

(5) イヌを用いた経口投与による慢性毒性試験

(資料 36)

試験機関

(GLP対応)

報告書作成年 1998年

検体純度：

試験動物：ビーグル犬，1群雌雄各4頭，投与開始時約6カ月齢（体重；雄 7.5～9.9 kg，雌 6.9～9.4 kg）

試験期間：12カ月（1996年7月30日～1997年7月29，30，31日）

投与方法：プロベナゾールをゼラチンカプセルに充填し，0，1，5及び25 mg/kgの用量で1日1回経口投与した。

投与量設定根拠；同研究所でビーグル犬を用い，0，5，15及び50 mg/kg/dayの投与量で実施した13週間亜急性経口毒性試験において（資料35），50 mg/kg/day投与では死亡例が認められ，15 mg/kg/day投与では明らかな変化は認められなかった。したがって，本試験の最高用量を25 mg/kg/dayとし，以下公比5で除した5および1 mg/kg/dayを設定した。

試験項目及び結果：

一般状態及び死亡率；一般状態及び死亡率を毎日観察した。

投与期間を通じ死亡例は認められなかった。

プロベナゾール投与によると考えられる一般状態の変化としては，25 mg/kg群で雄の1例に軽微な眼瞼結膜および口腔粘膜の蒼白が観察された。その他，軟便あるいは水様便および嘔吐などが対照群を含む各投与群に観察されたが，これらの所見は，通常，イヌに観察されるものであり，また，その発生頻度にも明らかな群間の差は認められなかった。

体重変化；全動物について，投与開始前1週から投与期間を通じ，週1回測定した。

いずれの投与群もほぼ同様な推移を示し，投与による影響は認められなかった。

摂餌量；全動物について，投与開始前1週から解剖時まで毎日測定した。

投与による影響は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

血液学的検査；全動物について投与開始前，投与開始後 26 および 52 週に，検体投与前に撓側皮静脈から採血し，以下の項目の測定を行った。

赤血球数 (RBC)，ヘモグロビン量，ヘマトクリット値，平均赤血球容積 (MCV)，平均赤血球色素量 (MCH)，平均赤血球色素濃度 (MCHC)，血小板数 (PLT)，白血球数 (WBC)，白血球百分率 [好中球比率 (Neut%)，リン球比率 (Lymph%)，単球比率 (Mono%)，好酸球比率 (Eosin%)，網状赤血球率 (Retic%)]

以下に，対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を示す。

性別	雄									雌								
	1			5			25			1			5			25		
用量 mg/kg/day																		
検査時期 (週)	-1	26	52	-1	26	52	-1	26	52	-1	26	52	-1	26	52	-1	26	52
RBC																		85↓
MCV										107↑	105↑				106↑			105↑
MCH		104↑								107↑	106↑		105↑	106↑		105↑	106↑	
MCHC						102↑												
PLT																		152↑
WBC			75↓			66↓			75↓	78↓					77↓			
Neut%						82↓												
Lymph%							122↑	136↑										
Mono%	75↓						62↓		50↓				120↑					160↑
Eosin%						180↑												140↑
Retic%		36↓				178↑												

t-検定法 (F-検定後 Student あるいは Aspin-Welch，片側検定)

↑↑: P ≤ 0.05 ↓↓: P ≤ 0.01

表中の数値は対照群に対する変動率 (%)

#### 投与 26 週の検査

雄では，25 mg/kg 群の 1 例 (動物番号 1301) がヘマトクリット値，ヘモグロビン量，赤血球数および MCHC の低値および MCV および網状赤血球率の高値を示し，他の 1 例 (動物番号 1302) が MCV および網状赤血球率の高値を示した。その他，1 mg/kg 群の MCH および 25 mg/kg 群のリンパ球比率が高値を示したが，いずれも用量に対応しないかあるいは投与前から継続する軽微な変化であった。

雌では，対照群と比較し，25 mg/kg 群で赤血球数が低値を示した。その他，1 mg/kg 群の MCV，すべての被験物質投与群の MCH ならびに 5 および 25 mg/kg 群の単球比率が高値を，1 mg/kg 群の白血球数および網状赤血球率が低値を示したが，いずれも用量に対応しないかあるいは投与前から継続する軽微な変化であった。

#### 投与 52 週の検査

雄では，投与 26 週に引き続き，25 mg/kg 群の 1 例 (動物番号 1301) が赤血球数および MCHC の低値ならびに MCV および網状赤血球率の高値を示し，他の 1 例 (動物番号 1302) が MCV および網状赤血球率の高値を示した。その他，対照群と比較し，5 mg/kg 群の MCHC，好酸球比率および網状赤血球率が高値を，すべての被験物質投与群の白血球数，5 mg/kg 群の好中球比率，25 mg/kg 群の単球比率が低値を示したが，いずれも軽微あるいは用量に対応しない変化であった。

雌では、対照群と比較し、25 mg/kg 群の血小板数が高値を示したが、その程度は軽微であり、また、組織学的検査で骨髄においても特に変化は認められなかったことから、明確な被験物質投与による変化とは考えられなかった。その他、すべての被験物質投与群の MCV および MCH ならびに 25 mg/kg 群の好酸球比率が高値を、5mg/kg 群の白血球数が低値を示したが、いずれも用量に対応しないかあるいは投与前から継続する変化する軽微な変化であった。

血液生化学検査；血液学的検査で使用した血液から得られた血清について、多項目生化学自動分析装置を用い、以下の項目の測定を行った。

総蛋白(TP)、アルブミン、血糖、リン脂質、総コレステロール(T.cho)、中性脂肪、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(Cre)、総ビリルビン(T.Bil)、GOT、GPT、ALP、 $\gamma$ -GTP、ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン

以下に、対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を示す。

性別	雄									雌								
	1			5			25			1			5			25		
用量 (mg/kg/day)																		
検査時期 (週)	-1	26	52	-1	26	52	-1	26	52	-1	26	52	-1	26	52	-1	26	52
BUN					88↓				83↓									
GOT					117↑													
GPT		130↑							130↑									
ALP									251↑ (164)			71↓			127↑			261↑ 268↑
Cre									69↓ 70↓									64↓ 68↓
Tcho							(113)	127↑										
TP																		113↑
無機リン												105↑			85↓ 109↑			
中性脂肪																		240↑
リン脂質									120↑ 114↑									117↑ (110)
$\gamma$ -GTP								60↓ 65↓							65↓			
ナトリウム															101↑			
カリウム	93↓					114↑											111↑	105↑

t-検定法 (F-検定後 Student あるいは Aspin-Welch, 片側検定)

↑↑: P ≤ 0.05 ↓↑: P ≤ 0.01

表中の数値は対照群に対する変動率 (%) ( ) 内数字は有意差のない高値傾向

### 投与 26 週の検査

雄では、対照群と比較し、25 mg/kg 群で ALP およびリン脂質が高値を、クレアチニンが低値を示した。また、個体別にみると 2 例 (動物番号 1301, 1302) に総ビリルビンの高値が認められた。その他、5 および 25 mg/kg 群の BUN ならびに 25 mg/kg 群の  $\gamma$ -GTP が低値を、5 mg/kg 群の GOT、1 および 25 mg/kg 群の GPT、25 mg/kg 群の総コレステロールが高値を示したが、いずれも用量に対応しないかあるいは投与前から継続する軽微な変化であった。雌では、対照群と比較し、25 mg/kg 群で ALP およびリン脂質が高値を、クレアチニンが低値を示した。その他、25 mg/kg 群の総蛋白および中性脂肪、5 mg/kg 群のナトリウムが高値を示したが、いずれも軽微あるいは用量に対応しない変化であった。

### 投与 52 週の検査

雄では、対照群と比較し、25 mg/kg 群で ALP およびリン脂質が高値あるいは高値傾向を、クレアチニンが低値を示した。また、個別別にみると 1 例（動物番号 1301）に総ビリルビンの高値が認められた。その他、5 mg/kg 群のカリウムが高値を示したが、用量に対応しない軽微な変化であった。

雌では、対照群と比較し、25 mg/kg 群で ALP およびリン脂質が高値あるいは高値傾向をクレアチニンが低値を示した。その他、5 mg/kg 群の ALP、25 mg/kg 群のカリウムが高値を、5 mg/kg 群の無機リンが低値を示したが、いずれも用量に対応しないかあるいは軽微な変化であった。

血清蛋白電気泳検査；ヘナ電気泳動装置を用い、タイタンⅢセルロースアセテート膜を支持体とし、泳動した。泳動終了後ボンソーS溶液で染色し、同装置のデンストメータを用いて各分画の比率を測定した。

以下に、対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を示す。

性 別	雄						雌					
	1		5		25		1		5		25	
用量 (mg/kg/day)												
検査時期 (週)	26	52	26	52	26	52	26	52	26	52	26	52
α <sub>1</sub> グロブリン分画	116↑								77↓	88↓		
α <sub>2</sub> グロブリン分画	86↓											
γグロブリン分画											144↑	

t-検定法 (F-検定後 Student あるいは Aspin-Welch, 片側検定)

↓↑: P ≤ 0.05 ↓↑↑: P ≤ 0.01

表中の数値は対照群に対する変動率 (%)

### 投与 26 週の検査

雄では、対照群と比較し、1 mg/kg 群で α<sub>2</sub>グロブリン分画が低値を、α<sub>1</sub>グロブリン分画が高値を示したが、いずれも用量に対応しない変化であった。

雌では、対照群と比較し、5 mg/kg 群で α<sub>1</sub>グロブリン分画が低値を、25 mg/kg 群で γグロブリン分画が高値を示したが、いずれも用量に対応しないかあるいは軽微な変化であった。

#### 投与 52 週の検査

雄では、対照群と比較し、いずれの検査項目にも差は認められなかった。

雌では、対照群と比較し、5 mg/kg 群で  $\alpha_1$  グロブリン分画が低値を示したが、用量に対応しない変化であった。

尿検査；全動物について投与開始前、投与開始後 26 および 52 週に、採尿器を用いて 24 時間尿を採取し、以下の項目について検査した。

但し、\*印の項目については排尿後 3 時間以内の新鮮尿を用いた。

尿量，色調，尿比重，尿沈査\*，pH\*，潜血\*，ケトン体\*，糖\*，蛋白\*，ビリルビン\*，ウロビリノーゲン\*

雄では、投与 26 および 52 週の検査時に 25 mg/kg 群の 1 例（動物番号 1301）が黄褐色尿の排泄およびビリルビン 3+を示した。

雌では、投与 52 週の検査時に 25 mg/kg 群の雌の 1 例（動物番号 2301）が潜血 3+および蛋白の高値を示し、他の 1 例（動物番号 2304）が潜血 2+を呈した。

眼科学的検査；全動物について、投与開始前 1 週、投与開始後 26 および 52 週に行った。

各検査時のいずれの個体においても前眼部，中間透光体および眼底に異常は認められなかった。

臓器重量；投与終了時の全生存動物を対照として、以下の臓器重量を測定するとともに、対体重比を算出した。

脳，顎下腺（左，右），甲状腺（左，右），胸腺，心臓，肺，肝臓，腎臓（左，右），副腎（左，右），脾臓，精巣（左，右），卵巣（左，右）

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

以下に、対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を示す。

性 別	雄			雌		
	1	5	25	1	5	25
肝臓	実重量		137↑			115↑
	体重比		131↑			123↑
甲状腺 (右)	実重量	73↓	82↓			
	体重比		74↓			137↑
甲状腺 (左)	実重量		81↓	83↓		
	体重比					
胸腺	実重量	67↓		70↓		
	体重比	73↓		68↓		
心臓	実重量					
	体重比	115↑				88↓
腎臓 (右)	実重量					
	体重比					115↑
副腎 (右)	実重量					
	体重比					119↑
精巣 (左)	実重量					
	体重比			86↓		

t検定法 (F検定後 Student あるいは Aspin-Welch, 片側検定)

↓↑: P ≤ 0.05 ↓↑↑: P ≤ 0.01

表中の数値は対照群に対する変動率 (%)

雄では、25 mg/kg 群で肝臓の実重量および体重比が高値を、胸腺の実重量ならびに体重比が低値を示した。個体別にみると 25 mg/kg 群の2例 (動物番号 1301, 1302) が脾臓の実重量および体重比の著しい高値を示した。その他、認められた変化は片側性あるいは用量に対応しない軽微な変化であった。

雌では、25 mg/kg 群で肝臓の実重量および体重比が高値を示した。その他、認められた変化は片側性あるいは用量に対応しない軽微な変化であった。

肉眼的病理検査; 全動物について、投与終了時に剖検した。動物の外観、口腔、鼻孔および頭蓋腔、骨格、脳および脊髄の外観と切断面、胸腔、腹腔および骨盤腔とその内臓、頸部の器官および組織を検査した。

被験物質投与による影響が示唆される変化として、脾臓の肥大が 25 mg/kg 群の雄の2例に、肝臓の暗色化が 25 mg/kg 群の雌雄の全例および 5 mg/kg 群の雌の1例に、肝臓の肥大が 25 mg/kg 群の雄3例に、頭蓋骨の赤色化が 25 mg/kg 群の雄2例に観察された。

その他、心臓の結節、脾臓の癒着、リンパ節の暗色化、肺の癒着あるいは結節、膵臓の赤色化、胃の赤色斑/区域、小腸の黄色化あるいは赤色斑/区域、胆嚢の緑色斑/区域、腎臓の欠損、肥大あるいは淡明化、膀胱の赤色斑/区域、精巣および精巣上体の赤色斑/区域、子宮の結節、甲状腺の小型化、副腎の結節、眼瞼の結節および脱毛が被験物質投与群のみに散発的あるいは単発的に認められたほか、対照群でも観察された種々の自然発生性変化が認められた。

被験物質の影響による所見を次表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

性 別	雄				雌				
	投与群 (mg/kg/day)	対照	1	5	25	対照	1	5	25
所見\検査動物数	4	4	4	4	4	4	4	4	4
脾臓： 肥大				2					
肝臓： 暗色化 肥大				4 3			1	4	
頭部： 頭蓋骨の赤色化				2					

病理組織学的検査；全動物について、以下の組織について病理標本を作製し、鏡検した。

脳、下垂体、眼（角膜、水晶体、網膜および視神経）、顎下腺、耳下腺、頸部リンパ節、甲状腺および上皮小体、舌および咽頭、心臓、胸腺、肺および気管支、気管、食道、大動脈、胃（噴門部、胃底部、幽門部）、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、腸間膜リンパ節、膵臓、肝臓、胆嚢、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、膀胱、前立腺、卵巣、子宮、陰、骨格筋（下腿三頭筋）、脊髄、骨および骨髄（大腿骨および胸骨）、坐骨神経（左大腿部）、皮膚（右下腹部、雌は乳腺を含む）、その他病変部位

被験物質投与に起因して発生数の増加および程度の増強が認められたと考えられる変化として、骨髄の造血亢進が 25 mg/kg 群の雄 2 例に、肝臓の中等度のグリコーゲン沈着が 25 mg/kg 群の雄 3 例、雌全例、5 mg/kg 群の雌の 1 例に、クッパー細胞の色素沈着が 25 mg/kg 群の雄 3 例に、中等度の細胞浸潤が 25 mg/kg 群の雄 2 例、雌 1 例、5 mg/kg 群の雌 1 例に、色素沈着を伴った中等度あるいは高度の小肉芽腫が 25 mg/kg 群の雄 3 例、雌 2 例、5 mg/kg 群の雌雄各 1 例に、髄外造血が 25 mg/kg 群の雄 1 例に、肉眼的病理検査で赤色化がみられた 25 mg/kg 群の雄 2 例の頭蓋骨には、骨髄の造血亢進が認められた。なお、脾臓の色素沈着が 25 mg/kg 群の雄 2 例、対照群の雄 1 例に認められた。

被験物質投与に起因して増加および増強した組織変化を次表に示す。

性 別	雄				雌				
	投与群 (mg/kg/day)	対照	1	5	25	対照	1	5	25
所見\検査動物数	4	4	4	4	4	4	4	4	4
骨髄： 造血亢進				2					
肝臓： グリコーゲン沈着（中等度） クッパー細胞色素沈着 細胞浸潤（中等度） 小肉芽腫 <sup>1)</sup> （中等度～高度） 髄外造血				3 3 2 3 1			1 1 1	4 1 2	
頭蓋骨： 骨髄の造血亢進				2					
脾臓： 色素沈着	1			2					

1)：色素沈着を伴う

その他、心臓の血管拡張および細胞浸潤、脾臓の鬱血および鉍物沈着、リンパ節の色素沈着、胸腺の髄質増生、肺の変形、細胞浸潤、異物反応および骨化生、気管の細胞浸潤、胃の粘膜の鬱血、鉍物沈着、小肉芽腫および過剰分泌化、膵外分泌部の間質の出血および変性、空腸、回腸および結腸の粘膜の鬱血、肝臓のリンパ球浸潤および被膜の肥厚、胆嚢の嚢胞性拡張、腎臓の塞栓、膀胱の出血および鉍物沈着、精巣の間質の出血、萎縮、変性および鉍物沈着、精巣上

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

体の間質の出血，前立腺の鉍物沈着，卵巣の鉍物沈着および表皮嚢腫，卵管の拡張，子宮の間質の出血，内腔拡張および内膜細胞増生，甲状腺の C 細胞複合体およびケルスタイナー氏嚢胞，上皮小体のケルスタイナー氏嚢胞，副腎の嚢胞，涙腺の肥大，皮膚の細胞浸潤あるいは胸骨の線維性骨性病変が被験物質投与群のみに散発的あるいは単発的に認められたほか，対照群でも観察された種々の自然発生性変化が認められた。1 および 25 mg/kg の雄で胸腺の実重量および体重比の低値が認められたが，これらの組織所見は通常観察される生理的な萎縮であった。

本剤をビーグル犬に 12 カ月間反復経口投与することにより，25 mg/kg 群では，雄の 1 例に軽微な眼瞼結膜および口腔粘膜の蒼白，ヘマトクリット値，ヘモグロビン量，赤血球数および MCHC の低値ならびに MCV および網状赤血球率の高値，他の 1 例に MCV および網状赤血球率の高値，雌に赤血球数の低値が，血液生化学検査で雌雄に ALP およびリン脂質の高値ならびにクレアチニンの低値が，尿検査で雄の 1 例に黄褐色尿の排泄およびビリルビン 3+が，器官重量の測定で雌雄に肝臓の実重量および体重比の高値が，雄の 2 例に脾臓の実重量および体重比の高値が，病理肉眼所見で雌雄に肝臓の暗色化，雄に肝臓および脾臓の肥大，頭蓋骨の赤色化が，組織所見で肝臓において雌雄に中等度のグリコーゲン沈着，中等度の細胞浸潤，色素沈着を伴った中等度ないしは高度の小肉芽腫，雄にクッパー細胞の色素沈着，髄外造血，骨髄および頭蓋骨髄において雄に造血亢進が認められた。

5 mg/kg 群では，病理肉眼所見で雌に肝臓の暗色化が，組織所見で肝臓において雌雄に色素沈着を伴った中等度ないしは高度の小肉芽腫，雌に中等度のグリコーゲン沈着，中等度の細胞浸潤が認められた。

1 および 25 mg/kg の雄で胸腺の実重量および体重比の低値が認められたが，これらの組織所見は通常観察される生理的な萎縮であったこと，ならびに重量変化が投与量の増加と関連していないことから，この変化は加齢に伴うものであり，被験物質投与との関連はないと考えられた。

以上の結果から，プロベナゾールを雌雄のビーグル犬に 12 カ月間反復投与したときの影響量は 5 mg/kg/day であり，無影響量は 1 mg/kg/day であると判断された。



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

1 2) 繁殖毒性及び催奇形性

(1) マウスにおける繁殖毒性試験

(資料 21)

試験機関

報告書作成年

(改訂 1983 年)

検体の純度：プロベナゾール

試験動物：ddy 系マウス

世代繁殖 1 群 雄 23~25 匹、雌 22~25 匹

催奇形性 妊娠マウス

末期開腹群 1 群 P 世代 (5 匹)、F<sub>1</sub> 世代 (11~13 匹)

自然分娩群 1 群 P 世代 (5 匹)、F<sub>1</sub> 世代 (11 匹)

投与期間：P 世代；5 週齢より F<sub>1b</sub> 離乳時まで

F<sub>1</sub> 世代；離乳時から F<sub>2b</sub> 離乳時まで

F<sub>2</sub> 世代；離乳後から 13 週間。

(1975 年 2 月 20 日~1975 年 12 月 10 日)

投与方法：検体を 0、6、60 及び 600ppm 含有した飼料を自由に摂食させた。

投与量はあらかじめ実施した亜急性毒性試験(資料 16)の結果を参考とした。(申請者補足：この試験ではマウスに 91 日間反復強制経口投与した結果、200 mg/kg 用量で振せん、衰弱、体重減少がみられた。この用量をマウスの体重および摂餌量から換算すると混餌での 1500 ppm に相当する。今回の試験では、次世代への影響を評価する長期間投与試験であることを考慮し、親動物が出産可能でかつ何らかの毒性を発現すると考えられる 600 ppm を最高用量とし、以下 60 および 6 ppm を本試験の用量に設定した。)

方法及び試験項目：

一般状態及び死亡率：

全動物の全検査期間にわたり一般状態及び生死および中毒症状の有無などを毎日観察した。

交配及び妊娠の確認：

交配は雄 1 匹、雌 1 匹を同居させて行い、膣栓を認めた場合に交尾成立とし、この日を妊娠 0 日とした。

体重：

親動物(P 世代)：投与開始より週 1 回、妊娠期間中は妊娠 0 日(交配確認日)、7 および 14 日後に、哺育期間中は出産 0 日(出産日)、7、14、21、および 28 日後に測定した。雄は交配までとした。

仔動物(F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 世代)：胎児はと殺時に、出生後の観察動物は出産 7、14、21 および 28 日後に測定した。

摂餌量：

投与開始より週 1 回、妊娠期間中は 7 および 14 日後に、哺育期間中は出産 0 日(出産日)、7、14、21、および 28 日後に測定した。雄は交配までとした。

これらの作業手順と試験項目を次頁の表にまとめた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

世代	(週間)	作業手順	試験項目
P	生育 (13 週間)	雌雄とも検体混入飼料を 5 週令より投与。	体重摂餌量を週 1 回測定した。 雄の体重、摂餌量は交配前まで測定した。 中毒症状の有無、行動異常について観察。
	第 1 回交配	雌雄 1 : 1 で交配。交尾は陰栓で確認。(妊娠 0 日)	
	妊娠		体重は妊娠 0 日目、7 日後、14 日後に測定し、摂餌量は 7 日後、14 日後に測定した。
	F <sub>1a</sub> 出産		出産状況の確認
	第 2 回交配 (F <sub>1a</sub> 離乳後)	[第 1 回交配に準ずる。]	
	妊娠	妊娠動物のうち 5 匹は妊娠 18 日目に催奇形性検査用として帝王切開。	[第 1 回妊娠に準ずる。]
	F <sub>1b</sub> 出産		出産状況の観察
	哺育		母動物は出産後 0 日目、7 日後、14 日後、21 日後及び 28 日後に体重、摂餌量を測定、仔動物は出産 7 日後、14 日後、21 日後及び 28 日後に体重を測定、F <sub>1b</sub> は 28 日間観察し、病理解剖を行い、主要臓器重量を測定した。
	離乳	継代用 (F <sub>1</sub> 世代) として各群 20~25 匹、雌 22~24 匹を選抜。	
	F <sub>1b</sub>	生育 (13 週間)	P 世代(第 1 回交配)に準ずる。
第 1 回交配			
妊娠			
F <sub>2a</sub> 出産			[F <sub>0</sub> 世代 (F <sub>1a</sub> ) に準ずる。離乳まで観察]
第 2 回交配		P 世代(第 2 回交配)に準ずる。	[P 世代 (第 2 回交配) に準ずる。]
妊娠		妊娠動物のうち 11~13 匹は、妊娠 18 日目に催奇形性検査用として帝王切開。	
F <sub>2b</sub>	F <sub>2b</sub> 出産		[P 世代 (F <sub>1b</sub> ) に準ずる。離乳まで観察]
	哺育	[F <sub>1b</sub> 世代に準ずる。]	[F <sub>1b</sub> 世代に準ずる。]
	離乳	継代用として各群 22~38 匹、雌 22~29 匹を選抜。	
	生育 (13 週)	[P 世代に準ずる。]	[P 世代に準ずる。]

病理学的検査：

計画屠殺動物、切迫屠殺動物及び途中死亡動物について剖検し、F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>については胸腺、肺、心、肝、脾、腎、副腎、卵巣、子宮、精巣の重量を測定した。

繁殖性に関する指標：

交配・妊娠及び出産時期の観察に基づき、次の指標を算出した。

$$\text{交尾率} = \frac{\text{交尾数}}{\text{交尾に用いた雌の数}} \times 100$$

$$\text{妊娠率} = \frac{\text{妊娠数}}{\text{交尾数}} \times 100$$

交配はF<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>世代でそれぞれ2回(F<sub>1a</sub>, F<sub>1b</sub>とF<sub>2a</sub>, F<sub>2b</sub>)実施し、妊娠率、交尾率はそれらの平均を評価した。それぞれの後輩から得られた仔をF<sub>1a</sub>, F<sub>1b</sub>とF<sub>2a</sub>, F<sub>2b</sub>とし、催奇形性はF<sub>1b</sub>とF<sub>2b</sub>を対象として評価した。

催奇形性：F<sub>1b</sub>、F<sub>2b</sub>を対象に実施した。

母体：一般状態及び生死を毎日観察し、妊娠0日目、7日後、14日後に体重を測定した。また摂餌量は妊娠7日後、14日後に測定した。

妊娠18日目に帝王切開し、子宮内の着床数、生存胎仔数、死亡胚数とそれらの状態、臓器異常、腫瘍形成の有無を観察した。

死亡胚数は痕跡、早期吸収胚、後期吸収胚、死亡胎仔に分類した。

生存胎仔：体重、外形異常、性別を調べた。その後、臓器異常の有無を調べ、骨格標本を作成し、骨格異常の有無及び化骨進行度の観察を行った。

試験結果：

親動物に対する影響：(別表1)

一般状態：

P世代では、各群とも異常はみられなかったが、6ppm投与群の雄1例が死亡した。

F<sub>1</sub>世代では、各群で頭部の軽い脱毛がみられたほかに異常はみられなかった。

F<sub>2</sub>世代では、各群で異常はみられなかった。

体重：

P世代では、6ppm投与群の雄で投与初期(雄投与1,2週、雌投与1週)に対照群に比してわずかに低値を示したがその後増加し、対照群と同様に推移した。(申請者註：この変化は用量との関連がみられないことから、検体投与の影響とは考えなかった。)

600ppm投与群では、雄は投与1週から投与終了まで、雌は投与5週から妊娠7日後までの体重が、それぞれ対照群と比して有意に低く、検体投与の影響が考えられた。

F<sub>1</sub>世代では、60ppm投与群の雌で投与1~6週および9~13週に、600ppm投与群の雄で投与6,7,9週、雌で投与1~7週および9~13週に、それぞれ対照群と比して有意に低値を示し、検体投与の影響が考えられた。

F<sub>2</sub>世代では、600ppm投与群の雄で投与初期に、雌では投与期間全般にかけて対照群と比して有意に低値を示した。

摂餌量：

P世代では、6ppm投与群の雌で投与1~9週、60ppm投与群の雄で投与2週、雌で投与1~9週および投与13週、600ppm投与群では雄で投与2,5週および9~13週、雌で投与1から13週にかけて、それぞれ対照群の値と比して低値を示した。これらのうち600ppm投与群の変化は検体投与に起因するものと考えられた。(申請者意見：雌の検体投与群全般で摂餌量の低値がみられたが、この試験では、雌の対照群の摂餌量が著しく高く、特に投与前半において高値を示していた。体重1gあたりの摂餌量(g)

は、対照群の雄ではいずれの投与週でも 140%に満たないのに比して、雌の対照群摂餌量は 140~230%であった。一方、雌の 6ppm 投与群および 60ppm 投与群において体重あたりの摂餌量は雄の対照群から得られた比率とほぼ同様に推移していることから、これらの用量群においてみられた摂餌量の低値は、対照群の異常な高値に対する見かけ上の低値傾向であり、検体投与の影響によるものではないと考えた。なお、検体混合の餌は粉末状であり、外にこぼすことによって見かけの摂餌量が増加することがある。）

F<sub>1</sub> 世代では、6ppm 投与群の雄で投与 12 週に一過性の低値がみられた。（申請者註：この変化は連続性がなく、検体投与の影響とは考えなかった。）60ppm 投与群の雄で投与 10~13 週、雌で投与 4~6 週および 8, 9, 11 週に、600ppm の雄で 4, 6, および 9~13 週、雌で 4~6 および 8~13 週に、それぞれ有意な低値が認められ、検体投与の影響が考えられた。

F<sub>2</sub> 世代では、60ppm 投与群の雌、600ppm の雌雄でそれぞれ投与期間のほぼ全般にかけて有意な低値がみられた。

#### 病理検査：

P 世代では、いずれの群にも異常はみられなかった。

F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 世代では、いずれの群にも検体投与に関連すると考えられる異常はみられなかった。臓器重量では対照群との間に有意変動があったが、絶対重量及び相対重量の変動が同じ傾向を示し、かつ検体量との相関性があった臓器はみられなかったことから、これらは検体投与による変動ではないと考えられた。

#### 生殖および仔動物に及ぼす影響：

##### 交尾率、妊娠率：(別表 1)

P 世代では、妊娠、哺育期間中、中毒症状や行動異常はみられなかった。交尾率はいずれも 100%、妊娠率は 89~100%で検体投与群と対照群の間に有意差はなかった。

F<sub>1</sub> 世代では、妊娠、哺育期間中、中毒症状や行動異常はみられなかった。交尾率はいずれも 100%、妊娠率は 91~100%で検体投与群と対照群の間に有意差はなかった。

##### 胎児検査（催奇形性）：(別表 2)

P 世代親と胎児(F<sub>1</sub>)：総着床数は対照群、検体投与群ともに生存胎児数と並行しており、着床数に検体投与の影響はみられなかった。総死亡胚数は対照群 4(8.3%)、6ppm 投与群 2(5.9%)、60ppm 投与群 4(8.5%)、600ppm 投与群 5(8.2%)で有意差はみられなかった。

胎児体重は 600ppm 投与群において有意に低値を示した。（申請者註：この変化はこの群の親動物の体重低下に伴う影響と考えた。）各群とも胎児の外形異常はみられず、内臓の異常もみられなかった。骨格検査では、頸部肋骨の発現頻度が対照群 4(9.1%)、6ppm 投与群 14(43.8%)、60ppm 投与群 14(32.6%)、600ppm 投与群 3(5.4%)で 6ppm および 60ppm 投与群において有意に高かった。（申請者註：頸部肋骨は正常の動物でみられる変化であること、および 600ppm 投与群で対照群よりも減少しており用量との関連がみられないことから、検体投与に起因した変化とは考えなかった。）

F<sub>1</sub> 世代親と胎児 (F<sub>2</sub>)：総着床数は対照群、検体投与群ともに生存胎児数と並行しており、着床数に検体投与の影響はみられなかった。総死亡胚数は対照群 11(12.0%)、6ppm 投与群 11(13.6%)、60ppm 投与群 13(16.7%)、600ppm 投与群 21(20.4%)で検体投与群で総着床数に対する吸収胚数が高かったが、対照群との間に有意差はみられなかった。この現象は特定の母獣に偏っており、自然発生的にしばしば認められる変化であることから、検体による影響ではないと判断した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

胎児体重に有意な変化はみられなかった。胎児の外形異常検査および内臓検査では、いずれの群にも異常はみられなかった。骨格検査において発生頻度に対照群と有意な差があった項目は、頸部肋骨（600ppm で低下）、胸骨核位置異常（6ppm で増加）であった。（申請者註：頸部肋骨は用量の増加に伴った変化でなくかつ発生頻度の低下であり毒性的な意義はないと考えた。また、胸骨核位置異常は用量の増加に伴った頻度増加がみられないことから、検体投与との関連はないと考えた。）

以上の結果より、3世代にわたって本剤を飼料中に混入した場合、60ppm 以上の投与量は親動物に対して体重増加、摂餌量を抑制し、600ppm の投与量は胎児の体重を抑制する量であると考えられた。従って、本試験条件下における検体の無毒性量は、マウスの親動物に対して6ppm(1.1 mg/kg/day)、胎児（仔動物）に対しては60ppm(11.2 mg/kg)、繁殖能に対しては600ppm(110.2 mg/kg/day)であると考えられた。また、催奇形性については600ppm 用量(110.2 mg/kg/day)においても陰性と判断された。（投与量は申請者計算による）

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

試験結果 別表1：（親動物、繁殖能に及ぼす影響）

世代		親：F <sub>0</sub>				仔：F <sub>1a</sub> , F <sub>1b</sub>				親：F <sub>1</sub>				仔：F <sub>2a</sub> , F <sub>2b</sub>				親：F <sub>2</sub>			
投与量 (ppm)		対照群	6	60	600	対照群	6	60	600	対照群	6	60	600	対照群	6	60	600	対照群	6	60	600
動物数	雄	25	25	25	25	25	20	24	25	23	25	22	25	23	25	22	25	23	25	22	38
	雌	25	23	25	25	22	23	22	24	22	27	28	29	22	27	28	29	22	27	28	29
親動物	一般状態	—	♂1事故死	—	—	頭部に軽い脱毛	頭部に軽い脱毛	頭部に軽い脱毛	頭部に軽い脱毛	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	死亡率% (数)	雄	0	4.0 (1)	0	0	0	0	0	0	17.4	12.0	9.1	7.9	0	0	0	0	0	0	0
		雌	0	0	0	0	0	0	0	0	4.5	3.7	3.6	0	—	—	—	—	—	—	—
	体重変化	雄	—	1、2週後低値	—	1~13週後低値	—	—	—	6, 7, 9週後低値	—	—	—	1週後低値	—	—	—	—	—	—	—
		雌	—	1週後低値	—	5~妊娠7日後低値	—	—	1~6, 9~13週後低値	1~7, 9~13週後に低値	—	—	—	1~13週後低値	—	—	—	—	—	—	—
	摂餌量変化	雄	—	—	2週後低値	2, 5, 9~13週後低値	—	12週後低値	10~13週後低値	4, 6, 9~13週後低値	—	—	—	4~13週後低値	—	—	—	—	—	—	—
		雌	—	1~9, 11週後低値	1~9, 13週後低値	1~13週後低値	—	異常なし	4~6, 8, 9, 11週後低値	4~6, 8~13週後低値	—	—	—	2~5, 7, 9~13週後低値	—	—	—	—	—	—	—
	肉眼的病理検査	雄	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		雌	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	臓器重量 (絶対重量)						胸腺**、肺**、心*、脾**、腎*	↑	心**、肝**、脾**、腎**、子宮**、精巣**、↓	心**、肝**、子宮**、精巣** ↓		肺*、心*、脾* ↑	胸腺** ↑	心**、精巣* ↓							
臓器重量 (相対重量)						胸腺**、脾** ↑	胸腺**、肺**重量の増加、精巣** ↓	胸腺**、肺**、脾**、腎** ↑	肝** ↓		心* 子宮* ↑	肝* ↓	胸腺** ↑、肝** ↓								肺**、心**、子宮** ↑
繁殖能	交尾率	100	100	100	100	100	100	100	100												
	妊娠率	89	100	89	93	91	96	96	100												

\*: p < 0.05      \*\*: p < 0.01      -: 異常なし

統計解析方法：体重、摂餌量、臓器重量にはt検定、交尾率、妊娠率には順位和検定をもちいた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ノルマ株式会社にある。

試験結果 別表2：（催奇形性）

世代		親：P 仔：F <sub>1b</sub>				親：F <sub>1</sub> 仔：F <sub>2b</sub>					
投与濃度 (ppm)		対照群	6	60	600	対照群	6	60	600		
1群当り動物数		5	5	5	5	11	12	12	13		
親動物	着床所見	総着床数	48	34	47	61	92	81	78	103	
		生存胎仔数 (率)	44 (91.6%)	32 (94.1%)	43 (91.5%)	56 (91.8%)	81 (88.0%)	70 (86.4%)	65 (83.3%)	82 (79.6%)	
		総死亡胚数 (率)	4 ( 8.3%)	2 ( 5.9%)	4 ( 8.5%)	5 ( 8.2%)	11 (12.0%)	11 (13.6%)	13 (16.7%)	21 (20.4%)	
		吸収胚数	痕跡数	0	0	0	0	0	0	0	0
			早期吸収胚数	2	2	2	3	4	11	10	19
			後期吸収胚数	2	0	1	2	4	0	3	2
死亡胎仔数		0	0	1	0	3	0	0	0		
仔動物	体重 (g)	1.52±0.10	1.46±0.19	1.57±0.12	1.27±0.11**	1.23±0.15	1.23±0.17	1.28±0.24	1.24±0.14		
	性比 (雌/雄)	1.59	0.88	1.39	1.07	1.13	1.00	1.41	1.16		
	外形異常	0	0	0	0	0	1 (1.4)	0	0		
	骨格検査 (検査動物数)	(44)	(32)	(43)	(56)	(81)	(70)	(65)	(82)		
	頸部肋骨	4 ( 9.1%)	14 (43.8%)**	14 (32.6%)**	3 (5.4%)	9 (11.1%)	3 ( 4.3%)	8 (12.3%)	1 ( 1.2%)**		
	頸椎異常	0	0	2 ( 4.7%)	1 ( 1.8%)	2 ( 2.5%)	4 ( 5.7%)	2 ( 3.1%)	0		
	頸部肋骨・頸椎異常	3 ( 6.8%)	4 (12.5%)	0	0	1 ( 1.2%)	0	2 ( 3.1%)	0		
	胸骨核形成不全	1 ( 2.3%)	0	0	0	3 ( 3.7%)	5 ( 7.1%)	2 ( 3.1%)	0		
	胸骨核位置異常	0	0	1 ( 2.3%)	1 ( 1.8%)	0	4 ( 5.7%)*	0	0		
	肋骨異常	0	0	0	0	0	0	1 ( 1.5%) <sup>a)</sup>	1 ( 1.2%) <sup>b)</sup>		
	口蓋突起不全	0	0	0	0	3 ( 3.7%)	1 ( 1.4%)	0	1 ( 1.2%)		
	その他	0	0	0	0	0	0	頸部肋骨-第1肋軟骨 接合 1(1.5%) 頸部肋骨-第1肋軟骨 接合-頸椎異常 1(1.5%) 腰仙尾椎体形成不全 1(1.5%)	0		
	後肢多指	0	0	0	0	0	1 ( 1.4%)	0	0		
内臓の異常	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし			

\* : p < 0.05

\*\* : p < 0.01

a) : 13肋骨形成不全

b) : 腰部肋骨

統計解析方法：体重、生存胎児数、仙尾椎体骨化核数にはt検定、着床数、死亡・吸収胎児（胚）率、性比、外形異常率、骨格異常率および変異率、仙尾椎体骨化核数を除く骨化進行度、内臓異常率には順位和検定をもちいた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

2) ラットを用いた繁殖毒性試験

(資料 49)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2015 年

検体純度：

供試動物：Wistar Hannover ラット(BrlHan:WIST@Jc1[GALAS])、1 群当たり雌雄各 24 匹

投与開始時週齢；P 世代 5 週齢、F<sub>1</sub> 世代 3 週齢

投与開始時体重；P 世代 雄 135～160 g、雌 117～135 g

F<sub>1</sub> 世代 雄 47～87 g、雌 42～76 g

投与期間：P 世代 雌雄；育成開始(2013 年 9 月 17 日)から F<sub>1</sub> 児を離乳した後の剖検終了までの約 18 週間

F<sub>1</sub> 世代 雌雄；F<sub>1</sub> 親動物として選抜された後の育成開始(2014 年 1 月 14 日)から F<sub>2</sub> 児を離乳した後の剖検終了までの約 18～20 週間

投与方法：検体を 0、50、200 及び 800 ppm の濃度で混合した飼料を自由に摂取させた。なお、飼料に添加する際、所定量の検体を基礎飼料の一部と乳鉢内で混合し、次に所定の濃度になるよう基礎飼料を加え、混合機で攪拌した。検体を混入した飼料の保存は、安定性が保証されている期間(低温遮光条件下で 5 週間保管後、室温で 7 日間放置)を超えないようにした。対照群の動物には基礎飼料のみを同様に摂取させた。

[用量設定根拠]

同系統のラットを用い 0、50、250、1200 及び 6000 ppm の用量で実施した用量設定試験の結果、6000 ppm 群では雌雄の親動物の体重増加および摂餌が投与開始直後から著しく抑制され、この投与群の動物は予後不良と判断して投与第 2 週の時点で安楽死させた。1200 ppm 投与群では雌雄の体重、体重増加量および摂餌量が投与開始直後から実験期間中一貫して対照群の値を有意に下回った。剖検時の臓器重量では、雄の前立腺重量に有意な減少が認められた。250 ppm 投与群では、雌親動物の剖検時の臓器重量で脾臓に有意な増加が認められた。児動物に対する被験物質投与の影響は、1200 ppm 投与群では哺育 7 日以降の哺育児体重に著しい低値が認められた。これらの結果から、親動物及び児動物に検体投与の影響が予測される 800 ppm を当該試験の高用量とし、中間用量及び低用量にはそれぞれ 200 及び 50 ppm を設定した。

交配・調整・選抜及び観察・検査項目：概要を表 1 にまとめた。

親動物：



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

一般状態及び死亡；試験期間中、親動物の一般状態及び死亡の有無を毎日(1日2回)ケージの外から観察した。さらに体重測定日には詳細な検査を行った。

体重；雄の体重は、投与開始日、育成期間中と繁殖期間中は週1回及び剖検日に測定した。雌の体重は、投与開始日、育成期間中は週1回、繁殖期間中は妊娠0、7、14及び20日、哺育0、4、7、14及び21日並びに剖検日に測定した。

摂餌量；各ケージの1週間ごとの飼料消費量をそれらのケージの収容動物数と給与日数で除して、1匹当たりの1日の平均摂餌量(g/rat/day)として算出した。哺育期間中の雌については、哺育児の摂餌量を含めた1腹当たりの摂餌量として表した。交配期間中は、雌雄とも摂餌量の測定は行わなかった。

検体摂取量；雌雄について、平均体重と平均摂餌量に基づき、育成期間中及び繁殖期間中の検体摂取量(mg/kg/day)について算出した。

交尾及び妊娠の確認；交配は雌の発情を膣垢で確かめ、F<sub>1</sub>世代においては兄妹交配を避けて、同群の雄と1対1で最長2週間同居させ、膣栓又は膣垢中の精子の存在により交尾を確認した。膣栓又は膣垢中に精子が検出された日を妊娠0日とした。

繁殖性に関する指標；交配、妊娠及び分娩の観察に基づき、次の指標を調べた。

性成熟；F<sub>1</sub>親動物として選抜された全動物を対象に、性成熟の指標として雄の包皮分離を35日齢から、雌の膣開口を26日齢から毎日観察し、完了日齢及び体重を記録した。

発情周期；交配に先立って発情周期に伴う膣垢像の変化を3週間以上観察し、発情周期長(発情期から次の発情期の前日までの日数の平均値)及び発情周期正常雌率を算出した。

交尾率及び交尾所要日数；交尾の確認を膣栓の有無又は膣垢中の精子の有無によって行い、雌雄それぞれについて、次の式から交尾率を求めた。雌ごとに同居を開始した日から交尾の証拠が得られた日までの日数(交尾所要日数)を数えた。

$$\text{雄の交尾率(\%)} = (\text{交尾を認めた雄数} / \text{交配に用いた雄数}) \times 100$$

$$\text{雌の交尾率(\%)} = (\text{交尾を認めた雌数} / \text{交配に用いた雌数}) \times 100$$

受胎率；妊娠の確認を分娩の有無及び子宮内の着床痕の有無によって行い、次の式から受胎率を求めた。

$$\text{受胎率(\%)} = (\text{妊娠雌数} / \text{交尾を認めた雌数}) \times 100$$

出産率；1匹以上の生存児を出産した場合に正常出産とし、次の式から出産率を求めた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

$$\text{出産率(\%)} = (\text{正常出産雌数} / \text{妊娠雌数}) \times 100$$

妊娠期間；交尾を認めた日から分娩完了までの期間を日数で表した。

着床数；雌の剖検時に子宮内の着床痕の数を数えた。

#### 精子検査；

精巣の精子頭部数；精巣(原則として右側)から採取した精子頭部について血球計算盤を用いて計数した。

精巣上体の精子数、運動性及び形態；精巣上体尾部(原則として右側)から採取した精子の数及び運動性は、精子画像解析装置を用いて調べた。精巣上体尾部精子の形態は、10%中性緩衝ホルマリン液で固定して顕微鏡で観察した。

精巣の精子頭部数及び精巣上体尾部の精子数は、組織 1 g 当りの数として表わし、精子の運動性は、自動性を示す精子の百分率として表わした。精子の形態は、各雄につき観察した 200 個当りの正常形態精子の百分率として表わした。

#### 病理学的検査；

剖検；哺育児離乳後の全生存親動物について剖検を行った。雌親動物については、剖検前に腔垢像を観察して発情周期の段階を調べ(原則として発情前期の段階で安楽死させた)、剖検時には子宮の着床痕数を記録した。

臓器重量；剖検後、全生存親動物を対象として以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

脳、甲状腺、下垂体、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、卵巣、子宮(頸部と卵管を含む)、精巣、精巣上体、精囊(凝固腺とともに分泌物を含む)及び前立腺(腹側葉)。

病理組織学的検査；対照群及び 800 ppm 群の親動物について、哺育児を離乳できた雌雄の組を無作為に 10 組選抜し、生殖器官(卵巣、卵管、子宮(子宮角及び頸部)、腔、精巣(原則として左側)、精巣上体(原則として左側)、精囊、凝固腺及び前立腺)、下垂体及び副腎を病理組織学的に検査した。

対照群を含む全群において、交尾又は妊娠の証拠が得られなかった雌雄の組についても生殖器官、下垂体及び副腎の病理組織学的検査を実施した。

重量に再現性のある変化がみられた臓器(雄の肝臓、腎臓、脾臓および副腎；雌の肝臓、腎臓および脾臓)については、対照群と 800 ppm 群の F<sub>1</sub> 親動物について病理組織学的検査

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

査を行った。

卵巢の原始卵胞数の測定は、F<sub>1</sub>世代の対照群及び800 ppm群の雌について実施した。

#### 見動物：

一般状態及び死亡；哺育期間中、全見動物の一般状態及び死亡の有無を毎日観察した。さらに体重測定日には詳細な外表検査を行った。

産児数；哺育0日に、正常に出産した腹ごとに生存児数と死亡児数を数え、それらの合計を産児数とした。

性比；哺育0日に、腹ごとに児の性を識別し、次の式から群ごとに性比を求めた。

$$\text{性比} = \text{総雄産児数} / \text{総産児数}$$

生存率；哺育0、4、7、14及び21日における哺育児の生存率を次の式から腹ごとに求めた。

$$\text{哺育0日の生存率(\%)} = (\text{哺育0日の生存児数} / \text{産児数}) \times 100$$

$$\text{哺育4日の生存率(\%)} = (\text{哺育4日の生存児数} / \text{哺育0日の生存児数}) \times 100$$

$$\text{哺育7日の生存率(\%)} = (\text{哺育7日の生存児数} / \text{哺育4日に選抜した児数}) \times 100$$

$$\text{哺育14日の生存率(\%)} = (\text{哺育14日の生存児数} / \text{哺育4日に選抜した児数}) \times 100$$

$$\text{哺育21日の生存率(\%)} = (\text{哺育21日の生存児数} / \text{哺育4日に選抜した児数}) \times 100$$

体重；各腹について、哺育0、4、7、14及び21日に見動物の体重を測定した。哺育0日には雌雄別に1腹分まとめて測定し、哺育4日以降は個体別に測定して雌雄ごとの平均体重を算出した。母動物数を標本数として各群の平均値を算出した。

#### 病理学的検査；

剖検；哺育4日に選抜されなかった哺育児は、その日のうちに剖検した。F<sub>1</sub>世代の親動物に選抜されなかったF<sub>1</sub>離乳児及びすべてのF<sub>2</sub>離乳児は、26日齢で剖検した。哺育期間中に死亡した見動物についても、発見後速やかに剖検した。

臓器重量；F<sub>1</sub>及びF<sub>2</sub>離乳児のうち、1腹当たり雌雄各1匹について、脳、脾臓、胸腺及び子宮の重量を測定し対体重比も算出した。

肛門生殖突起間距離；すべてのF<sub>2</sub>児について、哺育4日に体重と肛門生殖突起間距離を測定した。測定値は、絶対値と相対値（絶対値を体重の立方根で除した値）で表した。母動物数を標本数として各群の平均値を算出した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

表 1. 試験の概要

世代	期間	交配・調整・選抜	観察・検査項目
P	育成 (10 週間)	雌雄 1 対 1 で交配。交尾は腔栓又は腔垢中の精子で確認(妊娠 0 日)	体重、摂餌量を週 1 回測定 投与 8 週時から少なくとも 3 週間雌の発情周期を検査
	交配 (最長 2 週間)		交配状況の観察
	妊娠 (3 週間)		母動物の体重を妊娠 0、7、14、20 日に、摂餌量を週 1 回測定
	出産	哺育 4 日に各同腹児数を雄 4 匹、雌 4 匹に調整(不可能な場合、雌雄計 8 匹)	出産状況の観察(分娩完了確認日を哺育 0 日) 産児数、死産児数、外表異常及び性別検査
	哺育 (3 週間)		母動物の体重を哺育 0、4、7、14、21 日に、摂餌量を週 1 回測定 哺育 0、4、7、14、21 日に生存児数観察、哺育児体重測定  途中死亡及び哺育 4 日に選抜されなかった児動物について剖検
	離乳		F <sub>1</sub> 親動物用の各群雌雄各 24 匹を無作為に選抜  哺育児の離乳後、全親動物について剖検、臓器重量測定、雄の精子検査  対照群と 800 ppm 群の雌雄及び不妊が疑われる動物の生殖器官、下垂体及び副腎、対照群と 800 ppm 群の F <sub>1</sub> 雄の臓器(肝臓、腎臓、脾臓、副腎)及び F <sub>1</sub> 雌の臓器(肝臓、腎臓、脾臓)について病理組織学的検査  F <sub>1</sub> 離乳児の剖検、各腹雌雄各 1 匹について脳、脾臓、胸腺及び子宮重量を測定
F <sub>1</sub>	育成 (10 週間)	(P 世代に準ずるが 兄妹交配を避けた)	P 世代に準ずるが、その他に発育指標として、包皮分離及び腔開口を観察
	交配 (最長 2 週間)		(P 世代に準ずる)
	妊娠 (3 週間)		(P 世代に準ずる)
	出産		(P 世代に準ずる)
	哺育 (3 週間)		(P 世代に準ずる) F <sub>2</sub> 児について哺育 4 日に肛門生殖突起間距離を測定
離乳	F <sub>1</sub> 親動物及び F <sub>2</sub> 離乳児の観察・検査を P 世代に準じて実施 対照群と 800 ppm 群の F <sub>1</sub> 雌親動物について、原始卵胞数を測定		

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

結 果：概要を表 2-1~2-3(親動物)及び表 3-1~3-2(児動物)に示す。

#### 親動物に対する影響

一般状態及び死亡；一般状態の観察では、両世代のいずれの投与群においても検体投与に関連した変化は認められなかった。また、実験期間中、親動物の死亡はみられなかった。

体重；50 及び 200 ppm 投与群の雌雄の平均体重には、検体投与の影響は認められなかった。800 ppm 投与群では、実験のほぼ全期間にわたって雌雄の親動物の平均体重に对照群と比較して有意な低値が認められた。

体重増加量；50 及び 200 ppm 投与群の雌雄の平均体重増加量には、検体投与の影響は認められなかった。200 ppm 投与群の F<sub>1</sub> 雌の哺育 0-4 日において、統計学的な有意差がみられたが、これはこの期間だけの一過性変化であり、検体投与とは関連のないものと考えられた。800 ppm 投与群では、実験のほぼ全期間にわたって雌雄の親動物の平均体重増加量に对照群と比較して有意な低値が認められた。

摂餌量；50 及び 200 ppm 投与群の雌雄の平均摂餌量には、検体投与の影響は認められなかった。800 ppm 投与群では、雌雄の平均摂餌量に有意な低値が散発的にみられた。

繁殖能に関する指標：

性成熟；F<sub>1</sub> 世代の動物の性成熟について、包皮分離又は腔開口を指標として調べた結果、50 及び 200 ppm 投与群では検体投与の影響は認められなかった。

800 ppm 投与群では包皮分離及び腔開口の完了日齢が有意に高かった。また、完了日の体重は雄では对照群よりも有意に低く、雌では对照群の値と同等であった。この結果を受けて F<sub>2</sub> 世代の児動物について肛門生殖突起間距離を測定したが、検体投与の悪影響は認められなかった。したがって、性成熟の遅延は、実験のほぼ全期間にわたってみられた体重増加抑制にもとづく発育抑制による変化と考えられた。

発情周期；正常な周期性を示す動物の頻度(発情周期正常雌率)には、对照群と投与群との間で統計学的に有意な差は認められなかった。

交尾率；P 及び F<sub>1</sub> 世代の雌雄の交尾率および同居開始から交尾までの日数(交尾所要日数)について、对照群と投与群との間で有意な差は認められなかった。

受胎率；いずれの世代の受胎率にも、对照群と投与群の間で有意な差は認められなかった。

出産率；いずれの世代の出産率も、对照群を含むすべての群で 100.0%であった。

妊娠期間；P 及び F<sub>1</sub> 世代の雌の妊娠期間について、50 及び 200 ppm 投与群では对照群との間

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

で有意な差は認められなかった。

800 ppm 投与群では、P 世代の平均妊娠期間は対照群と同じ値であったが、F<sub>1</sub> 世代では対照群の平均妊娠期間 22.0 日（妊娠期間の範囲：22～23 日；妊娠 23 日の雌は 1 匹）に対して 22.4 日（妊娠期間の範囲：22～23 日；妊娠 23 日の雌は 8 匹）であり、対照群と 800 ppm 投与群との間で統計学的に有意な差がみられた。実験に使用したラットの系統における妊娠期間が通常 21～24 日の範囲であること、ならびに 800 ppm 投与群の F<sub>1</sub> 雌親動物では分娩状態の観察で異常出産が認められていないことを考慮すると、800 ppm 投与群の F<sub>1</sub> 雌親動物での平均妊娠期間の有意な高値は検体投与の悪影響とは考えられなかった。

着床数；P 及び F<sub>1</sub> 雌親動物の着床数について、50 及び 200 ppm 投与群では対照群との間で有意な差は認められなかった。

800 ppm 投与群では、P 及び F<sub>1</sub> 世代の平均着床数は対照群と比較して低く、F<sub>1</sub> 世代では対照群と 800 ppm 投与群との間で統計学的に有意な差が認められた。着床数の低下は、検体投与による影響と判断されるが、性成熟、発情周期、交尾率、受胎率、出産率、精子に関する指標、児動物の性比、並びに F<sub>2</sub> 児での肛門生殖突起間距離といった繁殖能に関わる指標で悪影響を示唆する変化は何も認められていないことから、長期間にわたる体重増加と摂餌の抑制といった一般毒性徴候、すなわち全身状態／栄養状態の不良に由来する二次的な変化ではないかと考えられ、繁殖能に対する悪影響とは判断されなかった。

精子検査；P 及び F<sub>1</sub> 世代の雄親動物における精巣の精子頭部数には、対照群と投与群との間で有意な差は認められなかった。

P 及び F<sub>1</sub> 世代の雄親動物における精巣上体尾部の精子数、運動率及び正常形態率について、50 及び 200 ppm 投与群では検体投与の影響は認められなかった。

800 ppm 投与群では、P 世代の精巣上体尾部 1 g 当りの精子数を除き、いずれの測定項目においても対照群との間で統計学的に有意な差は認められなかった。P 世代の精巣上体尾部 1 g 当りの精子数にみられた有意差は、精巣上体尾部当りの精子数で有意差は認められなかったこと、並びに F<sub>1</sub> 世代の精巣上体尾部 1 g 当りの精子数に再現性がみられなかったことを考慮すると、検体投与とは関連性のない偶発的変動と考えられた。

剖検所見；親動物の剖検では、両世代のいずれの投与群においても検体投与に関連した所見は認められなかった。

臓器重量；50 及び 200 ppm 投与群では、いずれの世代においても臓器重量に検体投与の影響は認められなかった。200 ppm 投与群の P 世代では、雄の肝臓の対体重比と雌の腎臓の対体重比に有意差がみられたが、絶対重量で有意差はみられなかったこと、並びに F<sub>1</sub> 世代の臓器重量に再現性が認められなかったことを考慮すると、検体投与とは関連性のない

偶発的変動と考えられた。

800 ppm 投与群では、P 及び F<sub>1</sub> 雄で副腎、腎臓及び脾臓の対体重比並びに F<sub>1</sub> 雄で肝臓の対体重比が対照群の値より高く、統計学的な有意差が認められた。同群の雌では、P 及び F<sub>1</sub> 世代で肝臓、腎臓及び脾臓の対体重比に有意な高値がみられた。800 ppm 投与群の P または F<sub>1</sub> 世代では、この他の種々の臓器の絶対重量または対体重比で有意差がみられたが、いずれも剖検時の平均体重の有意な低値にもとづいた毒性学的意義に乏しい変動と判断された。

病理組織学的所見；対照群及び 800 ppm 投与群の生殖器官、下垂体及び副腎には検体投与の影響は認められなかった。児動物が得られなかった雌雄においても、生殖器官、下垂体及び副腎に検体投与に関連すると考えられる異常は認められなかった。

臓器重量に再現性のある変化がみられた F<sub>1</sub> 雄の肝臓、腎臓、脾臓および副腎、ならびに F<sub>1</sub> 雌の肝臓、腎臓および脾臓についての検査では、所見の出現頻度に対照群と 800 ppm 投与群の間で統計学的に有意な差はみられず、検体投与の影響は認められなかった。

800 ppm 投与群の F<sub>1</sub> 雌の平均原始卵胞数は対照群の値と同等であった。

#### 児動物に対する影響

一般状態及び死亡；いずれの世代においても、検体投与に関連した変化は認められなかった。

産児数；F<sub>1</sub> 及び F<sub>2</sub> の平均産児数には、50 及び 200 ppm 投与群では対照群との間で有意な差は認められなかった。

800 ppm 投与群では、F<sub>1</sub> 及び F<sub>2</sub> の平均産児数が対照群と比較して低く、統計学的に有意な差が認められたが、800 ppm 投与群における産児数の低下は、同群での着床数の低下にもとづく変化と考えられた。

性比；F<sub>1</sub> 及び F<sub>2</sub> 哺育児の性比には、対照群と投与群の間で有意な差は認められなかった。

生存率；F<sub>1</sub> 及び F<sub>2</sub> 哺育児の生存率には、いずれの時点においても対照群と投与群の間で有意な差は認められなかった。

体重；50 及び 200 ppm 投与群の雌雄の F<sub>1</sub> 及び F<sub>2</sub> 哺育児の平均体重には、哺育期間を通じて対照群と投与群の間で有意な差は認められなかった。

800 ppm 群では、雌雄の F<sub>1</sub> 哺育児の哺育 7 日以降及び F<sub>2</sub> 哺育児の哺育 14 日以降における平均体重が対照群の値より有意に低かった。

剖検所見；哺育 0～4 日に死亡した児動物、哺育 4 日に淘汰した児動物及び離乳児の剖検では、

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

検体投与に関連した異常は認められなかった。

800 ppm 投与群の哺育 5～21 日に発見された死亡児と 26 日齢の離乳児の剖検では、F<sub>1</sub> 哺育児で腎臓における腎盂拡張の出現率に有意差がみられたが、その値は対照群と比較して低く、検体投与とは関係ない変動と判断された。

臓器重量；50 及び 200 ppm 投与群では、いずれの世代においても臓器重量に検体投与の影響は認められなかった。200 ppm 投与群の F<sub>1</sub> 離乳児では、雌の胸腺の絶対及び対体重比に有意差がみられたが、同群の雄の F<sub>1</sub> 及び F<sub>2</sub> 離乳児の胸腺の絶対重量では対照群との間で有意差はみられなかったこと、並びに雌の F<sub>2</sub> 離乳児の胸腺の臓器重量に再現性が認められなかったことを考慮すると、検体投与とは関連性のない偶発的変動と考えられた。

800 ppm 投与群では、雌雄の F<sub>1</sub> 及び F<sub>2</sub> 離乳児の脳、脾臓、胸腺及び子宮の絶対重量で有意な低値がみられ、脳の対体重比では有意な高値がみられたが、いずれも剖検時の平均体重の有意な低値にもとづいた毒性学的意義に乏しい変動と判断された。この他、雌雄の F<sub>1</sub> 離乳児の胸腺の対体重比で対照群と比べて有意な低値がみられたが、雌雄の F<sub>2</sub> 離乳児の胸腺の対体重比に対照群との間で統計学的に有意な差は認められなかったことから、これは検体投与とは関連性がなく、再現性のない変動であったと考えられた。

肛門生殖突起間距離；F<sub>2</sub> 世代の児動物の肛門生殖突起間距離について、雄では絶対値に対照群と投与群との間で有意な差は認められず、相対値についても投与群の値は対照群の値とほぼ同じ、あるいは対照群と比較して有意な高値であり、F<sub>2</sub> 雄児の肛門生殖突起間距離に検体投与の悪影響は認められなかった。雌の肛門生殖突起間距離の絶対値および相対値に対照群と投与群との間で統計学的に有意な差は認められなかった。

以上より、本試験における一般毒性に対する無毒性量は、親動物及び児動物で 200 ppm (P 雄：11.1 mg/kg/day、P 雌：17.9 mg/kg/day、F<sub>1</sub> 雄：12.7 mg/kg/day、F<sub>1</sub> 雌：19.3 mg/kg/day)、繁殖能力に対する無毒性量は 800 ppm (P 雄：45.7 mg/kg/day、P 雌：71.4 mg/kg/day、F<sub>1</sub> 雄：53.9 mg/kg/day、F<sub>1</sub> 雌：77.9 mg/kg/day) であると結論される。



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

表 2-1. 結果の概要－親動物

世代		親動物：P、児動物：F <sub>1</sub>				親動物：F <sub>1</sub> 、児動物：F <sub>2</sub>				
用量 (ppm)		0	50	200	800	0	50	200	800	
動物数	雄	24	24	24	24	24	24	24	24	
	雌	24	24	24	24	24	24	24	24	
一般状態		検体投与に関連した異常は認められなかった。								
死亡数/ 切迫殺数	雄	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	
	雌	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	
体重	雄				2-17 週 ↓/↓ 最終体重 ↓				0-17 週 ↓ 最終体重 ↓	
	雌				4-10 週 ↓/↓ 妊娠 0-20 日↓ 哺育 4-21 日↓ 最終体重 ↓				0-10 週 ↓ 妊娠 0-20 日↓ 哺育 0-21 日↓ 最終体重 ↓	
体重 増加量	雄				0-1 週～ 0-18 週 ↓/↓				0-1 週～ 0-18 週 ↓	
	雌				0-2 週～ 0-10 週 ↓/↓ 妊娠 0-20 日↓ 哺育 0-4 日～ 0-14 日↓ 0-18 週↓		哺育 0-4 日↓		0-1 週～ 0-10 週 ↓/↓ 妊娠 0-7 日, 0-20 日 ↓/↓ 哺育 0-4 日～ 0-14 日↓ 0-18 週↓	
摂餌量	雄				3-6 週 ↓/↓		12, 14, 16, 17 週 ↑		1-10 週 ↓/↓ 16 週↓	
	雌				3-10 週 ↓/↓ 哺育 0-7 日～ 7-14 日 ↓/↓				1-2 週, 4-10 週 ↓/↓ 妊娠 7-14 日～ 14-20 日 ↓/↓ 哺育 0-7 日～ 14-21 日 ↓/↓	
検体 摂取 量 <sup>a)</sup>	育成 期間	雄	—	3.16	12.7	51.6	—	3.76	15.0	62.7
		雌	—	3.86	15.3	60.2	—	4.31	17.3	70.0
	繁殖 期間	雄	—	2.17	8.5	35.9	—	2.32	8.9	39.2
		雌	—	5.71	22.3	90.1	—	5.71	22.6	91.2
	全 期間	雄	—	2.79	11.1	45.7	—	3.22	12.7	53.9
		雌	—	4.55	17.9	71.4	—	4.83	19.3	77.9

<sup>a)</sup>：期間の平均値 (mg/kg/day)

↑↓：p<0.05、↑↑：p<0.01 [一元配置分散分析法/Dunnett の多重比較検定法又は Kruskal-Wallis の検定法/Dunnett 型のノ  
ンパラメトリック多重比較検定法(体重、体重増加量、摂餌量)]

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

表 2-2. 結果の概要—親動物(続き)

世 代			親動物：P、児動物：F <sub>1</sub>				親動物：F <sub>1</sub> 、児動物：F <sub>2</sub>				
用量(ppm)			0	50	200	800	0	50	200	800	
動物数		雄	24	24	24	24	24	24	24	24	
		雌	24	24	24	24	24	24	24	24	
親動物	性成熟 <sup>b</sup>	包皮分離完了	日齢	—				40.6	40.4	40.6	42.3↑
			体重(g)	—				183	185	185	168↓
	陰開口完了	日齢	—				31.3	31.1	32.0	35.4↑	
		体重(g)	—				103	103	107	107	
	発情周期長(日) <sup>b</sup>	4.0	4.1	4.0	4.0	4.1	4.1	4.0	4.4		
	発情周期正常雌率(%) <sup>b</sup>	23/24 (95.8)	24/24 (100.0)	23/24 (95.8)	24/24 (100.0)	24/24 (100)	24/24 (100.0)	23/24 (95.8)	24/24 (100.0)		
	雄の交尾率(%) <sup>b</sup>	24/24 (100.0)	24/24 (100.0)	24/24 (100.0)	24/24 (100.0)	24/24 (100.0)	24/24 (100.0)	24/24 (100.0)	24/24 (100.0)		
	雌の交尾率(%) <sup>b</sup>	24/24 (100.0)	24/24 (100.0)	24/24 (100.0)	24/24 (100.0)	24/24 (100.0)	24/24 (100.0)	24/24 (100.0)	24/24 (100.0)		
	交尾所要日数(日) <sup>b</sup>	1.0	1.0	1.0	1.2	1.3	1.0	1.2	1.8		
	受胎率(%) <sup>b</sup>	24/24 (100.0)	23/24 (95.8)	23/24 (95.8)	24/24 (100.0)	23/24 (95.8)	22/24 (91.7)	24/24 (100.0)	22/24 (91.7)		
	出産率(%) <sup>b</sup>	24/24 (100.0)	23/23 (100.0)	23/23 (100.0)	24/24 (100.0)	23/23 (100.0)	22/22 (100.0)	24/24 (100.0)	22/22 (100.0)		
	妊娠期間(日) <sup>b</sup>	22.2	22.1	22.1	22.2	22.0	22.1	22.2	22.4↑		
	着床数 <sup>b</sup>	12.4	12.6	12.9	11.3	12.5	11.5	11.4	10.0↓		
精子検査 <sup>b</sup>	精巢精子頭部数(×10 <sup>6</sup> /g)	143	144	143	139	141	137	136	135		
		792	740	770	726↓	736	783	752	757		
	運動率(%)	92.6	93.3	95.2	93.6	96.0	94.3	95.3	95.2		
		正常形態率(%)	98.7	98.2	98.5	98.5	97.9	98.8	98.6	98.2	

<sup>b</sup>: 数値は群平均値

↑↓: p<0.05, ↑↓: p<0.01 [一元配置分散分析/Dunnettの多重比較検定法又はKruskal-Wallisの検定法/Dunnett型のノンパラメトリック多重比較検定法(性成熟完了体重、着床数、精巢精子頭部数、精巢上体精子数)、Kruskal-Wallisの検定法/Dunnett型のノンパラメトリック多重比較検定法(性成熟完了日齢、発情周期長、交尾所要日数、妊娠期間、精子運動率、精子正常形態率)、Fisher直接確率計算法(発情周期正常雌率、交尾率、受胎率、出産率)]

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

表 2-3. 結果の概要—親動物(続き)

世代		親動物：P、児動物：F <sub>1</sub>				親動物：F <sub>1</sub> 、児動物：F <sub>2</sub>					
用量(ppm)		0	50	200	800	0	50	200	800		
動物数	雄	24	24	24	24	24	24	24	24		
	雌	24	24	24	24	24	24	24	24		
剖検所見		検体投与に関連した異常は認められなかった。									
剖検日体重 (g) <sup>b</sup>	雄	458	447	453	428↓	469	477	470	407↓		
	雌	265	266	263	247↓	271	271	267	236↓		
親動物 臓器重量 <sup>b</sup>	雄	肝臓	A	13634	12899	12781	13043	14454	14597	14134	13116↓
			R	2.98	2.89	2.82↓	3.04	3.08	3.06	3.00	3.22↑
		副腎	R	0.0128	0.0134	0.0135	0.0144↑	0.0138	0.0133	0.0137	0.0153↑
		腎臓	R	0.564	0.577	0.562	0.612↑	0.575	0.568	0.574	0.627↑
		脾臓	R	0.142	0.143	0.143	0.158↑	0.143	0.146	0.142	0.159↑
		脳	A	2007	2021	2011	1955↓	2035	2040	2049	1907↓
	R		0.441	0.454	0.446	0.459	0.435	0.429	0.439	0.472↑	
	下垂体	A	10.4	10.1	10.6	10.0	10.4	10.3	10.5	9.0↓	
	精巣	R	0.771	0.817	0.799	0.833↑	0.786	0.789	0.813	0.875↑	
	精巣 上体	R	0.273	0.285	0.285	0.286	0.259	0.264	0.268	0.288↑	
	甲状腺	A	21.0	21.8	22.0	21.2	23.2	23.8	24.2	20.1↓	
	雌	肝臓	R	3.97	4.10	4.08	4.59↑	4.15	4.23	4.26	4.92↑
			A	1901	1958	1991	1999	2043	2094	2076	1973
		腎臓	R	0.716	0.737	0.758↑	0.811↑	0.753	0.773	0.779	0.837↑
			R	0.203	0.201	0.208	0.224↑	0.202	0.205	0.214	0.223↑
		脳	A	1832	1847	1833	1711↓	1845	1845	1848	1671↓
		下垂体	A	14.3	14.5	13.9	13.3	13.5	13.7	13.1	11.7↓
	副腎	A	78.2	81.3	80.9	71.0↓	80.9	84.6	81.7	68.3↓	
卵巣	A	104.3	107.0	105.5	93.1↓	104.3	112.2	109.2	88.8↓		
子宮	A	1026	997	1066	857↓	1033	1049	1044	857↓		
甲状腺	A	17.7	17.7	17.0	15.8↓	17.5	17.9	16.9	15.1↓		
病理組織学的所見		検体投与に関連した異常は認められなかった。									
原始卵胞数 <sup>b</sup>		—				337	—	—	351		

<sup>b</sup>: 数値は群平均値、A: 絶対重量(mg)、R: 対体重比(%)

↑↓: p<0.05、↑↑↓: p<0.01 [一元配置分散分析/Dunnettの多重比較検定法又はKruskal-Wallisの検定法/Dunnett型のノンパラメトリック多重比較検定法(剖検日体重、臓器重量)、F検定/Studentのt検定又はF検定/Aspin-Welchの検定(原始卵胞数)]

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

表 3-1. 結果の概要—児動物

世代		親動物：P、児動物：F <sub>1</sub>				親動物：F <sub>1</sub> 、児動物：F <sub>2</sub>					
用量 (ppm)		0	50	200	800	0	50	200	800		
検査腹数		24	23	23	24	23	22	24	22		
児動物	一般状態	検体投与に関連した異常は認められなかった。									
	産児数 <sup>b</sup>	12.0	12.1	12.3	10.6↓	11.8	10.8	10.8	9.6↓		
	性比	0.484	0.473	0.479	0.510	0.511	0.475	0.463	0.517		
	生存率 (%) <sup>b</sup>	哺育0日	98.3	100.0	99.7	99.6	99.3	100.0	100.0	99.2	
		哺育4日	100.0	100.0	99.7	100.0	99.4	99.6	99.7	99.0	
		哺育7日	100.0	100.0	99.5	100.0	97.8	99.4	97.4	98.9	
		哺育14日	100.0	100.0	98.9	100.0	94.0	99.4	96.9	94.9	
		哺育21日	100.0	100.0	98.9	100.0	94.0	99.4	96.9	94.9	
	体重 (g) <sup>b</sup>	哺育0日	雄	6.1	6.0	6.0	6.1	6.0	6.1	6.1	6.1
			雌	5.8	5.7	5.7	5.8	5.7	5.8	5.8	5.7
		哺育4日	雄	10.9	10.7	10.7	10.7	10.0	10.9	10.8	10.3
			雌	10.6	10.3	10.3	10.3	9.8	10.5	10.5	10.0
		哺育7日	雄	17.9	17.8	17.5	16.5↓	15.9	17.5↑	16.8	14.9
			雌	17.3	17.1	16.9	16.0↓	15.6	16.8	16.5	14.6
		哺育14日	雄	36.5	37.1	36.4	32.7↓	33.7	36.0↑	34.4	29.4↓
			雌	35.4	35.5	35.3	31.9↓	33.2	34.7	34.1	29.1↓
		哺育21日	雄	59.2	59.5	58.8	51.7↓	55.4	57.5	55.8	47.8↓
			雌	56.5	56.3	56.3	49.8↓	53.7	55.5	54.2	46.6↓
	剖検所見：	検体投与に関連した異常は認められなかった。									
	腎臓；腎盂拡張 [腹毎の出現率 (%) <sup>b</sup> ]		13.2	12.3	5.1	0.7↓	10.6	5.2	5.4	2.9	
離乳児剖検日 体重 (g) <sup>b</sup>	雄	85	83	83	74↓	79	82	80	67↓		
	雌	78	78	77	69↓	73	76	74	64↓		
臓器重量 <sup>b</sup>	雄	脳	A	1555	1555	1550	1470↓	1519	1540	1541	1434↓
			R	1.85	1.87	1.86	2.00↑	1.94	1.88	1.93	2.14↑
		脾臓	A	339	342	353	289↓	320	350	336	257↓
			R	0.400	0.411	0.424	0.389	0.406	0.427	0.420	0.381
		胸腺	A	331	311	301	257↓	296	312	297	255↓
			R	0.394	0.373	0.360	0.347↓	0.377	0.380	0.371	0.378
	雌	脳	A	1488	1491	1482	1429↓	1468	1480	1466	1392↓
			R	1.91	1.92	1.93	2.08↑	2.02	1.94	1.99	2.16↑
		脾臓	A	310	313	295	256↓	280	300	274	234↓
			R	0.396	0.403	0.384	0.369	0.384	0.393	0.372	0.364
		胸腺	A	318	288	280↓	250↓	280	294	277	244↓
			R	0.407	0.371	0.365↓	0.364↓	0.383	0.385	0.374	0.379
		子宮	A	81.1	74.9	77.0	61.9↓	72.6	71.5	71.1	55.4↓
			R	0.1036	0.0968	0.1006	0.0897	0.0998	0.0935	0.0960	0.0858

<sup>b</sup>：数値は群平均値、A：絶対重量(mg)、R：対体重比(%)

↑↓：p<0.05、↑↑↓：p<0.01 [一元配置分散分析/Dunnettの多重比較検定法又はKruskal-Wallisの検定法/Dunnett型のノンパラメトリック多重比較検定法(産児数、児の体重、児の臓器重量)、Kruskal-Wallisの検定法/Dunnett型のノンパラメトリック多重比較検定法(児の生存率、腹毎の所見の出現率)、Fisher直接確率計算法(児の性比)]

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

表 3-2. 結果の概要－児動物

世 代		親動物：P、児動物：F <sub>1</sub>				親動物：F <sub>1</sub> 、児動物：F <sub>2</sub>				
用量 (ppm)		0	50	200	800	0	50	200	800	
検査腹数		24	23	23	24	23	22	24	22	
児動物	雄	肛門生殖突起間距離 <sup>b</sup>	—				10.2	10.7	10.7	10.2
		哺育4日体重(g)	—				4.62	4.83	4.72	5.00
		絶対値 (mm)	—				0.214	0.219	0.215	0.230↑
	雌	肛門生殖突起間距離 <sup>b</sup>	—				9.9	10.4	10.3	9.9
		哺育4日体重(g)	—				2.17	2.27	2.27	2.31
		絶対値 (mm)	—				0.1011	0.1041	0.1044	0.1074

<sup>b</sup>：数値は群平均値

↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01 [一元配置分散分析/Dunnett の多重比較検定法又は Kruskal-Wallis の検定法/Dunnett 型のノンパラメトリック多重比較検定法 (肛門生殖突起間距離)]

(2) ラットにおける催奇形性

(資料 23)

試験機関  
報告書作成年 1986 年

[GLP 対応]

検体純度：プロベナゾール

試験動物：Wistar 系妊娠ラット (12 週令) 1 群 25 匹

試験期間：1981 年 4 月 4 日～1981 年 7 月 31 日

方 法： 薬量設定試験 (安評センターにて実施) では、母動物が 400 mg/kg 群で投与期間中に死亡または瀕死状態となり、妊娠 20 日時点での胎仔は得られなかったが、200 mg/kg 群では体重増加の抑制だけが認められたこと、胎仔では 100 mg/kg 以上の群で雄雌の体重が減少したが、10 mg/kg では雄の体重がわずかに減少しただけであったことから、本試験における投与量は 200 mg/kg を高薬量として、以下 1/10 公比にて 20 および 2 mg/kg とした。

検体を 0.25 %カルボキシメチルセルロース (CMC・Na) 水溶液に懸濁希釈し、2、20 及び 200 mg/kg の投与レベルで妊娠後 7 日目から 17 日目までの 11 日間、毎日 1 回経口投与した。なお、対照群には 0.25% CMC・Na を同様に投与した。交尾は雄雌とも 12 週令で 1 対 1 で終夜同居させ膣垢中に精子を確認した雌を交尾成立とし、妊娠 0 日とした。

試験項目

母 体： 一般状態及び生死を毎日観察し、妊娠 0、4、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 及び 20 日に体重を測定した。

妊娠 20 日目に帝王切開し、黄体数、着床数、吸収胚数、生存及び死亡胎仔数を検査した。

帝王切開時に母動物を剖検し、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、卵巣、子宮について臓器重量を測定し (絶対重量)、体重から相対重量を算出した。

生存胎仔： 性別、体重及び外形異常の観察を行った。

約 1/2 の胎仔については骨格標本作製し、骨格異常の有無を検査した。

残りの胎仔については内蔵異常の有無を検査した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

結果：

投与群 (mg/kg/day)		対照	2	20	200	
1群当り動物数		25	25	25	25	
親動物	一般状態	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	
	死亡率	0	0	0	4.8% (誤投与による死亡)	
	妊娠率(数)	92.0 % (23)	92.0 % (23)	88.0 % (22)	84.0 % (21)	
	体重(妊娠7日~20日、g)	56±7.6	51±10.7*	55±9.3	31±14.5**	
	総飼料摂取量(g)	83±5.5	82±4.9	84±6.7	76±10.4**	
	副腎重量 <sup>d</sup> 絶対重量 (mg)	46±6	45±8	49±9	52±8*	
		相対重量 (mg%)	23.269±2.831	22.851±3.914	24.851±4.150	28.643±4.265**
	検査母獣数	23	23	22	20	
	胎盤重量 (mg)	389±29.3	423±68.2	397±37.7	333±25.8**	
	着床所見	黄体数	10.6±1.1	10.1±1.3	10.6±1.2	10.3±1.3
		着床数(率 <sup>a)</sup> )	8.5±1.5(80.3)	6.8±3.6(67.4)	8.0±2.6(75.6)	8.2±2.3(79.1)
		生存胎仔数(率 <sup>b)</sup> )	8.2±1.6(95.9)	6.6±3.4(96.2)	7.7±2.5(95.5)	7.6±2.9(93.3)
		死亡・吸収胚総数(率 <sup>b)</sup> )	8(4.1)	6(3.8)	8(4.5)	11(6.7)
		(初期吸収数)	(7)	(5)	(6)	(11)
(後期吸収数)		(0)	(0)	(1)	(0)	
(死亡胎仔数)		(1)	(1)	(1)	(0)	
胎仔動物	体重(g) ♂	3.13±0.1	3.18±0.2	3.03±0.3	2.54±0.2**	
	♀	2.90±0.1	3.01±0.2*	2.86±0.3	2.41±0.1**	
	性別(匹) ♂	101	82	86	80	
	♀	87	69	83	72	
	外形検査	異常なし	異常なし	異常なし	矮小仔(1例)	
	骨格検査					
	胸骨核未骨率(%)	11.6	12.8	17.0	34.8**	
	前肢基節骨化骨率(%)	10.6	13.8	11.8	0.0**	
	後肢基節骨化骨率(%)	99.3	94.5	94.3	82.2*	
	仙尾椎化骨率(%)	8.4±0.3	8.0±0.5	8.3±0.8	7.0±0.4**	
	骨格変異(%)	2.0 腰肋 2/99例	2.4 腰肋 2/82例	1.1 胸骨核非対象 1/89例	0.0	
骨格奇形(%)	0.0	0.0	1.1 肋骨癒合 1/89例	0.0		
内臓異常率(%)	22.5 腎盂拡張 1/89 肝奇形様結節 13/89 胸腺頸部残留 7/89	18.8 肝奇形様結節 5/69 胸腺頸部残留 9/69	21.3 右鎖骨下動脈起異常 1/80 腎盂拡張 1/80 肝奇形様結節 7/80 胸腺頸部残留 11/80	38.0 肝奇形様結節 15/71 胸腺頸部残 16/71*		

\* : p < 0.05

\*\* : p < 0.01

a) : 総着床数/総黄体数×100    b) : 総生存胎仔数/総着床数×100    c) : 死亡・吸収胚総数/総着床数

d) : 臓器重量について、有意差のみられた臓器(副腎)についてのみ表記した。

注: 体重、摂餌量、臓器重量、黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胎児数、死亡・吸収胚数、胎盤重量胎児体重はt検定、肉眼的異常発現数および性比はX<sup>2</sup>検定、着床率、生存胎児率、死亡・吸収胚率、化骨率、外形・内臓・骨格以上発現率はMann-WhitneyのU検定をもちいた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

親動物の 200 mg/kg 投与群において誤投与による死亡が 1 例認められたが、検体投与によると考えられる一般状態の異常所見および死亡は認められなかった。また、200 mg/kg 投与群において、体重増加抑制および飼料摂取量の低下が認められた。2 mg/kg 投与群で認められた体重増加抑制は、着床率の低下および生存胎仔数の減少に起因した二次的な変化と考えられた。

帝王切開検査では、200 mg/kg 投与群で雌雄胎仔重量および胎盤重量の低下が認められた。2 mg/kg 投与群で認められた雌胎仔重量および胎盤重量の増加は、着床率の低下に起因する生存胎仔数の単発的減少による二次的な変化と考えられた。

検体投与による影響として、200 mg/kg 投与群で副腎重量の絶対および相対重量増加が認められた。その他の臓器には検体投与の影響はみられなかった。

生存胎仔の骨格検査では、200 mg/kg 投与群で発育遅延と考えられる胸骨核、前肢および後肢、仙尾椎の化骨遅延が認められた。内臓検査では、200 mg/kg 投与群で胸腺の頸部残留が有意に増加した。この変化は上記と同様に胎児の発育遅延に起因すると考えられた。骨格変異、骨格奇形および内臓検査結果には検体投与による影響は認められなかった。

以上のように、プロベナゾールを妊娠ラットの器官形成期に投与した結果、200 mg/kg 投与群において、親動物に体重増加抑制および飼料摂取量の低下が認められ、副腎重量の絶対および相対重量増加が認められた。帝王切開検査では、200 mg/kg 投与群で雌雄胎仔重量および胎盤重量の低下が認められた。生存胎仔の骨格検査では、200 mg/kg 投与群で発育遅延と考えられる胸骨核、前肢および後肢、仙尾椎の化骨遅延が認められたが、外形、内臓および骨格検査では、200 mg/kg 用量においても催奇形性は認められなかった。

したがって本試験における母体および胎仔に対する最大無作用量は 20 mg/kg、また、催奇形性に関しては 200 mg/kg 用量においても陰性であると判断した。



(3) ウサギにおける催奇形性

(資料 22)

試験機関

報告書作成年 1987 年  
[GLP 対応]

検体純度：プロベナゾール

試験動物：日本白色種妊娠ウサギ（17 週令） 1 群 17 匹

試験期間：1987 年 1 月 8 日～1987 年 9 月 16 日

方 法： 薬量設定試験（日本バイオリサーチセンターにて実施）では、40 mg/kg 群には摂餌量の有意な減少および流産が 1 例みられ、明らかに母体への毒性的影響が認められた。しかし、8 mg/kg 群では摂餌量の減少が投与期間中の 2 日間に認められただけであり、プロベナゾールの 8 mg/kg はウサギ母体での毒性発現の臨界的な投与量と考えられた。従って、本試験の投与量は、中用量を 8mg/kg とし、公比 4 にて算出される 32 mg/kg を高用量に、また、2 mg/kg を低用量に設定した。

検体を 0.25 %カルボキシルメチルセルロース・ナトリウム (CMC・Na) 水溶液に懸濁希釈し、2、8 及び 32mg/kg の投与レベルで妊娠 6 日から妊娠 18 日までの 13 日間、1 日 1 回連日経口投与した。なお、対照群には 0.25%CMC・Na 水溶液を検体と同様に投与した。

交配用の雄と発情著明な雌を 1 対 1 で同居させ（交配開始前日の体重：雄 3.66～4.90 kg、雌 3.31～4.33 kg）、2 回の交尾動作を確認した後、膣垢検査を行い、膣垢中に精子を認めた雌を交尾動物とし、妊娠日は精子確認日を妊娠 0 日として起算した。

試験項目：

母 体：一般状態及び生死を毎日観察し、体重は妊娠 0 日及び妊娠 6 日から 28 日までの間は隔日にそれぞれ測定した。妊娠 28 日に帝王切開し、妊娠黄体数、着床数、吸収胚数、生存及び死亡胎仔数を検査した。帝王切開時に母動物を剖検し、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、卵巣、子宮について臓器重量を測定し（絶対重量）、体重から相対重量を算出した。

生存胎仔：性別、体重及び外形異常の観察を行った。全生存胎仔について胸腹部及び頭部の内臓検査を行った。内臓検査終了後の全生存胎仔について骨格標本作製し、骨格異常の有無を検査した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

結果:

投与群 (mg/kg/day)	対照	2	8	32	
1群当りの動物数	17	17	17	17	
一般症状	異常なし	異常なし	異常なし	妊娠25日に1例の流産	
死亡率	0	0	0	0	
妊娠率 (数)	88.2% (15)	88.2% (15)	88.2% (15)	94.1% (16)	
体重変化	異常なし	異常なし	異常なし	妊娠末期に増加抑制傾向	
飼料摂取量変化	異常なし	異常なし	異常なし	妊娠23日*、28日**に減少	
臓器重量 <sup>f)</sup> 心臓	(絶対重量 g)	8.47±0.878	8.98±0.939	8.88±0.699	8.54±0.840
	(相対重量 g%)	0.19±0.018	0.21±0.019*	0.20±0.016	0.20±0.018
検査母獣数	15	15	15	15	
親動物 着床所見	黄体数	10.7±2.49	11.3±3.15	10.5±2.80	10.7±3.06
	着床数 (率 <sup>a)</sup> )	9.1±3.15 (87.9%)	9.8±3.19 (85.4%)	9.2±3.21 (85.7%)	9.5±3.00 (87.4%)
	生存胎仔数	9.1±2.88	9.2±3.00	8.1±2.74	7.7±2.09
	死亡・吸収胎仔 (胚) 総数 (率 <sup>b)</sup> )	8 (4.6%)	9 (5.3%)	17 (10.7%)	26 (15.4%)*
	(早期吸収胚数)	(2)	(1)	(9)	(12)
	(後期吸収胚数)	(4)	(6)	(6)	(13)
	(浸軟胎仔数)	(2)	(1)	(2)	(1)
(死亡胎仔数)	(0)	(1)	(0)	(0)	
胎仔動物	体重 <sup>c)</sup> (g) ♂	39.7±5.19	39.1±5.81	39.8±4.61	38.7±6.67
	♀	38.1±3.92	36.9±5.57	39.4±3.97	37.1±5.69
	性比 (雄/雄+雌)	0.46 (63/137)	0.57 (79/138)	0.50 (61/121)	0.57 (66/116)
	外形検査	矮小1例、口蓋裂2例 <sup>d)</sup>	矮小3例	矮小1例	
	骨格検査 <sup>e)</sup> (%)				
	胸骨核数6	93.5	89.1	89.4	95.5
	左右中手骨数10	100.0	99.4	100.0	97.0
	左右前肢基節骨数10	100.0	100.0	98.3	98.9
	左右前肢中節骨数8	83.1	91.2	88.3	79.6
	左右後肢中節骨数8	100.0	100.0	100.0	97.8
仙尾椎体骨化核数 <sup>f)</sup>	9.1±2.88	19.2±0.36	19.0±0.31	18.8±0.38	
骨格変異 (%)	25.7 13肋骨 37/134例 胸骨核分離 3/134例	38.0 13肋骨 48/135例 頸椎弓分離 1/135例	25.7 13肋骨 50/121例 胸椎体分離 1/121例	25.7 頸肋 1/115例 13肋骨 41/115例	
骨格異常 (%)	0.0	1.1 胸骨核癒合 1/135例 半背椎 1/135例	0.7 胸骨核癒合 1/121例 肋骨癒合 1/121例 腰椎弓欠損 1/121例 腰椎弓短小 1/121例	0.7 腰椎弓欠損 1/115例	
内臓異常率 <sup>d)</sup> (%)	0	0.6 肝臓過分葉 1/135例	0	0	

\*: p < 0.05

\*\* : p < 0.01

a) 一腹当たりの着床率の平均

c) 一腹当たりの平均±S.D.

e) 内1例は多指を併発

b) 一腹当たりの出現率の平均

d) 一腹当たりの出現率の平均

f) 変化のあった臓器を表記

統計解析方法: 体重、摂餌量、臓器重量、黄体数、着床数、生存胎児数、仙尾椎体骨化核数にはt検定、着床数、死亡・吸収胎児 (胚) 率、性比、外形異常率、骨格異常率および変異率、仙尾椎体骨化核数を除く骨化進行度、内臓異常率には順位和検定をもちいた。

#### 親動物に及ぼす影響

親動物死亡はいずれの検体投与群にも認められず、一般状態の観察でも、各検体投与群に異常は認められなかった。しかし、32 mg/kg 投与群に流産が1例認められた。体重では32 mg/kg 投与群では妊娠末期の体重増加に抑制傾向が認められ、また、摂餌量も32 mg/kg 投与群で妊娠期間の末期から対照群に比して減少傾向あるいは有意な減少が認められた。

プロベナゾールの32 mg/kg 投与は、ウサギ親動物の妊娠の維持に対して軽度な影響を及ぼすものと考えられた。

妊娠28日の剖検では、投与による臓器への影響は認められなかった。

臓器重量は、2 mg/kg 投与群で心臓の相対重量値が対照群に比して有意な増加を示したが、絶対重量には有意な変化はなく、投与量と相関した一定の変動傾向も認められなかったことから投与による影響は考え難かった。その他測定対象とした臓器重量には変化はみられなかった。

帝王切開検査では、妊娠黄体数、着床数及び着床率のいずれにも各検体投与群と対照群との間に差は認められなかった。

以上の結果より、32 mg/kg 投与群では親動物の体重及び摂餌量に軽度な影響が認められ、また、流産が1例認められたが、8 mg/kg 以下の投与群では親動物の一般状態、体重推移、摂餌量推移及び臓器にも影響が認められなかったため、8 mg/kg を母体に対する最大無作用量と判断した。

#### 胎仔に及ぼす影響

胎仔に対して8 mg/kg 以下の投与群では、死亡・吸収胎仔（胚）率、生存胎仔数、性比及び雌雄別の生存胎仔体重のいずれも対照群との間に差は認められなかった。しかし、32 mg/kg 投与群では死亡・吸収胎仔（胚）率が対照群に比して有意に高かった。胎仔の骨化進行度では、いずれの検体投与群にも対照群との間に差は認められなかった。このことから、32 mg/kg 投与群に胚・胎仔に対する軽度の致死作用が認められたが、発育抑制作用はないものと考えられた。

生存胎仔の外形観察では、各検体投与群にみられた外形異常は矮小のみであり、対照群でも認められ、これらの出現率には対照群との間に差は認められなかった。

骨格検査では、各検体投与群とも骨格異常の型別の出現率及び異常を有する胎仔の総出現率には対照群との間に差は認められなかった。また、骨格変異の型別の出現率及び変異を有する胎仔の総出現率に対照群との間に差は認められなかった。

内臓検査では、対照群との間に差は認められなかった。

このことから、プロベナゾールには本試験条件下では、催奇形性はないものと考えられた。

以上の結果から、胚・胎仔に致死作用の認められなかった8 mg/kg を胎仔に対する最大無作用量と判断した。

以上の結果から、プロベナゾールを妊娠ウサギの器官形成期に投与した場合、母体及び胎仔に対する最大無作用量は8 mg/kg であると判断した。また、催奇形性は32 mg/kg 用量においても陰性と考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

13) 変異原性

(1) 遺伝子突然変異原性

細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 24)

試験機関

報告書作成年 1978 年

検体の純度：プロベナゾール

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

検体は、DMSO に溶解した。試験は、1~5000  $\mu$ g/プレート の計 8 用量を設定して実施した。対照には DMSO、陽性対照には AF-2、 $\beta$ -propiolactone、9-aminoacridine、2-nitrofluorene、2-aminoanthracene を用いた。

結果：次頁のとおり。

検体は S-9 の有無にかかわらず、すべての濃度において陰性対照と比較して復帰突然変異コロニー数を増加させなかった。一方、陽性対照として用いた AF-2、 $\beta$ -propiolactone、9-aminoacridine、2-nitrofluorene および 2-aminoanthracene では、対照 (DMSO) と比較して著明な復帰変異コロニー数の増加を認めた。

以上の結果より、検体は、復帰変異誘発性は有しないものと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

薬物	濃度 ( $\mu$ g /plate)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/plate					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			WP2 <i>hcr</i>	TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
対照 (DMSO)		-	6	11	124	6	13	26
			18	15	132	9	9	28
プロベナ ゾール	1	-	15	16	121	7	11	34
			17	15	129	4	15	21
	5	-	14	16	102	6	10	29
			16	15	98	11	12	25
	10	-	14	13	101	7	11	30
			20	16	115	6	15	33
	50	-	19	11	118	3	10	18
			13	16	92	11	9	25
	100	-	19	10	95	7	11	20
			22	13	114	6	12	27
	500	-	16	5	58	3	4	14
			12	3	49	2	5	15
1000	-	15	0	19	0	0	0	
		19	0	5	0	0	0	
5000	-	9	*	*	*	*	*	
		17	*	*	*	*	*	
対照 (DMSO)		+	14	5	92	9	19	13
			10	7	94	11	11	18
プロベナ ゾール	1	+	10	13	129	9	9	27
			9	15	93	5	6	21
	5	+	12	12	102	16	12	28
			18	7	115	4	15	27
	10	+	3	14	81	7	11	25
			19	11	123	8	11	27
	50	+	7	6	116	9	11	20
			14	10	124	10	14	25
	100	+	13	15	97	10	19	28
			9	11	54	4	8	21
	500	+	23	4	61	3	3	13
			29	8	57	5	3	24
1000	+	12	2	33	1	2	3	
		9	0	15	2	0	4	
5000	+	15	0	0	1	0	0	
		3	0	0	0	0	0	
陽性対照 2-amino- anthracene	10	-	21	10	154	18	19	45
			12	16	148	31	24	50
			68	360	>3000	493	>3000	>3000
その他の 陽性対照		-	>2000 <sup>a)</sup>	1304 <sup>b)</sup>	990 <sup>c)</sup>	>10000 <sup>d)</sup>	>2000 <sup>e)</sup>	543 <sup>f)</sup>
			>2000	1532	938	>10000	>2000	442

\* 菌株の生育阻止を認める

a) 0.25  $\mu$ g/plate AF-2

b) 50  $\mu$ g/plate  $\beta$ -propiolactone

c) 0.05  $\mu$ g/plate AF-2

d) 200  $\mu$ g/plate 9-aminoacridine

e) 50  $\mu$ g/plate 2-nitrofluorene

f) 0.1  $\mu$ g/plate AF-2

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

(2) DNA 損傷誘発性  
細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 24)

試験機関

報告書作成年 1978 年

検体の純度：プロベナゾール

方 法：枯草菌 *Bacillus subtilis* の組換修復機構保持株 (H17) と欠損株 (M45) を用い、DNA の損傷の誘発性を検定した。

検体を溶解させるため、DMSO を用いた。本検体は水に難溶性であり、寒天中への拡散を考慮して評価上問題のない 2000  $\mu$ g/disk を最高投与量とした。

結 果：次表のとおり。

薬 物	濃度 ( $\mu$ g/disk)	阻止域 (mm)		差 (mm)
		M45	H17	
対 照 (DMSO)		0	0	0
プロベナゾール	20	0	0	0
	100	0	0	0
	200	0	0	0
	500	0	0	0
	1000	0	0	0
	2000	0	0	0
陰 性 対 照 Kanamycin	10	5.5	4	1.5
陽 性 対 照 Mitomycin C	0.1	7	0.5	6.5

検体投与では最高投与量である 2000  $\mu$ g/disk においても、両株に生育阻止を認めなかった。一方、陽性対照の Mitomycin C では両株に明らかな生育阻止の差が生じた。

以上の結果より、本検体は DNA 損傷の誘発性がないものと判断された。

(3) 細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 50)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2012 年

検体純度：プロベナゾール

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA* 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で、プレインキュベーション法による復帰突然変異試験を行った。検体はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、試験 I では 6.9~1667 µg/プレート (ネズミチフス菌 4 株)、61.7~5000 µg/プレート (WP2 *uvrA* 株) の範囲で公比 3、試験 II では、39.1~1250 µg/プレート (ネズミチフス菌 4 株)、313~5000 µg/プレート (WP2 *uvrA* 株) の範囲で公比 2 とし、それぞれ 5~6 用量で実施した。プレート数は被験物質処理群、溶媒対照群および陽性対照群のすべての用量について、それぞれ 3 枚のプレートで実施した。

用量設定根拠：代謝活性化系存在下及び非存在下で、5000 µg/プレートを最高用量として公比 4 で 7 用量を設定した。その結果代謝活性化系の有無にかかわらず、すべての用量において被験物質の析出は観察されなかった。しかし、代謝活性化系の有無にかかわらずネズミチフス菌株で 1250 µg/プレート以上の用量で生育阻害が観察された。したがって、本試験は WP2 *uvrA* 株では 5000 µg/プレートを最高用量とし、ネズミチフス菌株では生育阻害を考慮し、1667 µg/プレート(本試験 I)、あるいは 1250 µg/プレート (本試験 II) を最高用量として公比 2 または 3 で 5~6 用量を設定した。

試験結果：結果を次頁以降の表に示す。

2 回の試験において検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、各菌株の生育阻害を起こさない最高用量においても、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照として用いた AF-2 (2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド)、2-AA (2-アミノアントラセン)、NaN<sub>3</sub> (アジ化ナトリウム) 及び 9-AA (9-アミノアクリジン塩酸塩) ではすべての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、本検体は代謝活性化系を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと判断した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

I 回目試験

薬物	濃度 (µg/ プレート)	S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)		-	120	6	17	14	5	
検体	6.9	-	120	9	/	16	8	
	20.6	-	117	6		12	3	
	61.7	-	122	6	25	10	5	
	185	-	114	6	21	9	4	
	556	-	83	3	24	2	1	
	1667	-	0*	0*	16	0*	0*	
	5000	-	/	/	14	/	/	
対照 (DMSO)		+	127	6	23	23	11	
検体	6.9	+	124	7	/	21	9	
	20.6	+	116	6		16	9	
	61.7	+	106	7	27	19	8	
	185	+	97	7	27	16	4	
	556	+	80	7	40	9	1	
	1667	+	0*	0*	28	0*	0*	
	5000	+	/	/	20	/	/	
陽性 対照	AF-2	0.01	-	549	/	200	/	
		0.1	-					
	NaN <sub>3</sub>	0.5	-	576	/	/	413	
	9-AA	80	-					
	2-AA	0.5	+	593	/	/	192	/
		1	+					
		2	+					
10		+						
				172			74	
					193			

数値は3反復の平均値

\* : 菌株の生育阻害が認められた。

DMSO : ジメチルスルホキシド

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

NaN<sub>3</sub> (滅菌水に溶解) : アジ化ナトリウム

9-AA (DMSO に溶解) : 9-アミノアクリジン塩酸塩

2-AA (DMSO に溶解) : 2-アミノアントラセン



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

2回目試験

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/$ プレート)	S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート						
			塩基置換型			フレームシフト型			
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537		
対照 (DMSO)		-	107	7	15	28	6		
検体	39.1	-	94	3	/	22	5		
	78.1	-	102	4		24	4		
	156	-	96	3		20	5		
	313	-	97	5	22	17	5		
	625	-	48	3	22	10	2*		
	1250	-	0*	0*	29	0*	0*		
	2500	-	/	/	19	/	/		
	5000	-	/	/	17	/	/		
対照 (DMSO)		+	113	7	27	38	12		
検体	39.1	+	99	6	/	29	8		
	78.1	+	98	8		32	9		
	156	+	100	7		21	6		
	313	+	78	5	35	23	6		
	625	+	62	4	36	21	1*		
	1250	+	18*	0*	29	0*	0*		
	2500	+	/	/	27	/	/		
	5000	+	/	/	23	/	/		
陽性 対照	AF-2	0.01	-	561	/	207	/		
		0.1	-						
	NaN <sub>3</sub>	0.5	-	/	573	/	456		
		80	-						
	2-AA	0.5	+	/	/	/	251	953	
		1	+						641
		2	+						181
	10	+	/	/	205	/	/		

数値は3反復の平均値

\* : 菌株の生育阻害が認められた。

DMSO : ジメチルスルホキシド

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

NaN<sub>3</sub> (滅菌水に溶解) : アジ化ナトリウム

9-AA (DMSOに溶解) : 9-アミノアクリジン塩酸塩

2-AA (DMSOに溶解) : 2-アミノアントラセン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

(4) 染色体異常誘発性

ヒトリンパ球を用いた *in vitro* 細胞遺伝学的試験

(資料 24-2)

試験機関

報告書作成年 1989 年

[GLP 対応]

検体の純度：プロベナゾール

方 法：健康な男子の末梢血から分離し、培養したリンパ球を用いた。

試験前に濃度設定のために実施した細胞分裂抑制試験を実施した。非活性化法、活性化法ともに検体を 6 用量に段階希釈 (21.875~700  $\mu\text{g/mL}$ ) して評価した結果得られた 50% 分裂抑制濃度 (非活性化法 82.2  $\mu\text{g/mL}$ 、活性化法 120.1  $\mu\text{g/mL}$ ) を考慮し、本試験の濃度は非活性化法、活性化法とも細胞分裂を 50% 以上抑制する濃度であるすなわち 200  $\mu\text{g/mL}$  を最高用量とし、100, 50, 25  $\mu\text{g/mL}$  の用量群も設定した。

陽性対照には Mitomycin C および Cyclophosphamide を設けた。各濃度で原則として 200 個の分裂中期像を観察した。染色体の異常をギャップ、染色分体切断、染色分体交換、染色体切断、染色体交換、断片化およびその他に分類し計測した。異常を有する細胞の出現頻度は 5% 未満を陰性、10% 以上を陽性とした。

結 果：別表-1 および別表-2 のとおり。

検体投与群は細胞毒性を示したレベルの濃度を含め、染色体異常の発現頻度において濃度と相関した増加または対照と比して有意な増加を示さなかった。

一方、陽性対照として用いた Mitomycin C および Cyclophosphamide では顕著な染色体異常の増加が認められた。

以上の結果から、プロベナゾールのヒトリンパ球を用いた *in vitro* 細胞遺伝学的試験の変異原性は、代謝活性化の有無にかかわらず陰性であると判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

別表-1 プロベナゾールの in vitro 細胞遺伝学的試験 (非活性化法)

代謝活性化の有無	薬物	濃度 ( $\mu$ g/ml)	処理時間 (hrs)	観察 細胞 数	異常を有する細胞数							構造異常を有する細胞 の出現数 (%)		判定	倍数性 細胞の 出現数 (%)	判定	
					キヤッ プ	染色 分 体 切断	染色 分 体 交換	染色 体 切断	染色 体 交換	断片 化	その 他	含 キヤッ プ	除 キヤッ プ				
非活性化	無処理	...	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0(0)	-
	溶媒対照 (DMSO)	...	24	200	2	0	0	0	0	0	0	0	2(1.0)	0(0)	-	0(0)	-
	検体	25	24	200	0	1	3	1	0	0	0	0	4(2.0)	4(2.0)	-	0(0)	-
		50	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0)	0(0)	-	0(0)	-
		100	24	*	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
		200	24	*	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	陽性対照 (MitomycinC)	0.2	24	162	9	24	33	2	0	0	0	57(35.2)	53(32.7)	+	0(0)	-	
	無処理	...	48	200	4	0	0	0	0	0	0	4(2.0)	0(0)	-	0(0)	-	
	溶媒対照 (DMSO)	...	48	200	1	0	0	0	0	0	0	1(0.5)	0(0)	-	0(0)	-	
	検体	25	48	200	2	1	0	0	0	0	0	3(1.5)	1(0.5)	-	1(0.5)	-	
		50	48	200	2	2	0	0	0	0	0	4(2.0)	2(1.0)	-	0(0)	-	
		100	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0)	0(0)	-	0(0)	-	
		200	48	*	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
	陽性対照 (MitomycinC)	0.2	48	200	18	65	52	3	0	0	0	110(55.0)	103(51.5)	+	0(0)	-	

\* ... 細胞毒性

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、Meiji Seika ファルマ株式会社にある。

別表-2 プロベナゾールの in vitro 細胞遺伝学的試験 (活性化法)

代謝活性化の有無	薬物	濃度 ( $\mu$ g/ml)	S9 Mix	処理時間 (hrs)	観察細胞数	異常を有する細胞数							構造異常を有する細胞の出現数 (%)		判定	倍数性細胞の出現数 (%)	判定
						キヤップ	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	断片化	その他	含キヤップ	除キヤップ			
非活性化	無処理	...	-	2	200	1	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	0 (0)	-	0 (0)	-
	溶媒対照 (DMSO)	...	-	2	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	-
	検体	25	-	2	200	1	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	0 (0)	-	0 (0)	-
		50	-	2	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	-
		100	-	2	200	0	2	0	0	0	0	0	2 (1.0)	2 (1.0)	-	0 (0)	-
	200	-	2	*	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
陽性対照 (Cyclophosphamide)	10	-	2	200	1	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	0 (0)	-	1 (0.5)	-	
活性化	無処理	...	+	4	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	-
	溶媒対照 (DMSO)	...	+	4	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	-
	検体	25	+	4	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	-
		50	+	4	200	0	0	1	0	0	0	0	1 (0.5)	1 (0.5)	-	0 (0)	-
		100	+	4	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	-
	200	+	4	200	0	3	1	0	0	0	0	4 (2.0)	4 (2.0)	-	0 (0)	-	
陽性対照 (Cyclophosphamide)	10	+	4	200	8	22	21	0	0	0	0	47 (23.5)	40 (20.0)	+	0 (0)	-	

\* . . . . 細胞毒性