7	100	90.0	96.4	100	100	
出産率(%)		93.1	100	96.6	100	100	96.3	100	100	
受精までの平均日数		3.0	4.3	2.5	2.8	2.3	2.5	2.0	2.8	
妊娠期間(日)平均		22.1	22.0	21.9	21.9	21.9	22.3	22.1	22.0	
妊娠期間(日)中央値		22	22	22	22	22	22	22	22	

—は未実施

(Fisher's exact test)

^{a)} 出産しなかったが着床痕が確認された雌を含む

表 1. 親動物 (続き)

世代		親 : P				親 : F ₁				
用量 (ppm)		0	200	1000	4000	0	200	1000	4000	
a)	最終体重	♂	100	98	96	95	100	98	96	*92
		♀	100	97	96	*91	100	103	101	*95
	肝臓(実重量)	♂	100	100	98	*114	100	100	100	*114
		♀	100	99	104	*111	100	101	106	*109
	肝臓(対体重比)	♂	100	101	102	*120	100	102	104	*123
		♀	100	102	*107	*121	100	98	105	*116
	脳(実重量)	♂	—	—	—	—	100	101	98	*96
	脳(対体重比)	♀	100	103	102	*107	100	99	100	*104
	胸腺(実重量)	♂	—	—	—	—	100	101	90	*85
		♀	—	—	—	—	100	104	92	*82
	腎臓(実重量) /左 /右	♀	—	—	—	—	100	102	101	*94
		♀	—	—	—	—	100	101	100	*93
	腎臓(対体重比) /左	♂	—	—	—	—	100	100	100	*106
		♀	100	101	104	*105	—	—	—	—
	腎臓(対体重比) /右	♀	100	102	103	*107	—	—	—	—
	脾臓(実重量)	♀	100	101	99	*92	100	104	96	*89
	副腎/左(対体重比)	♂	—	—	—	—	100	100	100	*117
	甲状腺/右(実重量) (対体重比)	♂	100	108	108	*123	—	—	—	—
			100	100	*114	*133	—	—	—	—
	甲状腺/左(対体重比)	♂	100	100	*133	*133	—	—	—	—
精巣上体(対体重比) /右	♂	—	—	—	—	100	108	109	*114	
		—	—	—	—	100	102	106	*111	
精囊(対体重比)	♂	—	—	—	—	100	108	105	*114	
卵巢(実重量) /左 /右 /両側 [#]	♀	100	106	96	*85	—	—	—	—	
		—	—	—	—	100	108	100	*86	
		100	108	98	↓88	100	105	99	↓86	
肉眼的病理検査		—	—	—	—	—	—	—	—	
b) 病理 検査	肝臓 :	♂	0(30)	—	0(30)	+11(30)	0(30)	—	0(30)	+11(30)
	小葉中心性肝細胞肥大	♀	0(30)	—	0(30)	+9(30)	0(30)	—	0(30)	3(30)
平均卵胞数 ; および黄体数	原始卵胞	—	—	—	—	6.75	—	—	5.96	
	胞状卵胞	—	—	—	—	5.24	—	—	5.37	
	黄体	—	—	—	—	3.29	—	—	2.96	

—は有意差なしまたは該当なし、あるいは著変なし

a) : 数値は対照群に対する割合(%), b) : 所見数(検査数)

* : p<0.05 (Kruskal-WallisまたはANOVA + Dunnett's またはMann-Whitney U-test)

+ : p<0.05 (カイ二乗 + Fisher's exact test) \$: Student's t-Test

↓ : p<0.05 (Bartlett test + Dunnett's) 両側重量を申請者により算出し検定した。

表 2. 児動物

世代		児 : F ₁				児 : F ₂				
用量 (ppm)		0	200	1000	4000	0	200	1000	4000	
腹数		27	26	28	29	27	26	30	30	
総着床痕数		302	280	306	298	290	283	334	301	
総出産数		285	262	298	268	280	262	322	279	
死産数		1	1	0	3	0	0	0	0	
性比 0日目 (雄の比率)		54.8	57.4	49.8	50.3	48	50.4	49.4	45.9	
平均同腹児数		10.6	10.1	10.6	9.2	10.4	10.1	10.7	9.3	
出生率		94.2	92.4	94.1	90.1	96.7	91.7	95.7	91.9	
生児出生率		99.7	99.7	99.7	98.4	100	100	100	100	
4日生存率		96.7	99.4	98.5	96.9	98.7	98.7	100	100	
哺育率		95.8	100	99.1	100	99.5	99.2	99.6	99.2	
哺育 期間 体重 (g)	0日目	♂	6.1	6.4	6.1	6.1	6.2	6.4	6.3	6.2
		♀	5.9	6.0	5.9	5.8	5.9	6.1	6.0	5.9
	4日目 (調整前)	♂	10.6	10.9	10.3	10.1	10.4	10.8	10.5	10.1
		♀	10.2	10.5	10.1	9.7	10.0	10.5	10.1	9.7
	4日目 (調整後)	♂	10.6	10.9	10.3	10.1	10.4	10.8	10.6	10.1
		♀	10.2	10.5	10.1	9.6	10.0	10.5	10.1	9.7
	7日目	♂	16.8	17.1	16.4	*15.5	16.5	17.4	16.8	*15.4
		♀	16.2	16.5	16.1	**14.8	16.0	16.6	16.1	*15.0
	14日目	♂	34.0	34.0	33.3	**31.0	32.8	*34.9	32.9	**30.2
		♀	33.0	33.2	32.7	**30.1	32.0	33.4	31.8	**29.6
	21日目	♂	51.3	51.0	50.0	**45.3	49.3	*52.2	49.8	**44.5
		♀	49.5	49.4	48.6	**43.9	47.6	49.5	47.5	**42.9
包皮分離日数		43.5	42.9	43.4	44.4	44.0	43.5	43.4	45.0	
臆開口日数		35.5	34.1	36.2	*39.6	36.7	34.5	35.5	39.8	
肛門性器間 距離(mm)		♂	—	—	—	—	4.2	4.2	4.1	4.2
		♀	—	—	—	—	2.1	2.1	2.1	2.2
a) 臓器 重量	脳	実重量	100	99	*98	**96	100	102	100	*97
		対体重比	100	101	101	**110	100	98	100	**109
	脾臓	実重量	100	94	95	**76	100	106	98	**81
		対体重比	100	96	97	**86	100	101	97	**90
肉眼的病理検査		—	—	—	—	—	—	—	—	
病理組織学的検査		—	—	—	—	—	—	—	—	

—は該当なし、または所見なし

a) : 対照群に対する割合(%)

* : p<0.05、** : p<0.01(Dunnett's test)

(2) ラットにおける催奇形性試験

(資料 No. 毒性-20)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2008 年

検体純度： %

供試動物：Sprague-Dawley (Cr1:CD(SD))系雌ラット、13～14 週齢、1 群 23 匹
交尾確認日の体重 224～287g

投与期間：妊娠 6 日から 20 日の 15 日間 (2007 年 9 月 3 日～9 月 25 日)
(膣スメアに精子を認めるか膣栓で交尾を確認した日を妊娠 0 日とした。)

投与方法：検体を 0.5%メチルセルロース 400 水溶液に懸濁させ 0、30、100 および
300mg/kg/日の用量で、投与期間中毎日 1 回 10mL/kg の投与容量で強制経
口投与した。

用量設定根拠；

観察・検査項目：

親動物；全ての動物について妊娠 0 日から 21 日まで毎日、一般状態を観察した。
死亡および瀕死状態については 1 日 2 回 (週末および休日は 1 回) 観察し
た。体重を妊娠 0、6、8、10、12、14、16、18 および 21 日目に測定した。
摂餌量は給餌量および残餌量を 2～5 日毎に測定して求めた。
妊娠 21 日目に二酸化炭素吸入により全ての母動物を屠殺・剖検し、肉眼
的に観察した。妊娠している雌について肝臓重量を測定した。
妊娠子宮重量を測定し、以下の項目を記録した。

- ・ 黄体数
- ・ 着床痕数
- ・ 早期および後期吸収胚数
- ・ 生存胎児および死亡胎児数
- ・ 生存胎児の性別

・ 生存胎児体重

着床痕が目視で確認出来ない子宮角は 10%硫化アンモニウム溶液に浸漬し、着床痕を可視化した。

胎児；全生存胎児について、ペントバルビタールナトリウムの皮下注射により屠殺し、外表検査をした。各腹約半数の個体はブアン液に固定し、フリーハンドで切開して内部器官の検査を実施した。残りの半数は内臓を取り出し無水エタノールに固定した後、アリザリンレッド S およびアルシアンブルーで染色し、骨格検査に供した。

結果：結果の概要を表に示した。

母動物；試験期間を通じて投与に関連した一般状態の変化は認められず、死亡も認めなかった。また、平均体重においてはいずれの投与群も統計学的有意差は認めなかった。

300mg/kg/日投与群において、体重増加量が妊娠 6~8 日で統計学的有意に減少し、その後、統計学的有意では無かったが妊娠 10~14 日および 18~21 日では対照群に比して 10~15%体重増加量が減少した。また、妊娠 6~21 日の体重増加量は統計学的有意に減少した。妊娠子宮重量を差し引いた（補正体重）妊娠 0~21 日の体重増加量では統計学的有意差は認めなかったが対照群に比して 19%減少が認められた。

摂餌量測定では、妊娠 6~12 日で対照群に比して 5~9%低く（妊娠 8~10 日では有意 ($P \leq 0.05$))、であったがその後影響は認められなかった。

剖検においては投与に関連して 4 例で肝の明瞭な小葉像が観察され、有意に肝実重量も増加していた。

100mg/kg/日投与群では、有意ではなかったが、体重増加量が妊娠 6~8 日及び 8~10 日で対照群よりも 18~32%低かった。その後の体重増加は対照群と同程度であった。妊娠 6~21 日の体重増加、補正体重変化量、平均体重では影響を認めなかった。

剖検では 3 例に肝の明瞭な小葉像が観察されたが肝実重量に影響は認めなかった。

30mg/kg/日投与群では投与に関連した変化を認めなかった。

着床所見；300mg/kg/日投与群で着床前胚損失がわずかに多く、胎児数もわずかに少なかった。しかし、これは 1 例でのみ認めた高い着床前胚損失率 (87.5%) と同腹仔数が 1 匹であった事に起因するもので、いずれも統計学的に有意ではなく、背景値の範囲内にあることから検体投与に関連しないものと考えた。他の着床所見においても統計学的有意差は認めず、投与による影響は認められなかった。

胎児動物；外表検査において、投与と関連した変化は認められなかった。

対照、30 および 300mg/kg/日群で欠指・合指または、後肢の内転、あるいは短鼻がそれぞれ各 1 匹に認められた。これらの外表奇形は各々単独で認められたため、偶発的なものと考えられた。

また、その他にみられた外表異常も、用量と関連がなく、孤立した所見として認められたものであったため、偶発的な所見とみなした。

内臓検査において、投与と関連した変化は認められなかった。

尚、100 および 300mg/kg/日群で各 1 匹の胎児に認められた腎盂拡張（重度）の発生率は、同腹児および胎児レベルで背景値の範囲内であったため、投与と関連するものとはみなさなかった。

また、その他に認められた所見は、投与群で対照群よりも低い頻度の発生であるか、または孤立した所見であり用量と関連が無く、偶発的な所見とみなした。

申請者注)

胸腺残留の減少が対照群に比し、全投与群で統計学的有意であったが用量と関連が無く、背景値内の変動であり、対照群で背景値を越える発生が認められたことによるもので、偶発的な所見と考えられる。

骨格検査において、投与と関連した変化は認められなかった。

尚、4 匹の胎児において、椎体軟骨融合、骨化遅延、中節骨欠損あるいは踵骨位置異常などの奇形所見が認められたが、対照および低用量群でのみの発生であった事から、偶発的なものとみなした。

剣状突起の分岐やダンベル状または分割した胸椎体が対照を含む全ての群で、また、第 14 胸部肋骨の短縮が 300 mg/kg/日群で認められ、いずれの発生も対照群と比べ 300 mg/kg/日で多かったが、背景値の範囲内であったことから、これらの所見は自然発生したものと考えられた。

胸骨に付着していない第 7 肋軟骨が対照を含む全ての群で認められ、300 mg/kg/日で最も多かった。だが、発生率は 30 mg/kg/日を除いて、背景値の範囲外か境界線にあり、対照群でも同腹児発生率は背景値を超えていた。また、同施設での他試験の低用量群で同腹児の 31.8%にこの所見がみられている。従って、胸骨に付着していない第 7 肋軟骨の発生率は試験施設での正常な変動の範囲内にあると考えられた。

300mg/kg/日群で肋軟骨の変形が同腹児レベルの背景値範囲外であった。しかし、胎児レベルでは背景値内にあり、この所見の重症度は低く、他に関連する所見がなかったことから、毒性学的な関連性はないものと考えられた。

本試験において、母動物の死亡や投与による一般状態変化は認められなかった。いずれの用量でも平均体重、妊娠率、着床前後の胚損失、胚吸収、また胎児の死亡、性比、あるいは体重等の同腹児パラメータ、あるいは胎児の外表、内臓、骨格検査において投与と関連する影響は認められなかった。

一方、300mg/kg/日で母動物の平均体重に統計学的有意差は認めなかったが、体重増加量の有意な低下が認められた。また、摂餌量の減少、肝臓重量の増加や肉眼観察で小葉像が明瞭に認められた。100mg/kg/日でも、体重増加の抑制傾向（統計学的有意差なし）や明瞭な小葉像を肝に認めるなど、わずかに母動物に影響が認められた。

以上の結果より、本被験物質の無毒性量は母動物で 30 mg/kg/日、胎児動物で 300 mg/kg/日であった。また、最高投与量の 300 mg/kg/日でも催奇形性を及ぼさないと判断された。

表. 結果の概要

所見	投与用量 (mg/kg/日)				背景対照 の範囲	
	0	30	100	300		
供試動物数	23	23	23	23	---	
妊娠動物数	23	22	23	23	---	
妊娠率 (%)	100	96	100	100	---	
一般状態	—	—	—	—	---	
死亡数 (合計)	0	0	0	0	---	
体重増加量 (g)	妊娠6 ~ 8日	6.3	5.4	4.3	-0.2**	---
	8 ~ 10日	8.5	8.7	7.0	8.6	---
	10 ~ 14日	18.4	18.3	18.7	15.7	---
	14 ~ 18日	42.7	41.2	43.0	40.2	---
	18 ~ 21日	49.8	52.7	51.8	45.0	---
	6 ~ 21日	125.7	126.4	124.8	109.3*	---
補正体重増加量 (妊娠0~21日-妊娠子宮重量)	52.5	54.4	49.8	42.3	---	
摂餌量 (g/日)	妊娠6 ~ 8日	25.5	25.5	25.3	23.6	---
	8 ~ 10日	25.7	25.8	25.1	23.5*	---
	10 ~ 12日	25.2	25.9	25.6	23.9	---
	12 ~ 14日	26.3	26.5	26.4	25.8	---
	14 ~ 16日	26.0	26.1	26.5	27.0	---
	16 ~ 18日	27.6	27.7	27.2	27.3	---
	18 ~ 21日	27.3	28.1	27.6	26.1	---
肝重量 (g) [対照に対する比]	13.02 [100]	13.42 [103]	13.45 [103]	14.84** [114]	---	
剖検所見 肝 / 明瞭な小葉像	1	0	3	4	---	
着床所見 (腹当り)	黄体数	16.4	16.5	16.7	16.2	
	着床数	15.2	15.0	15.3	14.8	
	生存胎児数	14.1	13.9	14.4	13.8	
	死亡胎児数 (%)	0.3	0.0	0.3	0.3	
	着床前胚損失 (%)	6.8	8.7	7.5	10.3	
	着床後胚損失 (%)	6.9	6.9	6.0	6.5	
	吸収胚					
全吸収を認めた腹数	0	0	0	0	---	
早期吸収胚数	0.8	1.0	0.9	1.0		
後期吸収胚数	0.2	0.1	0.0	0.0		

—は著変なし

* p<0.05, ** p<0.01

母動物の体重増加量、補正体重変化、摂餌量、肝重量、黄体数、着床数、吸収胚数、着床前後胚損失 (Dunnett または Dunn 検定) 剖検 (Fisher 検定/申請者により実施)
生存および死亡胎児数 (Dunnett 検定/申請者により実施)

表. 結果の概要 (続き)

所見	投与用量 (mg/kg/日)				背景対照 の範囲
	0	30	100	300	
検査腹数	23	22	23	23	
胎児重量(g) (雄)	5.53	5.61	5.70	5.47	
胎児重量(g) (雌)	5.21	5.33	5.35	5.23	
性比、雄%	48.8	51.7	42.7	50.3	
外表異常 [検査胎児数] 変異/ 小型胎児 L: 3(13.0) (体重<4g) F: 3(0.9)	[325]	[306]	[331]	[317]	
耳介:血腫 L: 0(0.0) F: 0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(4.3) 1(0.3)	--- ---
肛門開口部:拡張 L: 1(4.3) F: 1(0.3)	1(4.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0) 0(0.0)	--- ---
奇形/ 前肢:欠指・合指 L: 1(4.3) F: 1(0.3)	1(4.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0) 0(0.0)	--- ---
短鼻・浮腫・ 胎盤増大 L: 0(0.0) F: 0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(4.3) 1(0.3)	--- ---
後肢:内転 L: 0(0.0) F: 0(0.0)	0(0.0)	1(4.5) 1(0.3)	0(0.0) 0(0.0)	0(0.0) 0(0.0)	--- ---
内臓異常 (検査胎児数) 変異/ 水晶体暗調域 L: 0(0.0) F: 0(0.0)	[156]	[145]	[160]	[152]	--- ---
胸腺残留 L: 8(34.8) F: 16(10.3)	8(34.8)	4(18.2) *5(3.4)	3(13.0) **4(2.5)	5(22.7) *6(3.9)	
腕頭動脈欠損 L: 1(4.3) F: 1(0.6)	1(4.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0) 0(0.0)	--- ---
尿管:回旋/拡張 L: 16(69.6) F: 32(20.5)	16(69.6)	13(59.1) 19(13.1)	12(52.2) 26(16.3)	13(59.1) 26(17.1)	
腎盂拡張 L: 5(21.7) F: 5(3.2)	5(21.7)	1(4.5) 1(0.7)	1(4.3) 2(1.3)	1(4.5) 1(0.7)	
奇形/ 腎盂拡張(重度) L: 0(0.0) F: 0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(4.3) 1(0.6)	1(4.5) 1(0.7)	

L: 影響を受けた腹数 (影響を受けた腹の割合%)

F: 影響を受けた児数 (影響を受けた児の割合%)

* p<0.05, ** p<0.01

胎児重量 (Dunnett または Dunn 検定)、胎児性比 (χ^2 test)

外表および内臓異常 (Fisher 検定/申請者が実施)

表. 結果の概要 (続き)

所見	投与用量 (mg/kg/日)				背景対照 の範囲
	0	30	100	300	
骨格異常 [検査胎児数] 変異/ 剣状突起:分岐 L:	[169]	[161]	[171]	[165]	
F:	1 (4.3)	1 (4.5)	2 (8.7)	3 (13.0)	
第7肋軟骨胸骨へ L:	1 (0.6)	2 (1.2)	2 (1.2)	3 (1.8)	
未付着(両/片側) F:	5 (21.7)	3 (13.6)	6 (26.1)	7 (30.4)	
肋軟骨:変形 L:	9 (5.3)	10 (6.2)	12 (7.0)	11 (6.7)	
(片側) F:	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (8.7)	
第14胸部肋骨 L:	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (8.7)	
:短縮(両側) F:	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.2)	
胸椎体 L:	1 (4.3)	1 (4.5)	1 (4.3)	4 (17.4)	
:ダンベル状・分割 F:	1 (0.6)	1 (0.6)	2 (1.2)	4 (2.4)	
奇形/ 第4頸椎体軟骨融合 L:	0 (0.0)	1 (4.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	---
/第5頸椎体・第1胸 F:	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	---
椎体軟骨融合/第3、 4頸椎弓骨化遅延・ 融合・軟骨融合/27 仙骨前椎骨					
第5、6頸椎横突起:L:	0 (0.0)	1 (4.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	---
軟骨融合 F:	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	---
前肢第2、3中節骨:L:	1 (4.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	---
軟骨欠如/第3末節 F:	1 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	---
骨欠如・軟骨欠如					
踵骨及び距骨位置 L:	0 (0.0)	1 (4.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	---
異常 F:	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	---

L: 影響を受けた腹数 (影響を受けた腹の割合%)

F: 影響を受けた児数 (影響を受けた児の割合%)

骨格異常 (Fisher 検定/申請者が実施)

(3) ウサギにおける催奇形性試験

(資料 No. 毒性-21)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2008 年

検体純度： %

供試動物：New Zealand White Cr1:KBL (NZW) 妊娠雌ウサギ (妊娠 1~2 日で搬入時)、
1 群当たり 23 匹、試験開始時体重：3.10~3.93kg、約 18 週齢

投与期間：妊娠 6 日から 28 日の 23 日間 (2007 年 10 月 31 日~12 月 13 日)
(交配日を妊娠 0 日とした。)

投与方法：検体を 0.5%メチルセルロース 400 水溶液に懸濁させ 0、30、100 および
600mg/kg/日の用量で、投与期間中毎日 1 回、4ml/kg の投与容量で強制経
口投与した。

用量設定根拠；

観察・検査項目：

母動物；全ての動物について妊娠 2 日から 29 日まで毎日一般状態を観察した。死
亡、瀕死状態および流産の兆候については 1 日 2 回 (週末および休日は 1
回) 観察した。雌の体重を妊娠 3、6、8、10、12、14、16、18、20、22、

24、26 および 29 日目に測定した。摂餌量は給餌量および残餌量を 1~2 日毎に測定して求めた。

妊娠 29 日目に全生存動物をペントバルビタールナトリウム静脈注射により屠殺し、肉眼的に内臓を観察し、肋骨数を記録した。妊娠している雌の肝臓は重量を測定し、10%中性緩衝ホルマリンで固定した。妊娠子宮重量を測定し、以下の項目を記録した。

- ・ 黄体数
- ・ 着床数
- ・ 吸収胚（早期と後期に分類）
- ・ 生存または死亡胎児数
- ・ 生存胎児重量

肉眼で着床が確認できない場合は、子宮角を 2%水酸化ナトリウムに 2 時間浸漬した後 10%中性緩衝ホルマリンにさらに 2 時間浸漬して可視化 (Sumida, 1994) させ着床の有無を確認した。

胎 児；全生存胎児について、ペントバルビタールナトリウムを皮下注射して屠殺後、外表検査を行った。各腹約半数の個体は頭部をブアン液に浸漬して固定後、内部構造を検査した。全ての個体について内臓を検査し、性別を確認した後、無水エタノールで固定後 Staple and Schnell の変法を用いて染色して骨格検査を行った。

結 果：結果の概要を表に示した。

母動物；最終屠殺時まで生存していた全ての群の動物に検体投与と関連する一般状態の変化は認めなかった。

600mg/kg/日群で妊娠 17~25 日の間排便が僅か、あるいは全く認めず、妊娠 6~25 日で 640g 体重減少した 1 例を切迫屠殺した。この例での肉眼的剖検所見に異常は認めなかった。

100、30mg/kg/日群および対照群で各 2、1 および 1 例が投与時の事故により死亡した。

600mg/kg/日群においては、平均体重は対照群と同等に推移した。

体重増加量ではいずれの測定でも統計学的有意差は認めなかったものの、妊娠 6~8 日で 0.01kg 減少し、対照群の 0.02kg 増加に比して低かった。

また、妊娠 8~22 日までの各体重測定時期や妊娠期間（妊娠 6~29 日）を通した体重増加量、妊娠子宮重量を差し引いた補正体重でも対照群よりも低く、体重増加抑制が認められた。

摂餌量では妊娠 6~22 日の間、有意な摂餌量低下を認めたが、その後の期

間は対照群と同等であった。

100 および 30mg/kg/日群においては、体重変化は対照群と同等であった。尚、30mg/kg/日群では、妊娠 22～26 日の間にのみ統計学的に有意な体重増加が認められた。しかし、この時期のみに限られたものであり偶発生のものと考えられた。

妊娠動物の平均肝重量はすべての検体投与群で対照群と同等であり、剖検においても投与に関連する所見はいずれの投与群にも認めなかった。

600mg/kg の妊娠率が対照群と比較して低かったが（有意差無し）、流産動物がいなかったことから、交配手順によるものとみなされ、投与による妊娠率への影響はなかったものと考えた。

帝王切開時に実施した各検査パラメータでは、600mg/kg で死亡胎児の割合が対照群より高く（有意差なし）、背景値の範囲から外れていたが、妊娠 6～14 日に体重減少を認めた 1 例の母動物（死亡胎児数 6、後期吸収 1、生存胎児数 7）に起因するものと考えられた。この影響は孤立して認められたため、投与に関連するものとはみなさなかった。

100mg/kg 群で早期吸収胚の割合が対照群と比べて高く、背景値の範囲からわずかに外れていた。しかし、用量とは無関係に認められたため、自然発生したものとみなした。

胎児動物；600 mg/kg で平均胎児体重が対照群より低かった（統計学的有意なし）。

性比に統計学的に有意な差は認めなかった。また、外表、内臓、骨格の各検査において投与と関連すると考えられる影響は認められなかった。

外表検査；600 mg/kg/日で、臍帯ヘルニアが 1 例みられ、対照では見られていなかった。しかし、過去の試験の中用量で高頻度（同腹 8.3%、胎児 0.9%）に認められている。従って、今回の試験で孤立的に認められたこの所見は、投与と関連したものとはみなさなかった。

また、他に散見した所見は、用量に関連しないか、背景値内、あるいは対照群との間に統計学的有意差がなかったことから自然発生したものとみなした。

申請者注)

小型胎児（28g 以下）の発生数が児の割合で見た場合、全投与群で統計学的有意な増加が認められている。しかし、発生率に投与用量と関係がなく、いずれも背景値内の変動であった。また、統計学的有意差は対照値（2.1%）が背景値（ ）の下限よりも低かったことに起因する

ものと考えられる。

内臓検査；600 mg/kg/日で、大動脈弓および上行大動脈：拡張、肺動脈幹：閉鎖、右心室：小型化、左心室：拡張などの心臓の所見が1例に認められた。しかし、1例のみに孤立して発生したため、偶発的なものとみなした。その他、散見した所見は、用量に関連しないか背景値の範囲、あるいは統計学的に有意差がなかったことから、自然発生したものとみなした。

骨格検査；600 mg/kg/日において、頭頂（片側／両側）分離が3腹で各1例に認められたが、その発生率には統計学的に有意な差はなかった。3腹において孤立的に発生し、重症度も低かったために、この所見には毒性学的関連性はないとみなした。

第5および6胸骨分節の骨化遅延の発生率は、影響のあった腹の割合でのみ統計学的に有意（ $p \leq 0.05$ ）であった。しかし、対照値が背景値の範囲より低く、600 mg/kg/日群が背景値の範囲内にあったことを考慮すると、この発生率の上昇は、自然発生したものと考えられた。

第7頸椎の頸肋（片側／両側）の短縮および1本の肋骨（片側）の分岐の発生率は統計学的に有意でなく、背景値からごくわずかに外れる程度のものであることから、これらの所見は自然発生したものとみなした。

また、他に散見した所見は、用量に関連しないか、背景値内のものであり自然発生したものとみなした。

本被験物質をウサギに妊娠6日から28日の間、強制経口投与した結果、600 mg/kg/日の用量で試験期間を通じて平均体重パラメータおよび平均摂餌量に有意な影響が見られ、母動物に対する影響が認められた。この用量では、平均胎児体重がわずかに減少したことから胎児に対する影響も認められた。

以上のことより、本試験における無毒性量は母動物および胎児とも100mg/kg/日と判断された。また、催奇形性は認められなかった。

表. 結果の概要

所見		投与用量 (mg/kg/日)				背景対照 の範囲 [#]	
		0	30	100	600		
親動物	供試動物数	23	23	23	23	---	
	妊娠動物数 (妊娠率%)	22 (96)	23 (100)	23 (100)	19 (83)	---	
	非妊娠動物数	1	0	0	4		
	死亡数	1 ^{#1}	1 ^{#1}	2 ^{#1}	1 ^{#2}		
	一般状態	—	—	—	—	---	
	体重増加量 (g)	妊娠6 ~ 8日	0.02	0.02	0.00	-0.01	---
		8 ~ 10日	0.05	0.03	0.04	0.02	---
		10 ~ 14日	0.08	0.06	0.08	0.03	---
		14 ~ 18日	0.09	0.06	0.05	0.07	---
		18 ~ 22日	0.07	0.07	0.05	0.02	---
		22 ~ 26日	0.00	0.06**	0.04	0.02	---
		26 ~ 29日	0.06	0.06	0.06	0.08	---
		6 ~ 29日 補正体重変化 [‡]	0.35 -0.20	0.35 -0.21	0.31 -0.20	0.26 -0.29	---
	摂餌量 (g/日)	妊娠6 ~ 8日	178.4	182.4	170.4	143.8*	---
		8 ~ 10日	191.7	178.2	181.5	153.9**	---
		10 ~ 14日	180.2	161.7	172.7	148.5	---
		14 ~ 18日	183.8	165.2	170.3	134.7**	---
		18 ~ 22日	182.1	166.6	162.5	144.6*	---
		22 ~ 26日	121.3	126.3	129.6	117.8	---
		26 ~ 29日	111.3	123.3	111.6	114.3	---
肝重量(g) [対照に対する比]	99.5 [100]	89.9 [90]	97.0 [97]	104.4 [105]	---		
剖検所見	—	—	—	—	---		
着床所見 (腹当り)	母動物数 (腹数)	21	22	21	18		
	黄体数	11.8	11.7	12.4	11.7		
	着床数	10.1	10.5	10.6	10.7		
	生存胎児数	9.1	9.9	8.9	9.3		
	死亡胎児数 (%)	5.3	3.1	4.9	8.0		
	着床前胚損失 (%)	14.1	11.2	14.0	8.1		
	着床後胚損失 (%)	10.0	5.0	15.8	11.5		
	吸収胚	全吸収を認めた腹数	0	0	0	0	---
		早期吸収胚数	0.3	0.1	1.1	0.4	
		後期吸収胚数	0.1	0.1	0.0	0.1	

—は著変なし、^{#1} 投与時の事故による死亡、^{#2} 妊娠 25 日目に屠殺

[‡] 補正体重変化：(妊娠 29 日の BW - 妊娠 6 日の BW) - (妊娠子宮重量)

* p<0.05, ** p<0.01

母動物の体重増加量、補正体重変化、摂餌量、肝重量、黄体数、着床数、吸収胚数、着床前後胚損失 (Dunnett または Dunn 検定) 生存および死亡胎児数 (Dunnett 検定/申請者により実施)

表. 結果の概要 (続き)

所見	投与用量 (mg/kg/日)				背景対照 の範囲
	0	30	100	600	
検査腹数	21	22	21	18	
胎児体重(g) (雄)	40.86	40.06	40.10	38.15	
(雌)	40.59	38.92	38.95	37.42	
性比、雄%	49.7	45.6	54.9	46.1	
外表異常 [検査胎児数] 変異/	[191]	[218]	[187]	[167]	
小型胎児 L: (体重<28g) F:	3(14.3) 4 (2.1)	9(40.9) *16 (7.3)	6(28.6) *12 (6.4)	6(33.3) **14 (8.4)	
前肢: L: 外または内反 F:	0 (0.0) 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	2 (9.5) 2 (1.1)	0 (0.0) 0 (0.0)	
曲尾 L: F:	0 (0.0) 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	1 (5.6) 1 (0.6)	--- ---
奇形/ 臍帯ヘルニア L: F:	0 (0.0) 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	1 (5.6) 1 (0.6)	
小顎・口蓋裂・胴部 L: 短小・前肢指位置異 F: 常・曲尾	0 (0.0) 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	1 (4.8) 1 (0.5)	0 (0.0) 0 (0.0)	--- ---
胃壁破裂・前肢外 L: 反・鼻部:短鼻/浮 F: 腫・胸腔短小	0 (0.0) 0 (0.0)	1 (4.5) 1 (0.5)	0 (0.0) 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	--- ---
胃壁破裂・前/後肢 L: 外または内反・性器 F: 結節欠損・肛門閉 鎖・尾無	0 (0.0) 0 (0.0)	1 (4.5) 1 (0.5)	0 (0.0) 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	--- ---
前肢片側:無肢 L: F:	1 (4.8) 1 (0.5)	0 (0.0) 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	--- ---

L: 影響を受けた腹数 (影響を受けた腹の割合%)

F: 影響を受けた児数 (影響を受けた児の割合%)

* p<0.05、** p<0.01

胎児体重 (Dunnett または Dunn 検定)、胎児性比 (χ^2 test)、

外表異常 (Fisher 検定/申請者により実施)

表. 結果の概要 (続き)

所見	投与用量 (mg/kg/日)				背景対照 の範囲 [#]
	0	30	100	600	
内臓異常 [検査胎児数]	[191]	[218]	[187]	[167]	
[頭部検査胎児数]	[93]	[102]	[89]	[77]	
変異/ 網膜: 変	L: 1 (4.8) F: 1 (1.1)	3 (13.6) 3 (2.9)	1 (4.8) 1 (1.1)	2 (11.1) 2 (2.6)	
心房拡張/ 全肝小葉: 斑状	L: 0 (0.0) F: 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	1 (5.6) 1 (0.6)	--- ---
肺尾状葉: 欠損	L: 2 (9.5) F: 2 (1.0)	1 (4.5) 1 (0.5)	3 (14.3) 3 (1.6)	0 (0.0) 0 (0.0)	
胆嚢: 小型	L: 2 (9.5) F: 3 (1.6)	0 (0.0) 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	2 (11.1) 2 (1.2)	
腎盂: 拡張 (重症より軽度)	L: 0 (0.0) F: 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	1 (5.6) 1 (0.6)	
奇形/ 大動脈弓、上行大動 脈: 拡張・動脈幹閉 鎖・右心室小・左心 室拡張	L: 0 (0.0) F: 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	1 (5.6) 1 (0.6)	--- ---
横隔膜ヘルニア・ 全肺葉小さい	L: 1 (4.8) F: 1 (0.5)	1 (4.5) 1 (0.5)	0 (0.0) 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	--- ---
心膜水腫	L: 0 (0.0) F: 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	1 (4.8) 1 (0.5)	0 (0.0) 0 (0.0)	--- ---
右房室弁: 欠損	L: 0 (0.0) F: 0 (0.0)	1 (4.5) 1 (0.5)	0 (0.0) 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	--- ---
左心房小・右心房/ 室、上行大動脈: 拡 張・心室中隔欠損・ 左心室小・腎(両側) : 位置異常/接合	L: 0 (0.0) F: 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	1 (4.8) 1 (0.5)	0 (0.0) 0 (0.0)	--- ---
腎(両側): 欠損 副腎(両側): 肥大	L: 0 (0.0) F: 0 (0.0)	1 (4.5) 1 (0.5)	0 (0.0) 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	--- ---

L: 影響を受けた腹数 (影響を受けた腹の割合%)

F: 影響を受けた児数 (影響を受けた児の割合%)

内臓異常 (Fisher 検定/申請者により実施)

表. 結果の概要 (続き)

所見	投与用量 (mg/kg/日)				背景対照 の範囲
	0	30	100	600	
骨格異常 [検査胎児数] [頭部検査胎児数] 変異/ 頭頂骨(片/両側):分離	L: 1 (4.8) F: 1 (1.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	3 (16.7) 3 (3.3)	
第5及び第6胸骨分節:骨化遅延	L: 3 (14.3) F: 4 (2.1)	3 (13.6) 6 (2.8)	0 (0.0) 0 (0.0)	*8 (44.4) 10 (6.0)	
第7頸椎頸肋(片/両側):短縮	L: 1 (4.8) F: 1 (0.5)	2 (9.1) 2 (0.9)	1 (4.8) 1 (0.5)	3 (16.7) 5 (3.0)	
1本の肋骨(片側):分岐	L: 0 (0.0) F: 0 (0.0)	1 (4.5) 1 (0.5)	0 (0.0) 0 (0.0)	2 (11.1) 2 (1.2)	
胎児動物 奇形/ 下顎短小・口蓋分裂 鎖骨(両側)湾曲・ 前肢第4、5中節骨: 未骨化	L: 0 (0.0) F: 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	1 (4.8) 1 (0.5)	0 (0.0) 0 (0.0)	--- ---
第1,6胸骨分節分割・第2-6胸骨分節融合	L: 0 (0.0) F: 0 (0.0)	1 (4.5) 1 (0.5)	0 (0.0) 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	--- ---
骨化遅延:頭頂及び頭頂間骨、第6頸椎体、第2仙椎体 未骨化:第1頸椎体、第2胸骨分節、後肢全中節、前肢第4,5中節骨、踵骨 後頭上部分割・第3,4仙椎体及び椎弓融合・全尾椎欠損・仙椎前椎骨数25・腰椎数5	L: 0 (0.0) F: 0 (0.0)	1 (4.5) 1 (0.5)	0 (0.0) 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	--- ---
前肢片側:全骨欠損 肩甲骨(片側):歪み	L: 1 (4.8) F: 1 (0.5)	0 (0.0) 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	0 (0.0) 0 (0.0)	--- ---

L: 影響を受けた腹数 (影響を受けた腹の割合%)

F: 影響を受けた児数 (影響を受けた児の割合%)

* p<0.05、** p<0.01 骨格異常 (Fisher 検定/申請者により実施)

13. 変異原性

(1) 細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料No. 原体-22)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：2009年

検体純度： %

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA1537、TA100、TA98、TA102)を用い、ラットの肝臓から調製した代謝活性化系 (S-9mix) の存在下及び非存在下で、Amesらの方法で変異原性を検定した。試験は2回実施し、検体はジメチルスルホキシド(DMSO)に懸濁させ、1回目の試験(実験1)は3、10、33、100、333、1000、2500および5000 $\mu\text{g}/$ プレートまでの8濃度を、2回目の試験(実験2)は10、33、100、333、1000、2500および5000 $\mu\text{g}/$ プレートの7濃度を設定した。

陽性対照物質にはsodium azide (NaN_3)、4-nitro-o-phenylene-diamine (4-NOPD)、methyl methane sulfonate (MMS)、2-aminoanthracene (2-AA)を用いた。

試験は各濃度3連で実施し、2度目の試験では37°C・60分間のプレインキュベーションを行った。

用量設定根拠：

試験結果：結果を表1および2に示した。

実験1では、代謝活性化系の非存在下での2500および5000 $\mu\text{g}/$ プレートで、TA1537でのみ復帰変異体数が減少し、軽微な毒性影響を示した。しかし、その他の菌株および実験2では毒性影響は観察されなかった。

代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株および用量においても復帰変異コロニー数の増加を示さなかった。実験1および実験2のいずれも、1000 $\mu\text{g}/$ プレート以上で検体の析出が認められた。

陽性対照物質に対しては各菌株で顕著にコロニー数の増加が認められた。

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

表1 復帰変異試験成績 (実験1)

プレート法

(3反復の平均値)

薬 剤	濃 度 (μ g/プレート)	S-9mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	0	-	115	19	370	32	14
無処理	0		116	16	347	32	12
検体	3		116	19	323	34	12
	10		104	20	365	30	11
	33		122	17	380	34	11
	100		115	19	360	31	11
	333		104	21	332	31	12
	1000 †		110	20	329	28	12
2500 †	96		17	318	23	6	
5000 †	93		13	275	22	5	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	117	18	409	43	14
無処理	0		114	18	474	43	18
検体	3		115	18	388	42	15
	10		112	17	395	42	16
	33		120	19	393	35	18
	100		118	17	399	41	14
	333		120	18	392	40	18
	1000 †		107	20	386	38	16
	2500 †		83	17	366	29	10
	5000 †		85	15	370	28	7
陽性 対照	NaN ₃	10	-	1800	1706		
	4-NOPD	10				327	
		50					86
	MMS	3.0			2382		
	2-AA	2.5	+	1193	325		1161
10.0					1350		

† : 検体析出 空欄は該当なし

NaN₃ : sodium azide
 4-NOPD : 4-nitro-o-phenylene-diamine
 MMS : methyl methane sulfonate
 2-AA : 2-aminoanthracene

表2 復帰変異試験成績 (実験2)

プレインキュベーション法

(3反復の平均値)

薬 剤	濃 度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	0	-	130	15	415	29	12
無処理	0		161	14	411	27	11
検体	10		112	18	392	30	10
	33		130	15	421	33	11
	100		128	15	408	30	14
	333		117	14	386	25	11
	1000 †		122	15	393	27	9
	2500 †		108	12	348	15	6
5000 †	99	11	334	17	7		
溶媒対照 (DMSO)	0	+	143	21	504	47	15
無処理	0		187	19	614	40	17
検体	10		144	20	562	43	13
	33		136	17	537	46	12
	100		143	22	491	46	12
	333		137	16	526	40	16
	1000 †		131	11	521	36	12
	2500 †		105	10	461	28	13
5000 †	114	9	445	25	11		
陽性 対照	NaN ₃	10	1793	1776			
	4-NOPD	10				371	
		50					110
	MMS	3.0			3095		
	2-AA	2.5	+	2099	337		1782
10.0					2096		

† : 検体析出 空欄は該当なし

NaN₃ : sodium azide
 4-NOPD : 4-nitro-o-phenylene-diamine
 MMS : methyl methane sulfonate
 2-AA : 2-aminoanthracene

(2) チャイニーズハムスターV79細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験
(資料 No. 原体-23)

試験機関：

[GLP]

報告書作成年：2009年

検体純度： %

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

検体は THF (Tetrahydrofuran) に懸濁して用いた。

試験は独立して2回実施し、培養を2連、1濃度あたり200個の分裂中期像について観察した。陽性対照として (-S9mix) で EMS (Ethylmethane sulfonate) および (+S9mix) では CPA (Cyclophosphamide) を用いた。

用量設定根拠；

評価に用いた試験濃度：

実験1においては(-S9mix)および(+S9mix)条件下で、実験2では(-S9mix)条件下で強い細胞毒性が認められた事から、次の表に示した各条件での濃度の結果を染色体異常の評価に用いた。

表. 評価に用いた各条件下での試験濃度

検体濃度 ($\mu\text{g/ml}$)		S9mix	処理時間	回収時間
実験 1	9.4	-	4	18
	18.8			
	37.5			
実験 1	18.8	+	4	18
	37.5			
	75.0			
検体濃度 ($\mu\text{g/ml}$)		S9mix	処理時間	回収時間
実験 2	4.7	-	18	18
	9.4			
	18.8			
	100	+	4	18
150				
300				

試験結果：結果を次頁の表に示した。

実験 1 では(-S9mix)条件下 37.5 $\mu\text{g/ml}$ で細胞数が減少、(+S9mix)では 75 $\mu\text{g/ml}$ で分裂指数が低下し、実験 2 では(-S9mix) 18.8 $\mu\text{g/ml}$ で分裂指数が低下、(+S9mix)では 300 $\mu\text{g/ml}$ で細胞数および分裂指数が低下するなどの毒性影響（対照に対して約 50%以下）が認められた。

実験 1 でのみ、代謝活性化の有無にかかわらず、300 $\mu\text{g/ml}$ 以上で検体の析出が観察された。

いずれの実験においても代謝活性化の有無に関わらず、異常を有する分裂中期細胞数に統計学的、生物学的に有意な変化は認められなかった。

一方、陽性対照の EMS および CPA は染色体異常を持つ細胞数の明白な増加を示した。

以上の結果に基づき、検体は本試験条件においてチャイニーズハムスターV79 細胞に対して染色体異常誘発性を有しないものと判断される。

表. 結果

薬物	濃度 (μ g/ml)	S9 mix	処理 時間	回収 時間	観察 細胞 数	異常の分類										異常細胞 (%)					
						染色分体型					染色体型					その他		ギャップ			
						g	b	f	d	ex	ig	ib	if	id	cx	ma	cd	含む	除外		
実験 1 :																					
溶媒対照	0					1	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2.5	2.0		
検体	9.4	-	4	18	200	0	3	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	3.5	3.5		
	18.8					1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0	0.5
	37.5					0	4	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3.0
EMS	1000					6	16	0	0	13	0	1	0	0	0	0	0	0	0	15.5	13.0*
溶媒対照	0					1	8	0	0	2	0	2	0	0	0	0	4.0	3.5			
検体	18.8	+	4	18	200	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2.0	2.0		
	37.5					4	3	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3.5	3.0	
	75.0					2	4	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4.0	3.0
CPA	1.4					2	9	2	0	14	0	2	3	0	0	0	0	0	0	13.0	12.5*
実験 2 :																					
溶媒対照	0					0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5			
検体	4.7	-	18	18	200	0	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2.0	2.0		
	9.4					0	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1.5	1.5
	18.8					0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0	1.0
EMS	600					#	3	39	0	0	9	0	7	2	0	0	0	0	0	40.0	40.0*
溶媒対照	0					1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0	0.5			
検体	100	+	4	18	200	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.5	1.0		
	150					3	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2.0	0.5	
	300					1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.0	1.5
CPA	1.4					2	9	1	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12.0	11.0*

* : $p < 0.05$ (Fisher's exact test)

: 実験 2 の EMS は強い染色体異常誘発作用のため培養あたり細胞 50 (合計 100) 個を観察

EMS : Ethylmethane sulfonate,

CPA : Cyclophosphamide

g : 染色分体型ギャップ

ig : 染色体型ギャップ

ex : 染色分体型交換

b : 染色分体型切断

ib : 染色体型切断

cx : 染色体型交換

f : 染色分体型断片

if : 染色体型断片

ma : 重複異常

d : 染色分体型欠失

id : 染色体型欠失

cd : 染色体破損

(3) マウスを用いた小核試験

(資料No. 原体-24)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：2007年

検体純度： %

供試動物：NMRI (Cr1:NMRI BR) 系マウス、6~12週齢、1群雄各5匹、体重 37~42g

試験方法：検体を0.5% Cremophor EL 水溶液に懸濁し、250、500 及び 1000mg/kg の各用量を24時間間隔で2回腹腔内投与した。溶媒対照群には0.5% Cremophor EL 水溶液を同様に投与した。陽性対照群には cyclophosphamide を0.9%生理食塩水に希釈し、20mg/kg の用量で単回腹腔投与した。いずれの投与群も投与容量は10mL/kg とした。なお、1000mg/kg については予備動物として同様に1000mg/kg を2回投与した群を設けた。

最後の投与の24時間後に動物を屠殺し、各動物から大腿骨を採取し、骨端を開いて仔牛胎児血清中に骨髓を取り出した。1000rpm で5分間遠心して上清を除き、沈渣を攪拌して均一にしてスライドグラス上に塗抹して乾燥させ、自動染色機 (Ames Hema-Tek Slide Stainer : Miles Company) で染色した。顕微鏡で標本観察し、各動物につき2000個の多染性赤血球を検査し、小核を有する赤血球数を計測した。また、多染性赤血球に対する正染性赤血球の割合を評価した。

用量設定根拠；

結 果：結果を次頁の表に示した。

2回の検体投与後、全ての検体投与群で無関心、粗毛、体重減少、腹臥、痙れん、呼吸困難などが屠殺時まで認められ、検体が全身的に暴露されていることが示された。また、死亡は認めなかった。

全ての検体投与群で多染性赤血球に対して正染性赤血球が多かった。検体投与群で小核を有する多染性赤血球ならびに正染性赤血球数は対照群との間に統計学的有意差は認められず、生物学的にも意義のある変動は認めなかった。

一方、陽性対照群では小核を有する多染性赤血球の有意な増加が認められた。

以上の結果、検体は in vivo における本試験条件下で骨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た。

表. 試験結果

採取時間	薬 剤	投与量 (mg/kg)	観察 動物数	a)MNC /PCE2000	b)MNNCE /NCE2000	c)MNPCE /PCE2000
最終 投与 24 時間後	溶媒対照 (0.5% Cremophor)	0×2回	5	2854	2.5	3.0
	検体	250×2回	5	4338	1.0	4.0
		500×2回		5965*	2.1	3.4
		1000×2回		5021	1.2	4.4
陽性対照 (cyclophosphamide)	20×1回	5	3381	3.0	19.8*	

*; p<0.01 (Wilcoxon ranking tests)

a) MNC/PCE2000 : 多染性赤血球2000個中の正染性赤血球数

b) MNNCE/NCE2000 : 正染性赤血球2000個中に認めた小核を有する正染性赤血球数

c) MNPCE/PCE2000 : 多染性赤血球2000個中に認めた小核を有する多染性赤血球数

(4) チャイニーズハムスターV79 細胞を用いた HPRT 前進突然変異試験

(資料 No. 原体-25)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：2009年

検体純度： %

試験方法：3～5日培養し、指数関数的に増殖しているチャイニーズハムスターV79細胞保存培養を EDTA 含有塩類溶液で洗浄後、トリプシン処理して細胞懸濁液を調製した。1.5×10⁶細胞（突然変異測定用、単一培養）または5×10²細胞（生存率測定用、2検体）で10%FSC含有MEM培地に播種し、24時間後、Tetrahydrofuran (THF) で調製した検体（濃度は用量設定根拠に記載）、溶媒対照および陽性対照物質を含む無血清培地（S9mix無し、または有り）に置き換え、4時間処理した。処理後Saline Gで2回洗浄して完全培地で置き換えた。生存率測定用の培養は7日後に固定し、コロニーを染色（メチレンブルー）した。突然変異測定用の培養は3日後に継代し、7日間の発現期間の後、5個の6TG含有選択培地（変異コロニー数測定）に各3～5×10⁵個の細胞を播種し、また、2個の非選択培地（コロニー形成率）に各約500個の細胞を播種して8日間培養し、メチレンブルーを加えてコロニーを染色した。培養は2連とし、試験を2回実施した。

なお、陽性対照物質は非対代謝活性化条件ではメタンスルホン酸エチル(EMS)を、代謝活性化条件ではジメチルベンズアントラセン(DMBA)を用いた。

用量設定根拠；

各時点の細胞数やコロニー数から以下のパラメータを計算した。

(# : 結果表に示したパラメータ)

$$\begin{aligned} \# \cdot \text{生存率 (相対値)} &= \frac{\text{処理直後の平均コロニー数}}{\text{処理直後の対照の平均コロニー数}} \times 100 \\ \# \cdot \text{コロニー形成率 (相対値)} &= \frac{\text{発現期間後のコロニー形成率の絶対値}}{\text{発現期間後の対照のコロニー形成率の絶対値}} \times 100 \\ \# \cdot \text{変異コロニー数 (細胞 } 10^6 \text{ 個当り)} &= \frac{\text{TG培地播種後平均変異コロニー数} \times 10^6}{\text{生存細胞数}} \\ \# \cdot \text{変異係数} &= \frac{\text{変異コロニー数 (細胞 } 10^6 \text{ 個当り)}}{\text{対照の変異コロニー数 (細胞 } 10^6 \text{ 個当り)}} \\ \cdot \text{生存率 (絶対値)} &= \frac{\text{処理直後の平均コロニー数}}{\text{播種細胞数}} \\ \cdot \text{細胞密度 (対照に対する割合)} &= \frac{\text{継代時の細胞密度}}{\text{対照の継代時細胞密度}} \times 100 \\ \cdot \text{コロニー形成率 (絶対値)} &= \frac{\text{発現期間後の平均コロニー数}}{\text{播種細胞数}} \\ \cdot \text{生存細胞数 (TG 培地播種後)} &= \text{播種細胞数} \times \text{コロニー形成率の絶対値} \end{aligned}$$

結果：結果を次表に示す。

代謝活性化条件の有無に係わらず、検体処理による変異コロニー出現頻度の統計学的あるいは生物学的に有意な上昇は認められなかった。

陰性対照における平均変異体出現頻度はいずれも正常な範囲内であった。

各実験の濃度 75 または 100 $\mu\text{g/mL}$ 以上で検体の沈殿が観察された。

陽性対照の EMS (代謝活性化無し) および DMBA (代謝活性化有り) では、いずれも変異コロニーの顕著な増加を示した。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で変異原性を示さないと考えられる。

表 試験結果 (1回目)

薬剤	濃度 (μ g/mL)	S9 mix	生存率 ^a (%)	コロニー形成率 ^a (%)	変異コロニー数 (/10 ⁶ cells)	変異係数
溶媒対照 (THF)			100.0	100.0	10.5	1.0
			100.0	100.0	21.5	1.0
陽性対照 (EMS)	150.0		73.2	58.2	262.1	25.0
			92.3	57.7	322.5	15.0
検体	2.3	-	85.5	培養を継続しなかった [#]		
			87.8			
	4.5		88.6	107.2	13.5	1.3
			85.1	102.3	24.1	1.1
	9.0		93.9	101.1	21.8	2.1
			90.3	90.0	31.0	1.4
	18.0		76.7	110.0	15.1	1.4
			77.0	103.3	29.4	1.4
	27.0		69.4	100.7	19.9	1.9
			78.4	103.6	18.3	0.9
36.0	8.9	99.4	19.5	1.9		
	15.4	99.9	15.0	0.7		
54.0	0.0	---				
	0.0					
溶媒対照 (THF)			100.0	100.0	23.1	1.0
			100.0	100.0	16.9	1.0
陽性対照 (DMBA)	1.1		22.7	69.8	1710.2	74.2
			7.8	64.1	1209.5	71.4
検体	4.7	+	98.4	79.5	23.8	1.0
			62.0	71.5	20.7	1.2
	9.4		96.2	94.6	25.9	1.1
			72.4	75.1	15.8	0.9
	18.8		98.1	86.9	33.9	1.5
			68.1	134.3	11.4	0.7
	37.5		100.4	100.0	34.7	1.5
			77.9	78.0	16.2	1.0
	^P 75.0		81.7	94.4	19.5	0.8
			48.0	71.7	8.9	0.5
^P 150.0	0.0	---				
	0.7					

a : 対照群に対する割合(%)

P : 沈殿

: 分析可能な4つの濃度だけが最小限必要なことから、培養を継続しなかった。

--- : 細胞毒性により培養中止

EMS : メタンスルホン酸エチル

DMBA : ジメチルベンズアントラセン

表 試験結果 (2回目)

薬剤	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix	生存率 ^a (%)	コロニー形成率 ^a (%)	変異コロニー数 (/ 10^6 cells)	変異係数	
溶媒対照 (THF)			100.0	100.0	35.9	1.0	
			100.0	100.0	21.2	1.0	
陽性対照 (EMS)	75.0		107.2	112.8	189.3	5.3	
			89.6	101.7	105.8	5.0	
検体	4.5	-	97.7	112.3	12.3	0.3	
			98.1	99.7	22.1	1.0	
	9.0		87.4	89.9	35.8	1.0	
			102.1	91.7	22.6	1.1	
	18.0		86.3	113.2	23.8	0.7	
			92.0	127.3	14.5	0.7	
	27.0		46.8	144.7	14.4	0.4	
			88.6	127.5	14.7	0.7	
	36.0		13.6	126.2	1.4	0.0	
			76.6	126.2	10.5	0.5	
	45.0		2.3	---			
			36.5	---			
溶媒対照 (THF)			100.0	100.0	19.5	1.0	
			100.0	100.0	15.3	1.0	
陽性対照 (DMBA)	1.1		17.9	63.6	1207.1	61.8	
			20.7	74.4	1093.1	71.6	
検体	9.4	+	99.1	培養を継続しなかった [#]			
			113.2	培養を継続しなかった [#]			
	18.8		97.4	88.2	16.9	0.9	
			106	103.4	17.1	1.1	
	37.5		83.8	86.7	12.5	0.6	
			105.5	120.6	11.1	0.7	
	75.0		90.6	106.6	14.0	0.7	
			104.3	112.9	18.0	1.2	
	^P 100.0		75.5	110.5	33.2	1.7	
			86.9	160.6	11.9	0.8	
^P 125.0	64.7	98.1	25.1	1.3			
	89.8	147.1	9.3	0.6			

a : 対照群に対する割合(%) P : 沈殿

: 分析可能な4つの濃度だけが最小限必要なことから、培養を継続しなかった。

--- : 細胞毒性により培養中止

EMS : メタンスルホン酸エチル

DMBA : ジメチルベンズアントラセン