

スピロジクロフェンのイヌにおける1年間反復経口投与毒性試験

(毒性資料 No. 原体-15)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：2001年3月16日

検体の純度：

試験動物：ビーグル犬、1群雌雄各4匹

投与開始時；34～38週齢 平均体重；雄 14.1kg 雌 11.5kg

投与期間：12ヵ月(1998年11月30日～1999年11月29日)

【投与方法】

検体を0(対照群)、20、50、150、500/600ppmとなるように飼料と混和し、12ヵ月間雌雄各4匹のイヌに投与した。投与開始時の最高用量は500ppmであったが、臨床症状及び体重に影響がみられなかったことから、試験4週目に600ppmに増加した。

投与用量設定の根拠；

【試験項目及び結果】

1) 臨床症状

全動物の外観と行動を毎日2回観察（週末及び公休日は1回）した。

検体に起因すると考えられる所見は認められなかった。

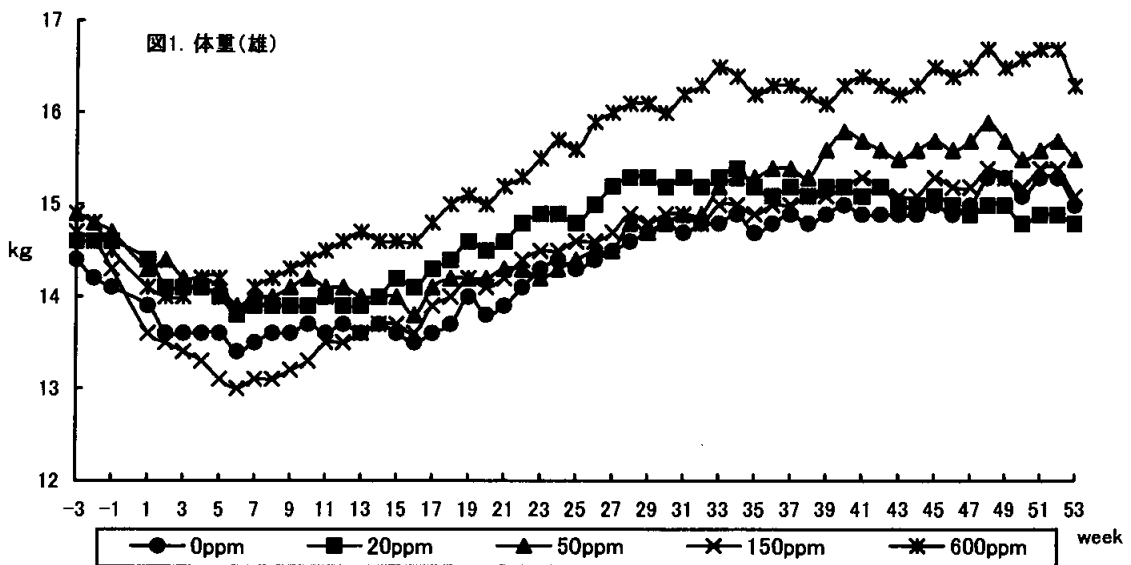
2) 死亡率

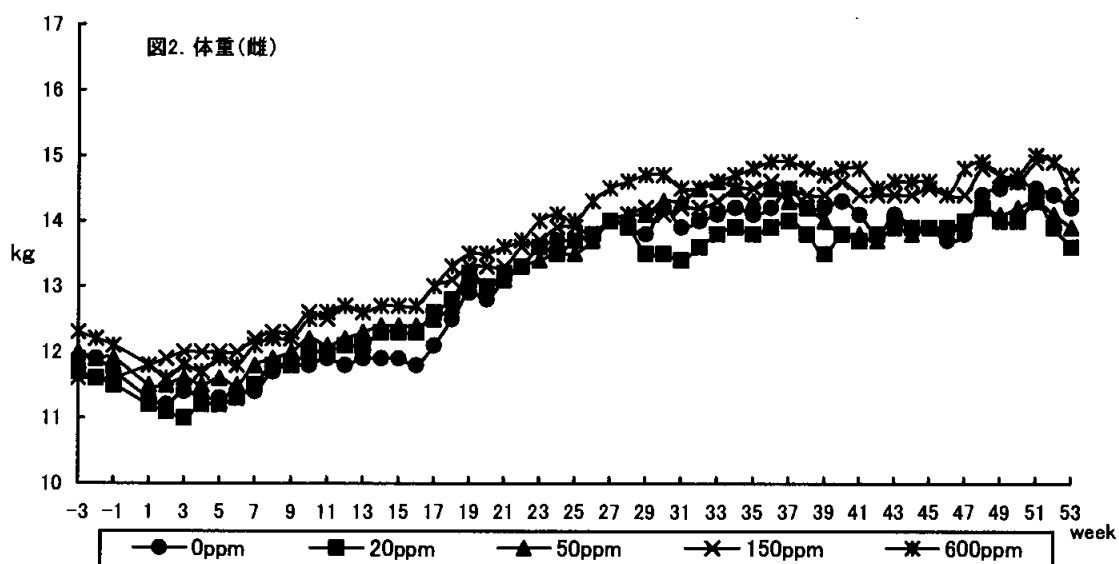
全動物が365日間の投与期間中生存した。

3) 体重（図1，図2）

週1回体重を測定した。

投与開始後一時的に僅かな体重低下が150ppm群を除く全用量群でみられた。150ppm群では雄で他群より僅かな低下（3～4%）がみられたが、雌ではむしろ増加の傾向（4～5%）がみられた。認められた低下は、摂餌状況が良好でなかったことによるものと思われた。また600ppmの雄群の体重の推移は、一時的な低下以降対照群及び他用量群より僅かな増加傾向（10%以内）を示したが、検体投与に関連した変動とは考えられなかった。投与期間中の体重増加の推移は、概ね対照群と用量群で同等であり検体に起因した変動は特に認められなかった。





4) 摂餌量及び検体摂取量 (表 1)

毎日、摂餌量を測定した。

摂餌量は、全用量群の数例で投与開始後一時的に僅かな低下傾向がみられた。これは残餌がみられるなど摂餌状況が良好でなかったことを示したものと考えられたが、45 日以内に全例で回復した。投与期間中の摂餌量に対照群と用量群間に特に差は認められなかった。

投与期間中の平均検体摂取量(mg/kg/日)は以下のとおりであった。

表 1 検体摂取量

投与用量(ppm)		20	50	150	600
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	0.56	1.38	4.33	16.1
	雌	0.59	1.52	4.74	17.7

5) 一般所見

反射検査(瞳孔、角膜、膝蓋腱、伸筋、体位及び屈筋)及び体温、血圧、心拍数、心電図の測定を、試験開始前(-3週)、投与後6、12、26、39、52週に実施した。

反射検査、体温、血圧、心拍数及び心電図の測定結果、どの検査時においても検体に関連すると思われる所見あるいは変化は認められなかった。

6) 眼科学的検査

各動物の眼科学的な検査（結膜、角膜、虹彩、水晶体、眼底等）について、試験開始前(-3週)、投与後6、12、26、39、52週に実施した。

眼科学的検査の結果、どの検査時においても検体に関連すると思われる所見は認められなかった。

7) 血液学的検査（表2）

試験開始前(-3及び-1週)、投与後3、6、12、26、39及び52週目に血液を頸静脈から採取し、以下の項目の測定を行った。

白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、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)、メトヘモグロビン量、網状赤血球数、血小板数、ハインツ小体、トロンボプラスチン時間、部分トロンボプラスチン時間及び赤血球沈降速度(ESR)

また、好中球、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球及び異型細胞の白血球百分率についても検査した。

150ppm雌群で投与3週時に赤血球数(6.3410E12/L)、ヘモグロビン(144g/L)、ヘマトクリット(0.445L/L)に有意な減少($p < 0.05$)が、20ppm雌群で6週時に好中球(8.5710E9/L)に有意な増加($p < 0.05$)がそれぞれ認められたが、これらの変動に用量及び時間的な関連性が認められず、またこれらの値は背景値の範囲内にあったことから検体に起因する変動とは考えられなかった。他の検査時あるいは項目に有意な変動は認められなかった。

表2 血液学的検査—雌— (有意差の認められた項目)

検査時期 用量(ppm)	3週				6週			
	20	50	150	600	20	50	150	600
赤血球			↓92					
ヘモグロビン			↓66					
ヘマトクリット			↓86					
白血球百分率/ 好中球					↑141			

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの、
↑↓: $p < 0.05$ (Dunnettの多重比較検定: 申請者)

* : 赤血球; , ヘモグロビン;
ヘマトクリット; , 好中球:-

8) 血液生化学的検査 (表 3)

試験開始前 (-3 及び -1 週)、投与後 3、6、12、26、39 及び 52 週目に血液を頸静脈から採取し、以下の項目の測定を行った。

アスパ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)、アルカリホスファターゼ (ALP)、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GLDH)、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT)、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH)、クレアチンキナーゼ (CK)、血糖 (GLUC)、コレステロール (CHOL)、トリグリセリド (TRIGL)、クレアチニン (CREA)、尿素 (UREA)、総ビリルビン (BILI-t)、総蛋白 (PROT)、アルブミン (ALB)、血清電解質 (ナトリウム/Na, カリウム/K, カルシウム/Ca, 塩素/CL, 無機リン/P, 鉄分/Fe 及びマグネシウム/Mg) 並びに甲状腺ホルモンのトリヨードチロニン (T3)、チロキシン (T4)、チロキシン結合能 (TBC)

GGT、GLUC 及び T3 の増加、UREA 及び PROT の減少などいくつかの項目に有意な変動が認められた。しかし、これらの有意な変動は、性、用量及び時間的な関連性が認められないことからいずれも検体に起因する変動とは考えられなかった。

表 3 血液生化学的検査 (有意差の認められた項目)

検査時期 用量 (ppm)	3 ヶ月				6 ヶ月				9 ヶ月				投与終了時			
	20	50	150	600	20	50	150	600	20	50	150	600	20	50	150	600
雄																
GGT																↑ 200
GLUC														↑ 128	↑ 124	↑ 130
UREA													↓ 74.3	↓ 77.2		
Na					↓ 99.3	↓ 99.3		↓ 99.3	↓ 98.6							
TBC						↑ 108	↑ 109	↑ 108								
雌																
GGT																↑ 200
LDH						↓ 68.1	↓ 55.3	↓ 59.6								
TRIGL															↓ 60.4	
PROT													↓ 91.5			
Fe				↓ 41.6												
T3													↑ 152			

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの、
 ↑ ↓ : $p < 0.05$, ↑ ↓ : $p < 0.01$ (Dunnett の多重比較検定 : 申請者)

9) 肝臓組織の酵素活性及びトリグリセリドの測定 (表 4)

投与終了後に全動物の肝臓組織の N-デメチラーゼ (N-DEM), O-デメチラーゼ (O-DEM), チトクローム P450 (P450) 及びトリグリセリドを測定した。

肝臓組織中の N-DEM の増加が 150ppm 以上の雄群 (1.5~2.0 倍) 及び 600ppm 雌

群 (2.0 倍) にそれぞれ認められた。O-DEM では 600ppm 群に有意な増加 (雄 1.5 倍、雌 1.6 倍) が認められた。また P450 は 600ppm 雌群のみに有意な増加 (1.3 倍) がみられた。これらの増加は、検体投与に起因する変動と考えられ、肝薬物代謝酵素の誘導が示唆された。しかしながら、後述のように肝重量の増加や肝形態像に関連した変化がみられなかったことから、この誘導は検体による有害反応ではなくむしろ適応性反応による変動と考えられた。

またトリグリセリドには影響は認められなかった。

表 4 肝薬物代謝酵素の測定 (有意差の認められた項目)

性別 用量 (ppm)	雄				雌			
	20	50	150	600	20	50	150	600
N-DEM*			↑154	↑204				↑201
O-DEM**				↑154				↑161
P450								↑134

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

↑ : $p < 0.05$, ↑↑ : $p < 0.01$ (Student's t 検定)

※ : 基質/アミノピリン ※※ : 基質/4-ニトロアニソール

10) 尿検査

試験開始前 (-3 週)、投与後 3、6、12、26、39 及び 52 週目に全動物で尿量、比重、pH、クレアチニン、Na、糖、蛋白、潜血、ビリルビン、ケトン体、ウロビリノーゲン及び尿沈渣 (細菌、白血球、赤血球、上皮細胞、三リン酸塩及びシュウ酸塩) について尿検査を実施した。

尿検査の結果、いずれの項目にも検体投与に関連した変動は認められなかった。

11) 本検体及び の血漿及び尿中濃度の測定 (表 5, 表 6)

本試験の一部として、本検体及び の血漿及び尿中濃度を測定した。

血液試料は、投与 20 週目に 600ppm 群 (最高用量群) の雌雄各 4 匹から、給餌後 0、2、4、7、24 時間に採取した。尿試料は、投与 28 週目に同群の雄 1 匹、雌 3 匹と対照群の雌 1 匹について、給餌後から 5 時間蓄尿して得た。

それぞれ HPLC を用いて定量した。

血漿中における検体の定量結果、その濃度は定量限界以下であった。これは本検体が血漿及び肝臓中のエステラーゼによって容易に に分解されてしまうことによるものと考えられた (ラット血漿及び肝組織を使って in vitro 系で

検討した結果、検体の半減期は約 15 分であった。)

血漿中の濃度の定量結果、給餌前の濃度は給餌後 7 及び 24 時間と同等であった。このことから、この時期 (20 週) でのこの代謝物は血漿中に一定の濃度で存在していることが示唆される。また、給餌後 4 時間に濃度が雌雄ともに低くなったが、この経時的濃度の変化は、化学的に類似で同様の作用機作を有する他の物質でも観察されるものであり、特異的なものではないと考えられた。

一方、尿中における検体濃度は、尿試料の容量が十分確保できなかったことから定量は不可能であった。尿中の濃度は、0.12~0.46 $\mu\text{mol/mL}$ の範囲であり、尿試料の最も少ない雄での濃度は 0.05 $\mu\text{mol/mL}$ であった。

表 5 血漿中の濃度 (600ppm 群)

給餌後時間	0h	2h	4h	7h	24h
雄 (nmol/mL)	24.8	17.6	19.1	26.7	32.4
雌 (nmol/mL)	26.8	15.9	15.8	25.0	28.1

表 6 尿中の濃度 (600ppm 群) (給餌後 5 時間蓄尿)

	例数	尿量 (mL)	濃度 ($\mu\text{mol/mL}$)
雄	1	18.6	0.05
雌	3	220	0.25

12) 剖検

試験終了時に、全動物を Narcoren® 麻酔下で放血致死させ剖検した。

剖検の結果、検体投与に関連した肉眼的病理所見は認められなかった。

13) 臓器重量 (表 7)

全例について、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、卵巣、甲状腺、副腎、胸腺、前立腺、脳、下垂体、胆嚢、精巣上体、膀胱及び子宮の重量を測定すると共に、対体重比についても算出した。

臓器重量における有意な変動は雄のみに認められた。精巣では、150ppm 以上の群で実重量及び対体重比の有意な増加が認められた。この対体重比 (1.438~1.790) は、背景値の範囲内 (52 週齢以降:) にあったが、むしろ対照群の値 (1.380) がこの範囲より低値を示したことに伴う変動とも考えられた。さらに 600ppm では精巣の病理組織学的検査においてライディッヒ細胞の空胞化が 4

例認められたが、肥大は1例のみであり、同程度の重量の増加が認められた150ppmではいずれの病変も認められていない。また90日間反復経口投与毒性試験（毒性資料No. 原体-11）の高用量群（2000ppm）においては精巣重量に変動がみられなかったことから、少なくとも150ppmで見られた精巣重量の増加と検体投与との関連性は疑わしい。肺及び精巣上体で見られた有意な重量増加は、病理組織像との関連性が不明あるいは明確な用量相関性が認められなかったことから検体投与に起因した所見とは考えられなかった。

表7 臓器重量（有意差の認められた項目）

性別 用量 (ppm)		雄			
		20	50	150	600
肺	実重量				↑ 121
	対体重比				
精巣	実重量			↑ 130	↑ 143
	対体重比			↑ 128	↑ 130
精巣上体	実重量		↑ 125		↑ 128
	対体重比				

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの
 ↑ : p<0.05, ↑↑ : p<0.01 (Dunnettの多重検定：申請者)

14) 病理組織学的検査（表8）

全動物を対象として、以下の臓器について病理標本を作製し、鏡検した。

脳、脊髄、視神経、坐骨神経、心臓、動脈、鼻、気管、肺、舌、咽頭、扁桃、唾液腺、食道、眼球、胃、腸管（十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸）、肝臓、胆のう、膵臓、腎臓、リンパ節（顎下腺、腸間膜）、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、卵巣、卵管、子宮、膣、下垂体、甲状腺、副腎、脾臓、骨（胸骨、大腿骨）、骨髄、胸腺、皮膚（乳腺部）、骨格筋（大腿部）及び肉眼的異常組織

精巣に軽微または軽度のライディッヒ細胞の空胞化が600ppm群の全例に認められた。また同群で軽度のライディッヒ細胞の肥大が1例に認められた。ライディッヒ細胞の変化は、テストステロンの合成あるいは代謝亢進を示唆するものと考えられた。これらの精巣での病変は、出現頻度及び程度の増強から投与との関連性は否定できない。副腎では、150ppm以上の雌雄群で皮質束状帯における空胞化の発現頻度及び程度に増強が認められた。この空胞化は、脂質の蓄積あるいはステロイド代謝への影響に関連した形態学的変化と考えられ、また対体重比の増加傾向もみられていることから検体投与との関連性が示唆される。

他の病理組織学的所見は、散在性であり、用量との関連性が明確に認められず、

また臓器重量との関連性もみられないことから検体投与に起因しないものと考えられた。

表 8 主要な病理組織学的所見

項目	用量(ppm)	雄					雌				
		0	20	50	150	600	0	20	50	150	600
【検査数】		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
肝臓											
色素沈着		1	2	2	1	3	3	4	3	3	3
程度 1		1	2	2	1	2	2	2	3	1	3
程度 2		0	0	0	0	1	1	2	0	2	0
脂肪変性		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
うっ血		0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
腎臓											
尿細管色素沈着		2	4	3	0	1	1	1	1	1	3
乳頭部石灰化		3	1	0*	2	1	3	1	2	1	3
単核細胞浸潤		1	1	0	0	0	1	2	0	0	0
副腎											
空胞化/皮質束状帯		1	2	0	4*	4*	1	1	0	3	4*
程度 1		1	2	0	3	0	0	1	0	1	0
程度 2		0	0	0	1	1	1	0	0	2	2
程度 3		0	0	0	0	3	0	0	0	0	2
空胞化/皮質球状帯		2	2	1	2	1	0	0	0	1	1
程度 1		2	1	0	1	0	0	0	0	1	1
程度 2		0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
程度 3		0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
精巣											
空胞化/ライディッヒ細胞		0	0	0	0	4**	-	-	-	-	-
程度 1		0	0	0	0	3					
程度 2		0	0	0	0	1					
肥大/ライディッヒ細胞		0	0	0	0	1	-	-	-	-	-
程度 2		0	0	0	0	1					
精巣上体											
空胞化		1	0	0	1	0	-	-	-	-	-
単核細胞浸潤		0	1	0	0	1	-	-	-	-	-
甲状腺											
空胞化 (辺縁部)		2	2	3	1	1	1	0	1	0	3
肺											
炎症性浸潤		1	2	3	2	1	2	1	3	2	2
マクロファージ/肺胞		1	1	0	1	0	0	0	0	1	0
粘液/気管支		0	2	0	1	0	1	0	0	0	0
十二指腸											
剥離/上皮		0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
子宮											
単核細胞浸潤		-	-	-	-	-	0	0	0	3*	0

*: p<0.05 **: p<0.01 (χ²検定/Yates 補正: 申請者)

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

以上の結果から、イヌを用いた 1 年間反復経口投与毒性試験における本剤の影響としてみられた所見は、600ppm 群では、副腎重量の増加、精巣重量の増加、精巣及び副腎の病理組織学的所見（精巣／ライディッヒ細胞の空胞化、肥大、副腎／皮質束状帯における空胞化）であった。150ppm 群では、副腎の皮質束状帯における空胞化であった。50ppm 群では検体に起因すると思われる影響は認められなかった。

一方、血漿中には検体の のみが一定濃度で存在していることが示唆され、本検体は認められなかったことから、前述の病態発現にはこのが関与してことが推察された。

従って、本試験条件下における無毒性量（NOAEL）は、50ppm（雄；1.38mg/kg/日、雌；1.52mg/kg/日）であると判断した。

スピロジクロフェンのマウスを用いた発がん性試験

(毒性資料No.原体-16)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 2000年7月21日

検体の純度：

試験動物： ICR系(CD-1)マウス(SPF)

[試験開始時約8週齢、平均体重 雄 32.0g, 雌 25.9g]

1群雌雄各50匹

投与期間： 18ヵ月(1997年6月～1998年12月)

【試験方法】

検体を0(対照群)、25、3500及び7000ppmとなるように粉末飼料(1%のピーナッツ油添加)に混ぜ18ヵ月間マウスに投与した。検体を混入した飼料は週毎に調製した。

用量設定の根拠；

【試験項目及び試験結果】

1) 臨床症状

動物を少なくとも1日2回(週末と休日は1回)観察し、臨床症状と異常を記録した。各個体の詳細な検査は週1回実施した。不健康な動物あるいは生死にかかわる可能性のある新生物ができた動物については、隔離して、より頻繁に観察し、もし瀕死状態にあれば切迫屠殺した。

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

2) 死亡率(表 1, 図 1, 2)

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

表 1. 死亡率 (80 週までの累積死亡数から求めた。)

投与量(ppm)		0	25	3500	7000
死亡率(%)	雄	24	22	25	28
	雌	24	24	24	28

図 1. 生存曲線(雄)

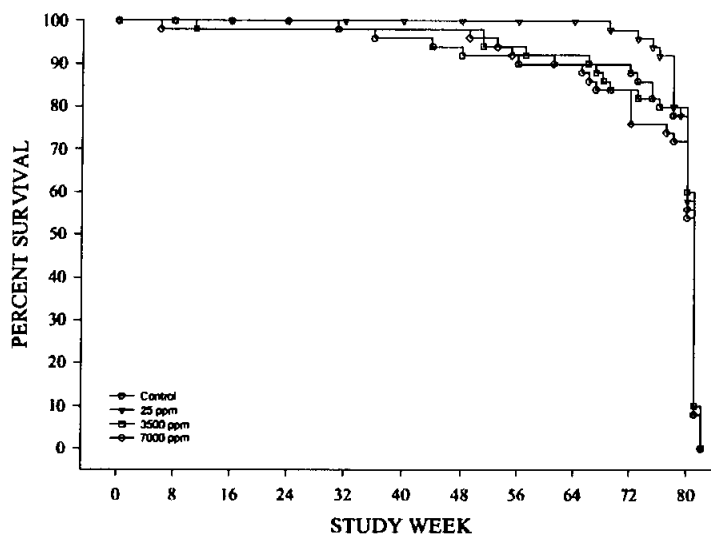
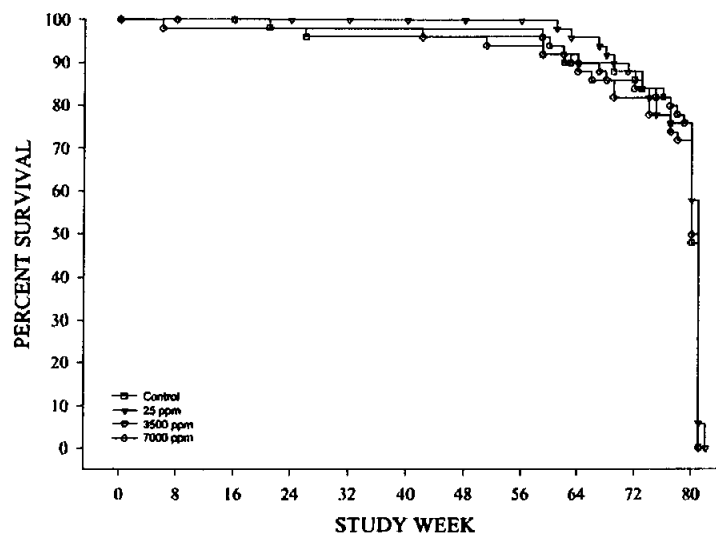


図 2. 生存曲線(雌)



3) 体重(図 3, 図 4)

投与開始前から 13 週まで週 1 回の間隔で、その後は 4 ± 1 週の間隔で生存動物の体重を測定した。

更に、臓器重量の対体重比の算出のため、計画屠殺直前に体重を測定した。

雄の最終体重には有意差は認められなかったが、雌の 3500 及び 7000ppm 群では最終体重において対照群と比較して統計学的に有意な減少(3500ppm:5%, 7000ppm:6%)がみられた。雌で認められたこの減少は極めて軽度であり、また試験全体の体重の評価では増体重に変化は認められないため、この軽度な減少は毒性学的に関連性のあるものではないと考えられた。従って、雌雄ともに全用量群で増体重に変化は認められないと判断した。

図 3. 体重(雄)

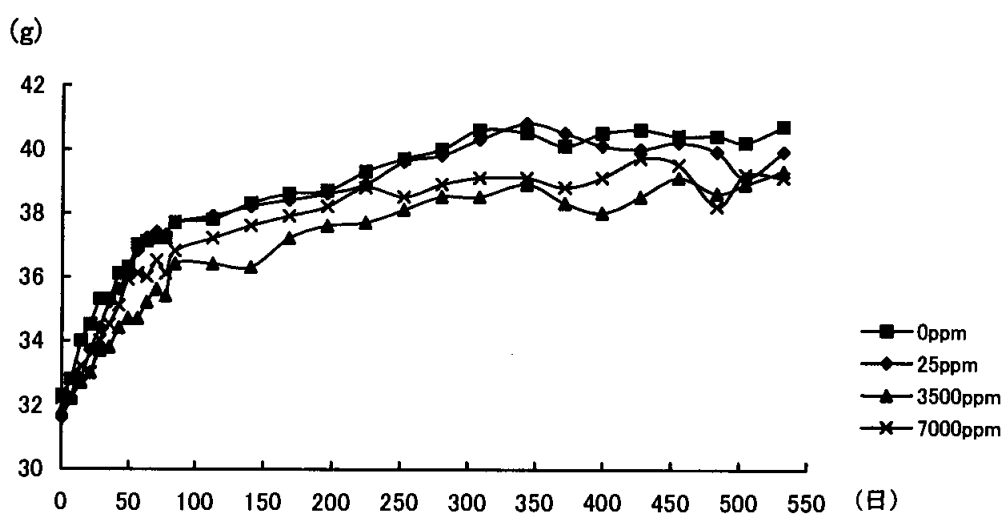
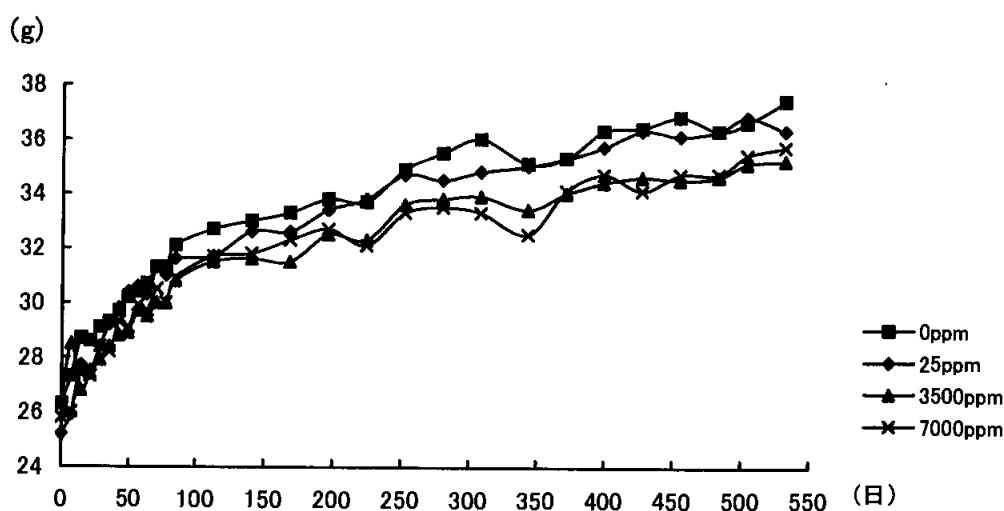


図 4. 体重(雌)



4) 摂餌量及び検体摂取量 (表 2)

摂餌量を個体毎に 13 週まで週 1 回の間隔で、その後は 4 ± 1 週間に 1 回の間隔で測定し、これを基に検体摂取量を算定した。

これらの結果から、動物毎又は体重 kg 当たりの摂餌量は全ての投与群で対照群と同様であった。

以下に検体摂取量 (mg/kg/日) を示す。

表 2. 検体摂取量 (mg/kg/日)

投与量 (ppm)		25	3500	7000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	4.1	610	1216
	雌	5.1	722	1495

5) 血液学的検査 (表 3)

各群任意に選抜した 10 例の非絶食の動物について 12 ヶ月及び 18 ヶ月に血液を眼窩静脈叢から採取した。以下の項目について血液学的検査を行った。ただし、白血球分画については、生存例全例で行った。

赤血球形態、赤血球数 (RBC)、白血球数 (WBC)、白血球百分率、ヘモグロビン量 (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球色素濃度 (MCHC)、平均赤血球容積 (MCV) 及び血小板数 (PLTS)、ハインツ小体 (HZ)、網状赤血球 (Retic)、赤血球密度幅 (EDW: erythrocyte density width)、血色素密度幅 (HDW: hemoglobin density width) を測定又は算定した。

データ間で統計学的な有意性が散見されたが、投与との関連性が疑われた項目は雄における MCHC のみであり、これは 12 及び 18 ヶ月の採血時に 7000ppm で有意に低下し、3500ppm では 12 ヶ月目にのみ有意に低下した。雌の値では対照群と差がなかった。しかし雌雄共に統計学的にもあるいは臨床的にも貧血を示唆する所見は認められなかったことから、これらの MCHC 値には意味がなく、臨床的意義もないものと考えられた。その他の少数の統計学的に有意な値は用量相関を示してないか、片性、単発であり、偶発的なものと考えられた。

従って、雌雄ともに検体に起因した変化は認められないものと評価した。

表3 血液学的検査（有意差の認められた項目）

投与量(ppm)	25	3500	7000	25	3500	7000
検査時期	12ヵ月			18ヵ月		
雄						
白血球						↓61
MCHC			↓92		↓96	↓97
単球			↓45			
雌						
白血球	↓37			↓51		
HDW			↓93			
分葉核好中球					↓78	
リンパ球					↑117	

↑↓：P<0.05 (ANOVA+Dunnett 検定による)，

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの

6) 剖検(表4)

途中死亡動物及び18ヵ月投与した最終屠殺動物の全動物を剖検した。

本検体に関連した所見として、副腎の肥大が高用量群で統計学的に有意に認められた。

表4. 主な剖検所見

性別	雄				雌			
	0	25	3500	7000	0	25	3500	7000
用量(ppm)	0	25	3500	7000	0	25	3500	7000
副腎	50	50	50	50	50	50	50	50
肥大	0	0	2	6*	0	0	3	10**
肝臓	50	50	50	50	50	50	50	50
組織塊	3	5	3	6	3	1	4	4

7) 臓器重量 (表5)

全例の副腎、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、卵巣、脾臓及び精巣の重量を測定し、対体重比も算出した。

副腎、肝臓、精巣で、以下のように検体の影響が窺えた。

副腎の実重量及び体重比重量は対照値に比較して3500及び7000ppmの雌雄で有意に増加した。

肝臓の実重量及び体重比重量は対照値に比較して7000ppmの雌雄及び3500ppmの雄で有意に増加した。

精巣の実重量は対照値に比較して7000ppm群で有意に増加した。体重比重量は3500及び7000ppmの雄で有意に増加した。

尚、腎臓の実重量及び体重比重量は対照値に比較して 3500 及び 7000ppm の雌雄で有意に減少したが、病理組織学的な変化との関連性は認められなかった。

その他の測定臓器では統計学的な有意差も認められず、対照群と同様であった。

表 5 臓器重量 (有意差の認められた項目)

性別		雄			雌		
用量		25	3500	7000	25	3500	7000
体重						↓ 94	↓ 94
副腎	実重量		↑ 150 [#]	↑ 188 [#]		↑ 146 [#]	↑ 177 [#]
	対体重比		↑ 141 [#]	↑ 182 [#]		↑ 150 [#]	↑ 183 [#]
腎臓	実重量		↓ 71	↓ 76		↓ 82	↓ 78
	対体重比		↓ 87	↓ 79		↓ 87	↓ 83
肝臓	実重量		↑ 113	↑ 118			↑ 114
	対体重比		↑ 118 [#]	↑ 123 [#]			↑ 121
精巣	実重量			↑ 119	/	/	/
	対体重比		↑ 115	↑ 123	/	/	/

↑ ↓ : P<0.05

(#Kruskal-Wallis Anova + Mann-Whitney U-tests, その他 Anova+Dunnetts tests), 表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

8) 病理組織学的検査 (表 6 ~ 11)

途中死亡した動物や切迫屠殺動物及び最終屠殺動物について以下の臓器、組織について 10%緩衝ホルマリンに保存した。

副腎、大動脈、骨(肋骨/軟骨結合部、胸骨)、骨髄、脳、盲腸、陰核腺、結腸、精巣上体、食道、外涙腺、眼、胆のう、ハーダー氏腺、心臓、内耳組織、大腿骨/脛骨、腎臓、喉頭、肝臓、肺、リンパ節(頸部、腸間膜)、乳腺、筋肉、鼻組織、鼻咽頭、神経(視神経、坐骨神経)、卵巣、卵管、膵臓、上皮小体、個体識別、下垂体、包皮腺、前立腺、直腸、唾液腺、精のう、皮膚、頭蓋、小腸(十二指腸、空腸、回腸)、脊髄(頸部、腰部、胸部)、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、気管、膀胱、子宮、子宮頸部、膣外耳道腺、肉眼的異常部位

膣、卵管、外耳道腺、外涙腺、陰核腺及び包皮腺を除き、上記全臓器、組織について病理標本を作製し、病理組織学的検査を行った。

1) 非腫瘍性病変 (表 6, 表 10)

鏡検的に、投与に関連した少数の変化が認められた。これらの大部分は肉眼的剖検所見あるいは臓器重量データとよく相関していた。

副腎皮質の空胞化が 3500 及び 7000ppm の雌雄マウスで認められ、有意な値で

あった(雄:0、0、31*、37*、雌:1、6、49*、48*^f)。程度の平均値も3500ppmに比較して7000ppm群の雌雄で高かった(雄:0、0、2.1、2.5、雌:2.0、1.0、2.4、2.9)。

副腎の皮髄境界部における色素沈着の増加が7000ppmの雌雄、3500ppm及び25ppmの雌で認められた(雄:7、5、11、27*；雌:11、20*、45*、42*)。皮髄境界部には正常でもある程度の量の色素が認められ、これは脂質性色素沈着とよばれるものと考えられる。過去の例でみると、2試験における同病変の背景データの頻度は、対照の雄で26/99例(26%)、対照の雌で37/100例(37%)であった。対照群における同変化の背景データからみると、25ppmの雌の値は背景データと近似し、3500ppmの頻度との間には大きな隔たりがあること、また、25ppm群では空胞化の頻度の増加がみられないことから、25ppmの雌における色素沈着の頻度の増加には検体投与との明瞭な関係はないと考えられた。

肝臓では、肝細胞肥大が対照群に比較して3500及び7000ppmの雄で有意に増加した。同変化は雌では認められなかった(雄:2、6、17*、21*、雌:0、0、0、1)。同所見は雄の肝臓重量データとよく相関しており、この変化はおそらく肝薬物代謝酵素の誘導を示唆したものと考えられた。

精巣ライディッヒ細胞の肥大あるいは過形成が3500及び7000ppm雄群で認められ、その頻度が有意に増加した(6、6、26*、31*)。また平均の程度も投与量の増加とともに増強した(1.2、1.3、1.8、2.5)。精巣の精細管変性は高用量でわずかに増加した(18、18、22、28)。精巣上でみられた無精子症の頻度は精巣の変化と関連することが窺われた(15、15、15、26*)。

脳の背景病変である鉍質沈着は対照群に比較して7000ppmの雌で有意に増加した(雄:12、4、12、8；雌:5、7、4、14*)。雄では有意な変化はなく、雌雄共に投与量との関連性が明らかでなかったことから、これは偶発的なもので、投与に関連していないものと考えられる。

^f *= $p \leq 0.05$ で、対照群と比較して統計学的有意差あり(Fisherの確率検定)。

表 6 主な非腫瘍性病変（最終計画屠殺用動物 動物数 50）

性	雄				雌			
	0	25	3500	7000	0	25	3500	7000
臓器/所見								
副腎	50	49	50	49	50	49	50	50
副腎皮質の空胞化	0	0	31*	37*	1	6	49*	48*
色素沈着	7	5	11	27*	11	20*	45*	42*
肝臓	50	50	50	50	50	50	50	50
肝細胞肥大	2	6	17*	21*	0	0	0	1
精巣	50	50	50	50	/	/	/	/
精巣ライディット細胞肥大/過形成	6	6	26*	31*				
精細管変性	18	18	22	28				
精巣上体	50	50	50	50	/	/	/	/
無精子症	15	15	15	26*				
脳	50	50	50	50	50	50	49	50
鋳質沈着	12	4	12	8	5	7	4	14*

* : p<0.05 (Fisher の確率検定)

2) 腫瘍性病変（表 7～9, 表 11）

肝細胞腫瘍（肝細胞の腺腫-雄:0、0、5*、6*、雌:0、0、3、1 及び腺癌-雄:1、1、3、5*、雌:0、0、2、2）が雌雄 3500ppm、7000ppm 群で増加及び増加傾向を示し、更に両腫瘍を合わせた頻度は対照群に比較して 3500 及び 7000ppm の雄及び 3500ppm の雌で有意に増加した。データは両型の腫瘍が認められた 1 例（7000ppm 雄）で補正した（雄:1、1、8*、10*、雌:0、0、5*、3）。*;Fisher の確率検定;p<0.05

両腫瘍合計の背景データでは、18 か月間の試験において、雄で、雌で と示されている。1989～1998 年に実施した社内の 5 試験のデータの背景データは、雄で、雌で であった（本報告書に添付）。本試験では雄対照群の例数は背景データよりも低く、雌の対照群の例数は背景データと一致している。一方本試験の 3500 及び 7000ppm の頻度は雄で 16%及び 20%、雌で 10%及び 6%であり、これらの背景データの範囲を超えており、検体投与との関連が窺われた。検体に変異原性が認められていないことから、これはおそらく前述の肝重量の増加や肝細胞肥大に代表される肝薬物代謝酵素の誘導に伴って誘発したもので、非遺伝学的な腫瘍発生と考えられた。

その他の腫瘍の発生数において、対照群、用量群に著明な差は認められなかった。全ての用量における腫瘍発生数には特記すべきものはなかった。

腫瘍を有する動物数（表 7）、良性及び悪性腫瘍の発生頻度（表 8）に差は認められなかった。また、腫瘍動物の発生における経時的変化（表 9）に用量依存性は認められなかった。

表 7 良性、悪性腫瘍を有する動物数（最終計画屠殺用動物 動物数 50）

性	雄				雌			
	0	25	3500	7000	0	25	3500	7000
用量(ppm)								
	途中死亡動物							
試験動物数	12	11	10	14	12	12	12	14
腫瘍を有する動物数	5	5	1	4	9	7	6	9
良性腫瘍のみを有する動物数	3	0	0	2	0	0	0	4
悪性腫瘍のみを有する動物数	2	5	1	2	7	7	6	5
良/悪性腫瘍を有する動物数	0	0	0	0	2	0	0	0
	最終屠殺動物							
試験動物数	38	39	40	36	38	38	38	36
腫瘍を有する動物数	14	20	12	13	18	23	21	17
良性腫瘍のみを有する動物数	6	13	8	6	6	10	10	5
悪性腫瘍のみを有する動物数	6	4	3	5	8	11	11	8
良/悪性腫瘍を有する動物数	2	3	1	2	4	3	0	4
	全動物							
試験動物数	50	50	50	50	50	50	50	50
腫瘍を有する動物数	19	25	13	17	27	30	27	26
良性腫瘍のみを有する動物数	9	13	8	8	6	10	10	9
悪性腫瘍のみを有する動物数	8	9	4	7	15	18	17	13
良/悪性腫瘍を有する動物数	2	3	1	2	6	3	0	4

表 8. 全動物の腫瘍数

性	雄				雌			
	0	25	3500	7000	0	25	3500	7000
用量(ppm)								
良性腫瘍数	11	17	11	10	17	15	12	15
悪性腫瘍数	11	13	5	9	22	24	19	18
総腫瘍数	22	30	16	19	39	39	31	33

表 9 腫瘍を有する動物の経時的発生数

性	雄				雌			
	0	25	3500	7000	0	25	3500	7000
用量(ppm)								
途中死亡動物数	12	11	10	14	12	12	12	14
腫瘍を有する動物数	5	5	1	4	9	7	6	9
週								
5~12								1
13~25					1		1	
26~38								
39~51								
52~64				1	4	1	2	2
65~77	4	3	1	3	3	6	3	5
78~剖検	1	2			1			1

以上の結果から、本剤のマウスに対する 18 ヶ月間飼料混入投与による発がん性試験における影響として、3500 及び 7000ppm の雌雄で副腎重量の増加、3500 及び 7000ppm の雄あるいは雌で肝臓重量の増加、ならびに 3500 及び 7000ppm の雄で精巣重量の増加が認められた。病理組織学的な重要所見として、3500 及び 7000ppm の雌雄で副腎皮質の空胞化、3500 及び 7000ppm の雄あるいは雌で副腎皮髄境界部の色素沈着、3500 及び 7000ppm の雄で肝細胞肥大、また、3500 及び 7000ppm の雄では精巣間質細胞の肥大/過形成において発生率の増加が認められた。

重要な腫瘍性変化として、肝細胞腺腫及び癌の総発生率の増加が 3500 及び 7000ppm の雄あるいは 3500ppm の雌で認められた。体重増加量、摂餌量、臨床観察、生存率及び血液学的検査を含め、生存期間中のパラメータはいずれも検体曝露による影響を受けなかった。

従って本試験条件下において、本剤の雌雄マウスに対する無毒性量 (NOAEL) は、飼料中濃度 25ppm (雄 : 4.1mg/kg/日, 雌 : 5.1mg/kg/日) であった。

表 10 主要な非腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	25	3500	7000	0	25	3500	7000
時期	所見\検査動物数								
死亡・ 切迫 殺動物	副腎	12	10	10	14	12	12	12	14
	副腎皮質の空胞化	0	0	5	6	0	0	11	12
	色素沈着	1	2	2	4	0	5	10	11
	肝臓	12	11	10	14	12	12	12	14
	肝細胞肥大	1	1	2	3	0	0	0	0
	精巣	12	11	10	14	/	/	/	/
	精巣ライゲ ^テ ィット細胞肥大/過形成	0	0	4	4				
	精細管変性	4	4	5	11				
	精巣上体	12	11	10	14	/	/	/	/
	無精子症	4	4	4	9				
	脳	12	11	10	14	12	12	12	14
鋳質沈着	1	0	2	1	0	3	0	0	
最終 屠殺 動物	副腎	38	39	40	35	38	37	38	36
	副腎皮質の空胞化	0	0	26	31	1	6	38	36
	色素沈着	6	3	9	23	11	15	35	31
	肝臓	38	39	40	36	38	38	38	36
	肝細胞肥大	1	5	15	18	0	0	0	1
	精巣	38	39	40	36	/	/	/	/
	精巣ライゲ ^テ ィット細胞肥大/過形成	6	6	22	27				
	精細管変性	14	14	17	17				
	精巣上体	38	39	40	36	/	/	/	/
	無精子症	11	11	11	17				
	脳	38	39	40	36	38	38	37	36
鋳質沈着	11	4	10	7	5	4	4	14	
全 動物	副腎	50	49	50	49	50	49	50	50
	副腎皮質の空胞化	0	0	31*	37*	1	6	49*	48*
	色素沈着	7	5	11	27*	11	20*	45*	42*
	肝臓	50	50	50	50	50	50	50	50
	肝細胞肥大	2	6	17*	21*	0	0	0	1
	精巣	50	50	50	50	/	/	/	/
	精巣ライゲ ^テ ィット細胞肥大/過形成	6	6	26*	31*				
	精細管変性	18	18	22	28				
	精巣上体	50	50	50	50	/	/	/	/
	無精子症	15	15	15	26*				
	脳	50	50	50	50	50	50	49	50
鋳質沈着	12	4	12	8	5	7	4	14*	

*: p<0.05 (Fisher の確率検定-全動物のみ-)

表 11-1 腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	25	3500	7000	0	25	3500	7000
時期	所見\検査動物数								
死亡・ 切迫 殺動物	肺	12	11	10	14	12	12	12	14
	腺腫 (b)	2	0	0	0	1	0	0	0
	腺癌 (m)	0	1	0	1	1	0	0	0
	脾臓	12	11	10	14	12	12	12	14
	血管肉腫 (m)	0	0	0	0	0	0	1	0
	血管腫 (b)	1	0	0	0	0	0	0	0
	肝臓	12	11	10	14	12	12	12	14
	血管肉腫 (m)	0	2	0	0	0	0	1	0
	肝細胞腺腫 (b)	0	0	0	2	0	0	0	1
	肝細胞腺癌 (m)	0	0	0	1	0	0	0	0
	子宮	/	/	/	/	12	12	12	14
	間質ポリープ (b)					1	0	0	0
	平滑筋肉腫					0	1	0	0
	卵巣	/	/	/	/	12	12	12	14
	血管肉腫 (m)					0	0	0	1
	癌 (m)					1	0	0	0
	直腸	12	11	10	14	12	12	12	14
	扁平上皮癌 (m)	0	0	1	0	0	0	0	0
	ハーダー氏腺	12	11	10	14	12	12	12	14
	腺腫 (b)	0	0	0	0	0	0	0	2
	骨	12	11	10	14	12	12	12	14
	軟骨腫 (b)	0	0	0	0	0	0	0	1
	骨肉腫 (m)	0	0	0	0	1	0	0	0
	頭蓋骨	12	11	10	14	12	12	12	14
	扁平上皮癌 (m) 浸潤	0	0	0	0	1	0	0	0
	皮膚	12	10	10	14	12	12	12	14
	線維肉腫	0	0	0	0	0	1	0	0
	全身腫瘍	12	11	10	14	12	12	12	14
	悪性リンパ腫	1	1	0	0	1	5	4	2
	組織球肉腫	1	1	0	0	4	1	1	2

表 11-2 腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	25	3500	7000	0	25	3500	7000
最 終 屠 殺 動 物	所見\検査動物数								
	副腎	38	39	40	35	38	37	38	36
	褐色細胞腫 (b)	0	0	0	0	0	1	0	1
	皮質腺腫 (b)	0	0	0	0	0	0	1	1
	肺	38	39	40	36	38	38	38	36
	腺腫 (b)	3	13	5	2	6	6	3	2
	腺癌 (m)	3	1	0	2	0	1	1	0
	肝臓	38	39	40	36	38	38	38	36
	血管肉腫 (m)	1	1	0	0	0	0	1	0
	血管腫 (b)	0	0	0	0	0	0	0	1
	肝細胞腺腫 (b)	0	0	5	4	0	0	3	0
	肝細胞腺癌 (m)	1	1	3	4	0	0	2	2
	下垂体	37	39	39	35	37	38	38	36
	腺腫 (b)	0	0	0	0	0	1	0	0
	甲状腺	38	39	40	36	38	38	38	36
	ろ胞細胞腺腫 (b)	0	1	0	0	1	0	0	0
	上皮小体	35	38	38	36	38	37	37	31
	腺腫 (b)	0	0	0	0	0	1	0	0
	精巣	38	39	40	36	/	/	/	/
	ライゲイト細胞腫瘍	0	1	0	1				
	子宮	/	/	/	/	38	38	38	36
	間質ポリープ (b)					2	2	1	0
	平滑筋腫 (b)					0	0	0	1
	平滑筋肉腫 (m)					2	0	0	0
	血管腫 (b)					0	1	1	0
	神経鞘腫 (b)					0	1	0	0
	子宮頸部	/	/	/	/	38	38	38	36
	神経鞘腫 (b)					1	0	0	0
	卵巣	/	/	/	/	38	38	38	36
	腺腫					0	0	0	1
	のう胞腺腫					2	0	0	0
	卵管	/	/	/	/	37	37	36	35
	平滑筋腫 (b)					0	0	0	1
	胸腺	36	37	31	33	38	38	37	35
	胸腺腫 (b)	0	0	0	0	0	0	0	1
	乳腺	38	39	40	35	38	38	38	36
	腺癌 (m)	0	0	0	0	0	2	0	2
	空腸	38	39	40	35	38	38	38	36
	腺癌 (m)	0	0	0	1	0	0	1	0

表 11-3 腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	25	3500	7000	0	25	3500	7000
最 終 屠 殺 動 物	所見\検査動物数								
最 終 屠 殺 動 物	ハーダー氏腺	38	39	40	36	38	38	38	36
	腺腫 (b)	3	1	0	1	2	2	2	1
	のう胞腺腫 (b)	2	0	0	0	0	0	0	0
	腸間膜リンパ節	37	39	39	36	38	36	37	36
	血管肉腫 (m)	0	0	1	0	0	0	0	0
	皮膚	38	39	40	36	38	38	38	36
	血管腫 (b)	0	1	0	0	0	0	0	0
	乳頭腫 (b)	0	0	1	0	0	0	0	0
	全身腫瘍	38	39	40	36	38	38	38	36
	悪性リンパ腫 (m)	3	3	0	0	7	9	6	7
	組織球肉腫 (m)	0	0	0	0	4	3	2	0
	中皮腫 (m)	0	1	0	0	0	0	0	0
	白血病 (m)	1	0	0	0	0	0	0	1
全 動 物	副腎	50	49	50	49	50	49	50	50
	褐色細胞腫 (b)	0	0	0	0	0	1	0	1
	皮質腺腫 (b)	0	0	0	0	0	0	1	1
	肺	50	50	50	50	50	50	50	50
	腺腫 (b)	5	13*	5	2	7	6	3	2
	腺癌 (m)	3	2	0	3	1	1	1	0
	脾臓	50	50	50	48	50	50	50	50
	血管肉腫 (m)	0	0	0	0	0	0	1	0
	血管腫 (b)	1	0	0	0	0	0	0	0
	肝臓	50	50	50	50	50	50	50	50
	血管肉腫 (m)	1	3	0	0	0	0	2	0
	血管腫 (b)	0	0	0	0	0	0	0	1
	肝細胞腺腫 (b)	0	0	5*	6*	0	0	3	1
	肝細胞腺癌 (m)	1	1	3	5*	0	0	2	2
	下垂体	49	50	49	49	49	50	50	50
	腺腫 (b)	0	0	0	0	0	1	0	0
	甲状腺	50	50	49	49	50	50	50	50
	ろ胞細胞腺腫 (b)	0	1	0	0	1	0	0	0
	上皮小体	47	49	48	50	50	49	48	45
	腺腫 (b)	0	0	0	0	0	1	0	0
精巣	50	50	50	50	/	/	/	/	
ライディット細胞腫瘍 (b)	0	1	0	1					

* : p<0.05 (Fisher の確率検定-全動物のみ)

表 11-4 腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	25	3500	7000	0	25	3500	7000
	所見\検査動物数								
全 動 物	子宮	/	/	/	/	50	50	50	50
	間質ポリープ(b)					3	2	1	0
	平滑筋腫(b)					0	0	0	1
	平滑筋肉腫(m)					2	1	0	0
	血管腫(b)					0	1	1	0
	神経鞘腫(b)					0	1	0	0
	子宮頸部	/	/	/	/	50	50	50	50
	神経鞘腫(b)					1	0	0	0
	卵巣	/	/	/	/	50	50	50	50
	腺腫					0	0	0	1
	のう胞腺腫(b)					2	0	0	0
	血管肉腫(m)					0	0	0	1
	癌(m)					1	0	0	0
	卵管	/	/	/	/	49	49	49	49
	平滑筋腫(b)					0	0	0	1
	胸腺	48	48	41	46	49	48	49	49
	胸腺腫(b)	0	0	0	0	0	0	0	1
	乳腺	50	50	50	49	50	50	50	50
	腺癌(m)	0	0	0	0	0	2	0	2
	空腸	50	50	50	49	50	50	50	50
	腺癌(m)	0	0	0	1	0	0	1	0
	直腸	50	50	50	49	50	50	50	50
	扁平上皮癌(m)	0	0	1	0	0	0	0	0
	ハーダー氏腺	50	50	50	49	50	50	50	50
	腺腫(b)	3	1	0	1	2	2	2	3
	のう胞腺腫(b)	2	0	0	0	0	0	0	0
	骨								
	軟骨腫(b)	0	0	0	0	0	0	0	1
	骨肉腫(m)	0	0	0	0	1	0	0	0
	腸間膜リンパ節	49	48	48	49	50	47	49	50
	血管肉腫(m)	0	0	1	0	0	0	0	0
	頭蓋骨	50	50	50	49	50	50	50	50
扁平上皮癌(m)浸潤	0	0	0	0	1	0	0	0	
皮膚	50	50	50	49	50	50	50	50	
血管腫(b)	0	1	0	0	0	0	0	0	
乳頭腫(b)	0	0	1	0	0	0	0	0	
線維肉腫(m)	0	0	0	0	0	1	0	0	

表 11-5 腫瘍性病変

検査 時期	性別	雄				雌			
	投与群 (ppm)	0	25	3500	7000	0	25	3500	7000
時期	所見\検査動物数								
全 動 物	全身腫瘍	50	50	50	50	50	50	50	50
	悪性リンパ腫 (m)	4	4	0	0	8	14	10	9
	組織球肉腫 (m)	1	1	0	0	8	4	3	2
	中皮腫 (m)	0	1	0	0	0	0	0	0
	白血病 (m)	1	0	0	0	0	0	0	1

(毒性資料No.16-1)

試験機関 :
:

[GLP 対応]

報告書作成年月日 : 2002年9月30日

検体の純度 :

試験動物 :

投与期間 :

【試験目的】

【試験方法】

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

【試験項目及び試験結果】

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

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

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

(10) 繁殖毒性及び催奇形性

スピロジクロフェンのラットの繁殖性に及ぼす影響

(毒性資料 No. 原体-17)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：2000年2月16日

検体の純度：

試験動物：ウイスター系ラット，1群雌雄各25匹，投与開始時5～6週齢

世代数：2世代，第一産児で継代

試験期間：1997年11月～1999年7月

投与期間：P世代；実験開始からF₁産児の離乳時までの約19週間，
F₁世代；F₂産児の離乳時までの約19週間

【投与方法】

ラット用標準飼料に検体を0、70、350及び1750ppmの用量になるように添加し動物に自由に摂取させた。

用量設定の根拠；

【方法及び試験項目】

表 1. 概要

世代	期間(週間)	作業手順	試験項目
P	生育(12週間) (交配前)		一般状態の観察(毎日) 体重及び摂餌量の測定(週1回), 性周期の判定(交配前3週間から毎日)
	交配 (最長3週間)	雌雄1対1で交配。 膣栓又は膣塗抹による 精子の確認(妊娠0日)	交配状況の観察 一般状態の観察(0, 7, 14, 20日) 体重測定(妊娠0, 7, 14, 20日)
	妊娠(3週間)		摂餌量測定(妊娠2週, 3週)
	出産		出産状況の観察 新生児数, 死亡児数, 性比の算定、新生 児の体重測定と外表の観察
	哺育(4週間)	出産後4日目各同腹児 数を雄4匹、雌4匹に調 整	親動物 一般状態の観察(0, 4, 7, 14, 20, 21, 28日) 体重測定(出産0, 4, 7, 14, 21, 28日) 新生児 体重測定(出産0, 4, 7, 14, 21, 28日) 新生児の外表及び症状観察, 出産後4日 目に淘汰された新生児の異常の観察 雄親動物の精子検査
.....	離乳	親動物及び継代用以外の児動物の剖検 親動物 病理組織学的検査, 臓器重量測定(脳、下垂体、肝臓、腎臓。 脾臓、子宮、精のう及び凝固腺、前立腺、 精巣上体、精巣、卵巣)
F1	生育(12週間)	継代用の各群雌雄25匹 ずつ25腹から無作為に 選抜	離乳児 性成熟の観察[包皮分離, 膣開口が認めら れるまで観察] (出産後28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49日) 継代用以外の児動物について剖検, 臓器重量測定(脳、脾臓、胸腺) (P世代に準ずる) 血液生化学検査(雌雄各10匹)
	交配 (最長3週間)	(P世代に準ずる)	
	妊娠(3週間)		(P世代に準ずる)
.....	出産	(P世代に準ずる)
F2	哺育(4週間)	(P世代に準ずる)	
	離乳	(F ₁ 世代に準ずる) 親動物(F1)及び児動物(F2)の剖検, 臓器重量測定(F ₁ 世代に準ずる)

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

一般状態及び死亡率；

全動物の全検査期間に一般状態及び生死を毎日観察した。また週の最初のケージ交換時に詳細な検査を行った(一般状態、行動、被毛、天然孔、排泄物)。妊娠期間中には0、7、14及び20日に、授乳期間中には0、4、7、14、21及び28日に検査を行った。

体重、摂餌量及び検体摂取量；

交配前期間は毎週体重を、雄動物については19週(P)または20週(F1)まで、雌については11週(P)または12週(F1)まで測定した。妊娠中は妊娠0、7、14及び20日に、出産後は0、4、7、14、21及び28日に測定した。

交配前期間は摂餌量を毎週1回測定した。妊娠期間中の摂餌量測定は2週目、3週目に行った。哺育期間中は摂餌量測定は行わなかった。

摂餌量をもとに、検体摂取量を算出した。

性成熟の観察；

更に投与を行うために選択したすべてのF1離乳児について、包皮分離あるいは膣開口が観察された週齢を調べた。この包皮及び膣の検査は、出産後28、31、34、37、40、43、46及び49日に、それらが発現するまで行った。

発情周期の判定；

P及びF1世代の雌全例において、交配前期間の最後の3週間から交尾が確認されるまで毎日膣垢塗抹を行い評価した。

交配及び妊娠の確認；

交配は雌の発情期を膣垢塗抹で確認し、雌雄1対1で同居させ、翌日、膣栓あるいは精子を検査することにより交尾を確認した。

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

繁殖性に関する指標；

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

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

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

$$\text{出生率 (\%)}^{\S} = \frac{\text{出生時生存児数}}{\text{総新生児数}} \times 100$$

$$\text{4日生存率 (\%)}^{\S} = \frac{\text{4日目の調整前の生存児数}}{\text{出生時生存児数}} \times 100$$

$$\text{哺育率 (\%)}^{\S} = \frac{\text{3/4週間後における生存児数}}{\text{4日目の生存児数(調整後)}^{**}} \times 100$$

* 精子が確認されなかった妊娠雌を含む。

** 調整時に死亡した瀕死の新生児は除外した。

§ 各群の指標の算出は各群の新生児総数に基づく。

精子検査

P及びF1世代雄について、0、350(F1世代のみ)、1750ppm群の精子について、屠殺時に精巣の精子細胞数と精巣上体の精子の数、運動性、形態について調べた。

新生児の記録；

出生時、産児数、死産児数、生存児数、外表異常の有無、性、体重を測定した。

生存児については、生後4日、7日、14日、21日、28日に生存数を数えた。

これらの時点で個体別体重、臨床症状を記録した。

血液生化学的検査；

血液試料の臨床化学的検査は交配前期間終了時の13週の発情周期判定後に、F1世代の各群の10匹について、以下の項目を測定した。

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), コレステロール, クレアチニン, グルコース, トリグリセリド, 非エステル結合型脂肪酸(UFA)

なおこれら項目のうち、グルコースは無麻酔下、非絶食の動物から採血し除蛋白処理した全血を用い測定した。その他の項目の測定には、エーテル麻酔下で、非絶食のラットの後部眼窩静脈叢から採血した末梢血の血漿を用いて行った。

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

臓器重量の測定；

P及びF1親動物の臓器重量

脳、下垂体(固定後)、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、子宮、精のう及び凝固腺、前立腺、精巢上体(左側)、精巢及び卵巣の臓器重量測定を計画屠殺時に行った。

F1及びF2離乳児の臓器重量

計画屠殺時に各腹の最初の雌雄の離乳児(各腹のF1新生児雌雄、各投与群の最初の5腹のF2新生児)について、体重並びに脳、脾臓及び胸腺重量を測定した。

剖検；

親動物の剖検

F1又はF2新生児を離乳後、母動物は二酸化炭素で麻酔し放血屠殺後、肉眼的に剖検した。P及びF1世代の母動物については、子宮を硫化アンモニウムで染色し、着床痕を算定して記録した。

P及びF1世代雄はその後の処理に必要ではなくなったときに二酸化炭素で麻酔し放血屠殺後、剖検した。

児動物の剖検

腹児数を削減するために選択した児動物は、分娩4日後に二酸化炭素で屠殺した。分娩後28日、以後の投与に用いない離乳児を二酸化炭素で麻酔し頭部を脱臼させることにより屠殺した。屠殺した全児動物について剖検した。

病理組織学的検査；

全ての親動物について以下の組織を採取した。

副腎、肝臓、乳腺、卵巣及び卵管、下垂体、前立腺、凝固腺を含む精のう、皮膚、小腸(十二指腸、空腸、回腸)、胃、子宮、膣、精巢、精巢上体、入れ墨した耳介(個体識別部)、肉眼的異常部位

ダビットソン固定液で固定した精巢、精巢上体を除き、他の組織は4%緩衝ホルマリン溶液中に固定した。

上記にあげた臓器、組織を切り出し、脱水した後、パラフィン(パラプラスチック)で包埋し、4 μ mに薄切した。切片はヘマトキシリン・エオシンで染色した。さらに精巢上体及び精巢はPAS染色した。

副腎、凝固腺、精巢上体、卵巣、前立腺、精のう、小腸、胃、精巢並びに肉眼的病変においては全群の全ての動物について病理組織学的検査を行った。

さらに、肝臓、乳腺、卵管、下垂体、皮膚、宮頸部を含む子宮、膣について、対照群と1750ppm群で病理組織学的検査を行った。

また、対照群と1750ppm群における全動物の肝臓については凍結切片を作成し、オイルレッドOにより脂肪を染色した。

【結果】

概要を表5に示した。

1) 一般観察

試験期間中、検体投与に起因した中毒症状は、いずれの世代においても認められなかった。また、F1世代の0ppm群の雌1例を難産により切迫屠殺したが、他に切迫屠殺例及び死亡例は認められなかった。

2) 体重(図1, 図2)

70ppm(雄P)あるいは350ppmまで(雄F1, 雌P, F1)親動物の体重増加に及ぼす影響は認められなかった。350ppm(雄P)でみられた軽度の低体重(最高-5.1%)は、検体による影響の境界域にあると考えられる。1750ppmでは両世代で対照群に比べて統計学的に有意な低体重を示し、P世代雄では(-7%)の体重増加抑制、雌では主として授乳期間中に(19週に-15.2%)体重増加抑制が認められた。F1世代では低体重が雄(最高で1週目の-23%)及び雌で哺育期間中に(14日目に-10.3%)認められた。

図1. P世代親動物 雌雄の体重

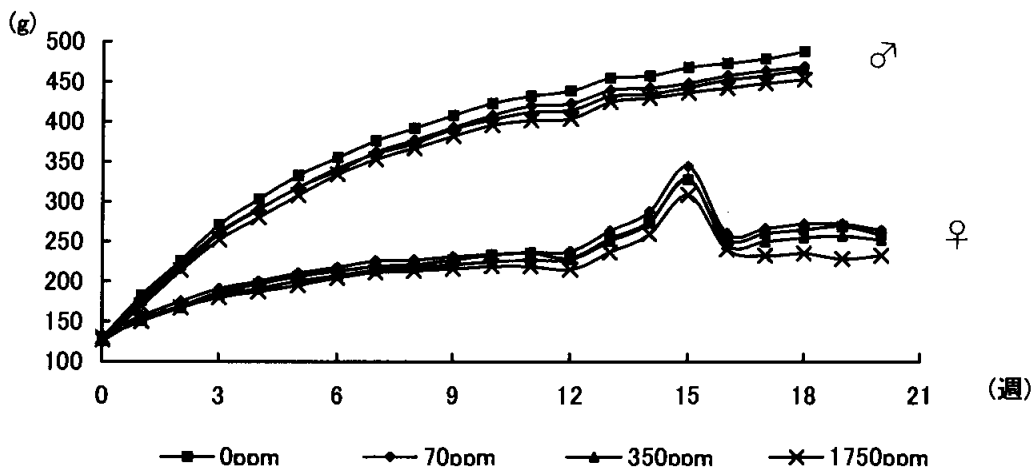
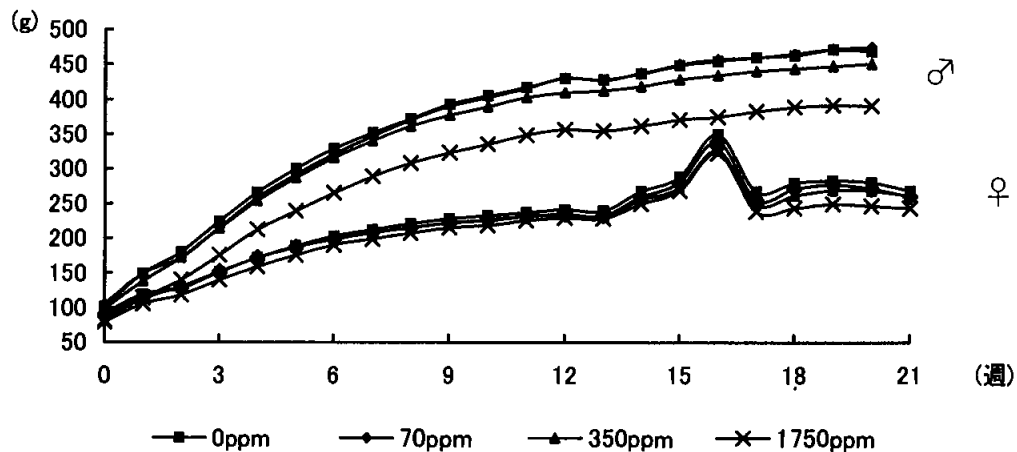


図2. F1世代親動物 雌雄の体重



3) 摂餌量及び検体摂取量(表1)

P世代では摂餌量は雌雄ともに1750ppmまで対照群と同様であった。また、各用量群の検体摂取量は理論的な用量段階とほぼ一致していた。

F1世代では動物あたりの摂餌量は雄では1750ppmまで、雌では350ppmまで対照群のものと差は認められなかった。1750ppm群のF1世代雌では対照群を15%上回った。さらに、体重あたりの摂餌量は、1750ppmでは雌雄ともに増加が認められた(雄+20%, 雌+18%)。また、350ppmまでの投与群の検体摂取量は理論的な用量段階とほぼ一致していた。高用量群の検体摂取量は用量比よりわずかに高かった。

表1 検体摂取量(mg/kg/日)

投与量	P世代			F1世代		
	70	350	1750	70	350	1750
雄	5.2	26.2	134.8	6.4	30.2	177.6
雌	5.5	27.6	139.2	7.0	34.4	192.7

4) 性成熟の観察(表2)

投与を継続した全てのF1離乳児について、包皮分離あるいは膣開口が認められた日齢を調べた結果、外部生殖器の成熟は雄では350ppmまで、雌では1750ppmまで検体投与による影響は認められなかった。雄の1750ppmでは体重増加抑制に関連して包皮分離が他の群よりもわずかに遅延した。

表2 F1離乳児の性成熟発達の指標 (平均日齢)

用量	0	70	350	1750
包皮分離(日)	35.4	35.0	35.4	37.4**
膣開口(日)	37.0	37.4	37.0	37.6

** : P<0.01 (Bartlett検定+Dunnett検定)

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

5) 発情周期の判定(表 3)

P 及び F1 世代共に発情周期の平均期間は対照群のものと同様であった。19 日以内に認められた発情周期の回数及び不規則な周期を示す雌数には投与群と対照群で顕著な変化は認められなかった。

表 3 発情周期(日)

世代/用量	0	70	350	1750
P	4.07	4.24	4.05	4.24
F ₁	4.22	4.12	4.09	4.20

6) 繁殖能(表 4)

P 世代では、交尾率、受胎率、出産率、妊娠期間など繁殖能について全ての群で検体投与による影響は認められなかった。

一方、F1 世代では、受胎率、出産率、妊娠期間については、1750ppm まで検体投与による影響は認められなかった。また交尾率に関しては 350ppm まで顕著な差は認められなかったが、1750ppm では統計学的に有意ではないもののわずかな低下が認められた。F1 雄 4 例で精子が認められなかったことを考慮すると、これは検体による影響と考えられた。

表 4 繁殖能

項目/世代	P				F1			
	0	70	350	1750	0	70	350	1750
投与用量(ppm)	0	70	350	1750	0	70	350	1750
交尾率(%) [§]	100	100	100	100	100	96	96	92 ^{#)}
受胎率(%) [§]	96.0	96.0	96.0	92.0	96.0	91.7	91.7	91.3
出産率(%) [*]	95.8	100	100	100	95.8	100	100	95.7
妊娠期間(日) [*]	21.9	22.1	22.0	21.6	22.3	22.1	22.5	22.1
同居させた雌数	25	25	25	25	25	25	25	25
交尾雌数 ^{§)1)}	25	25	25	25	25	24	24	23 ^{#)}
切迫屠殺雌数	0	0	0	0	1	0	0	0
総吸収胚雌数	1	0	0	0	0	0	0	1
再交配させた雌数	0	0	0	0	0	1	0	2
妊娠動物数 [§]	24	24	24	23	24	22	22	21
生存児を有する腹数 [*]	23	24	24	23	23	23	22	22

§) 再交配を含まない, ¹⁾精子は確認できなかったが妊娠した雌を含む, ^{*}再交配を含む

^{#)} 臙垢が認められたが、精子が認められず妊娠しなかった 2 例の雌を含む

Fisher test(Two tailed)

7) 精子検査(表 5)

P 及び F1 世代雄の 1750ppm では精子の運動性及び形態に及ぼす影響は認められなかった。精巢上体 1mg あたりの精子数及び精巢の精子細胞数については P 世代では 1750ppm まで、F1 世代では 350ppm まで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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

F1 世代では 1750ppm で精子細胞、精子数が 0 であった雄 4 例のために、これらの値の群平均が対照群に比し減少した。これらの雄 4 例は、体重増加量が極めて少なく、また精巣及び精巣上体の萎縮が認められ、精巣上体で精子減少症を伴っていた。更にこれらのうち 2 例にはライディッヒ細胞の増生も認められた。尚、これらの 4 例のデータを除外すると、精子/精子細胞数の平均は他の群と同様であった。

これらのことから、これは特に F1 世代雄で体重による悪影響が認められたことに関連しているとも考えられるが、検体の 1750ppm は F1 世代雄の雄性生殖器に影響した可能性もまた否定できなかつた(17)病理組織学的検査の項参照)。

表 5 精子検査

	P				F1			
	0	70	350	1750	0	70	350	1750
精子細胞数/精巣 1mg	48760	—	—	46217	47971	—	47606	37087 (44151)
精子数/精巣上体 1mg	780617	—	—	755865	889967	—	982994	733837** (873616)
精子の運動性(%) 1 分後 / 5 分後	86/76	—	—	88/83	89/81	—	—	92/87
精子の異常(%)	0.88	—	—	0.48	0.96	—	—	0.52

**： p<0.01 (Bartlett 検定+Steel 検定)， ()内の数値；無精子、無精子細胞の 4 例を除いた値

8) 新生児の出生時のデータ (表 6)

出生時新生児総数、死亡児数及び生存児数、新生児の性比、同腹児数(生存児のみ)については、F1 世代、F2 世代共に 1750ppm までこれらの項目に何ら影響は認められなかつた。

表 6 出生時のデータ

項目/世代	F1				F2			
	0	70	350	1750	0	70	350	1750
投与用量(ppm)	0	70	350	1750	0	70	350	1750
新生児数(出生時)	263	265	284	254	230	222	214	205
死亡児数(出生時)	1	0	0	1	1	2	1	4
生存児数(出生時)	262	265	284	253	229	220	213	201
性比(%) 雄	50.2	52.1	48.2	53.5	48.7	47.3	50.0	51.7
母動物数 ¹⁾	23	24	24	23	22	22	22	20
出生時同腹児数 ²⁾	11.39	11.04	11.83	11	9.96	10	9.68	10.05

1) 再交配雌を含まない、2) 生存児のみ

9) 新生児の臨床観察

4 週間の哺育期間中の新生児において、F1 及び F2 世代共に 1750ppm までの用量において顕著な臨床所見は認められなかつた。F1 世代 350ppm の新生児 1 例では出

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

生時に尾の欠損が認められた。その他の奇形は認められず、また F2 新生児では何ら奇形は認められなかった。

10) 新生児の体重(表7)

F1 世代では出生時の同腹児重量では 350ppm まで影響はなく、1750ppm で軽度に減少したが統計学的な有意差は認められなかった。離乳時(分娩後 28 日)では同腹児重量の有意な減少が 350ppm 以上で認められた。

一方、出生時の個体別新生児体重では雄では統計学的に有意な影響は 1750ppm 群まで認められなかった。雌では 350ppm 以上で対照群に比し低体重であり、統計学的に有意であった。体重増加量では、雌雄ともに 350ppm 以上で体重増加遅延がみられたが、70ppm での影響は認められなかった。

F2 世代では出生時、離乳時の同腹児重量では、70ppm では影響は認められなかった。350ppm 以上では減少傾向がみられたが、統計学的に有意な差が認められたのは雌 1750ppm における離乳時のみの減少であった。

一方、個体別新生児体重においては、出生時に 70ppm では雌雄共に影響が認められなかったが、350ppm 以上で統計学的に有意な減少がみられた。授乳期間中においては、70 及び 350ppm 群では雌雄共に影響が認められなかった。1750ppm では新生児体重に雌雄ともに統計学的に有意な低下が認められた。

表7 新生児の体重(g)

項目/世代	F1				F2			
	0	70	350	1750	0	70	350	1750
同腹児重量								
0 日	64.06	64.95	65.45	61.48	61.72	62.18	57.26	57.25
28 日	547.72	491.98	484.44↓	446.67↓	545.71	525.90	487.75	448.23↓
個体別重量								
0 日 ♂	5.73	6.08↑	5.66	5.62	6.39	6.44	6.10↓	5.99↓
♀	5.59	5.66	5.41↓	5.30↓	6.17	6.06	5.72↓	5.37↓
選抜後 4 日 ♂	9.61	10.00	9.01↓	8.73↓	10.68	10.48	10.11	9.90↓
♀	9.40	9.41	8.55↓	8.40↓	10.44	10.03	9.87	8.97↓
7 日 ♂	14.52	14.71	13.88↓	12.80↓	15.27	16.23↑	15.59	14.75
♀	14.32	14.05	13.17↓	12.42↓	15.39	16.06	15.34	13.52↓
14 日 ♂	28.77	30.40↑	28.12↓	23.64↓	30.09	30.14	29.50	25.73↓
♀	28.51	29.49↑	27.00↓	23.19↓	30.03	29.19	29.31	24.22↓
21 日 ♂	44.98	46.94↑	43.28↓	35.32↓	46.00	45.70	45.58	38.31↓
♀	44.26	45.25	41.89↓	34.85↓	45.51	44.44	44.74	35.92↓
28 日 ♂	75.34	77.45	71.27↓	58.20↓	74.17	72.50	72.19	62.28↓
♀	71.09	71.40	67.13↓	56.66↓	70.31	68.72	69.07	57.57↓

↑ ↓; P<0.05, ↑ ↓; P<0.01 (U-test)

11) 新生児の生存率及び哺育率(表 8)

出生時生存率、4日後生存率及び哺育率に関して、F1 新生児、F2 新生児共に、投与群と対照群との間に差は認められなかった。尚、F1 新生児において、70ppm 及び 350ppm において哺育率の統計学的に有意な低下が認められているが、これは背景データ範囲内(72.9 - 100%)にあり、影響とはとらえなかった。

表 8 新生児生存率及び哺育率

項目/世代	F1				F2			
	0	70	350	1750	0	70	350	1750
投与用量(ppm)								
出生時生存率(%)&	99.6	100	100	97.2	99.6	99.1	99.5	98.0
4日生存率(%)&	98.1	97.7	99.3	96.8	98.3	98.2	99.1	97.5
哺育率(%)&	94.5	86.4*	87.5*	98.3	97.8	98.8	95.0	99.3

&各群の総新生児数をもとに計算, *:P<0.05(Fisher-test)

12) 離乳児の臓器重量(表 9)

F1 及び F2 離乳児では 70ppm で変化は認められなかった。高用量群では、両世代離乳児ともに、体重の減少にともなった実重量の減少傾向が認められた。

表 9 臓器重量 (有意差の認められた項目)

世代		F1					
性別		雄			雌		
投与量(ppm)		70	350	1750	70	350	1750
体重				↓79		↓91	↓87
脳	実重量			↓95			
	対体重比			↑121		↑109	↑122
脾臓	実重量			↓69			↓79
胸腺	実重量			↓83			↓81
世代		F2					
性別		雄			雌		
脾臓	対体重比		↓78				

↑ ↓ : p<0.05, ↑ ↓ : p<0.01 (ANOVA+Dunnett, 申請者により実施), 表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

13) 新生児又は離乳児の剖検

F1 及び F2 新生児では 1750ppm まで検体に関連した肉眼的病理所見は認められなかった。また新生児又は離乳児の骨格の発達でも 1750ppm までの用量で影響は認められなかった。

14) 血液生化学的検査(表 10)

F1 世代親動物で行った血液生化学的検査では 350ppm まで毒性学的関連性のある変化は認められなかった。

アルカリホスファターゼ (Aph) 活性は、1750ppm では雌雄共統計学的に有意に増加した。またコレステロール(雄 350ppm, 1750ppm, 雌 1750ppm)及びトリグリセリド(雄 70ppm, 350ppm, 1750ppm, 雌 1750ppm)の減少とともに非エステル結合型脂肪酸(UFA)量(雄 1750ppm, 雌 350ppm, 1750ppm)の統計学的に有意な減少が認められた。脂質に関する項目のうち、非エステル化脂肪酸(背景データは得られていない)を除き、有意差の認められた全ての値は背景データの範囲内(

)にあった。しかしながら、1750ppm 群では、個体値において、コレステロール及びトリグリセリド値が、この背景データ範囲以下である例が少数例に認められ、後述のように副腎皮質空胞化を伴ない、更に腸管の空胞化の頻度、程度が増加していたことから、1750ppm におけるこれらの変動は検体投与による脂質代謝への影響を反映しているものと考えられた。

表 10 血液生化学的検査 (有意差の認められた項目)

性別	雄			雌		
	70	350	1750	70	350	1750
投与量 (ppm)						
ASAT ^W	↓ 61		↓ 63			
ALAT ^W	↓ 67				↑ 125	
Aph ^W			↑ 235	↑ 121		↑ 212
コレステロール ^W		↓ 81	↓ 62			↓ 75
トリグリセリド ^{V+D}	↓ 70	↓ 64	↓ 37			↓ 43
UFA ^{K+U}			↓ 62		↓ 81	↓ 59
クレアチニン ^{V+D}						↑ 109

↑ ↓ : p<0.05, ↓ ↑ : p<0.01 (W;Welsh, K+U;Kruskal-Wallis+U, V+D; Dunnett+variance), 表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

15) 親動物の臓器重量(表 11)

P 世代雄の全投与群(用量依存性を伴わない)及び雌の 1750ppm において肝臓の実重量に有意な減少が認められた。これらはまた体重比重量では用量依存性(雄)あるいは有意性(雌)がなかった。したがって、P 世代でみられた肝臓重量の減少は、投与による影響ではないと考えられた。また F1 世代では、肝臓実重量、対体重比ともに雄の 1750ppm で有意に減少した。この群では形態学的変化は伴っておらず、偶発的な変化と考えられた。

1750ppm 雌雄で両世代ともに副腎の対体重比の増加が認められ、副腎皮質の空胞化と関連しており検体の影響と考えられた。

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

P世代では 1750ppm 群で精巣の対体重比の増加が統計学的に有意に認められたが、F1世代では変動は認められなかった。一方、F1世代 1750ppm では著しい体重減少を示す雄4例の結果として、精巣上体及び前立腺の平均実重量が減少したが、精巣、精のうには統計学的有意差は認められなかった。また対体重比の平均ではこれら4臓器ともに統計学的有意差は認められなかった。

その他一部の平均値に有意差がみられるが、1750ppm まで明らかな用量依存性がないか(下垂体、精巣上体、前立腺及び精のう)、又は対照値との差がきわめて小さく、体重差によるもの(脳、脾臓及び腎臓)であることから、毒性学的関連性はないものと考えられた。

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

表 11 臓器重量 (有意差の認められた項目)

世代		P 世代					
性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		70	350	1750	70	350	1750
体重				↓93			↓90
脳	対体重比	↑106	↑105	↑107			↑111
下垂体	実重量		↓88				
副腎	実重量	↓89	↓89				
	対体重比			↑118			↑119
肝臓	実重量	↓88	↓88	↓85			↓86
	対体重比	↓91	↓92	↓91			
脾臓	実重量			↓90			↓86
腎臓	実重量		↓95	↓92			↓85
	対体重比						↓94
精巣	対体重比			↑112	/	/	/
精巣上体	実重量	↓83	↓85		/	/	/
	対体重比	↓86	↓90		/	/	/
前立腺	実重量	↑127	↑129		/	/	/
	対体重比	↑131	↑136		/	/	/
精のう	実重量	↓86	↓90		/	/	/
	対体重比	↓89			/	/	/
世代		F1 世代					
性別		雄			雌		
体重				↓84			
脳	実重量	↑103		↓97			
	対体重比			↑118			
副腎	実重量						↑119
	対体重比			↑127			↑124
肝臓	実重量			↓74			
	対体重比			↓87			
脾臓	実重量			↓82			
腎臓	実重量			↓85			↓89
	対体重比						↓93
精巣上体	実重量			↓87	/	/	/
前立腺	実重量			↓79	/	/	/

↑ ↓ : p<0.05 , ↑ ↓ : p<0.01 (Dunnett+variance) ,
 表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

16) 親動物の剖検

P親動物では1750ppmまで検体に関連した肉眼的病理所見は認められなかった。また着床後死胚率にも対照群と検体投与の1750ppmの用量群まで差は認められなかった。

一方F1親動物については、雄では350ppmまで、雌では全群で検体に関連した肉眼的病理所見は認められなかった。1750ppm雄群では精のう及び前立腺(何れも2/25例)、並びに精巣上体及び精巣(何れも4/25例)の矮小化が認められた。

17) 病理組織学的検査(表12, 13)

F1世代では、精巣及び精巣上体に中程度から著明なびまん性萎縮が1750ppm4例に認められ、その内2例は”Sertoli-only syndrome”を示し、ライディッヒ細胞の増生を伴った。また他の2例では精細管の萎縮の程度は著しくなく、前立腺と精囊の萎縮を伴っていたが、ライディッヒ細胞に増生は認められなかった(表12)。これらの4例は、最高用量群の中でも高度の低体重を示した例で、精子細胞数及び精子数のカウントが0であった。

このような変化は、同群のその他の動物及びP世代の動物には認められなかった。

本試験においてみられた精巣病変の病理組織像を示した上記4例は、著しい体重増加抑制を伴う発育遅延を伴っていたことから、それらの要因が関与した可能性が考えられるが、一方では本検体の影響によりテストステロンを減少させた結果、精細管の萎縮が誘発された可能性も否定できない。尚、上記4例中2例においてはライディッヒ細胞の増生を伴っていなかったが、これらの例では精細管の萎縮が比較的軽度であったことと関連があると思われる[精巣病変の詳細については、写真と共に別添した。]。

表12. 精子細胞、精子のカウントが0であったF1世代4例(1750ppm)の雄生殖器に対する病理組織学的所見

所見/動物番号	353	366	367	372
母動物番号	178	191	191	197
体重(19週時)(g)#	227	357	354	248
体重増加量(0-17週間)#	150	260	231	165
精巣				
精細管のびまん性萎縮	Grade 3	Grade 4	Grade 4	Grade 3
精細管の小型化, 基底膜の肥厚, ライディッヒ細胞の増生	×	○	○	×
精巣上体				
精子減少症	Grade 4	Grade 5	Grade 4	Grade 5
びまん性萎縮	Grade 4	Grade 4	Grade 4	Grade 3
上皮細胞の空胞化	×	Grade 2	Grade 2	×
前立腺 / 萎縮	Grade 3	×	×	Grade 3
精囊 / 萎縮	Grade 3	×	×	Grade 3
凝固腺 / 萎縮	×	×	×	Grade 2

精巣と精巣上体は、精子検査をしなかった片側を評価、○;所見有り, ×;所見なし
#;対照群:19週時平均体重;470g, 平均体重増加量(0-17週間);362g

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

次に表 13 に示すように、350ppm 及び 70ppm 群の各 1 例において精細管のびまん性萎縮がみられたが、350ppm の 1 例は、停留睾丸を示した右側の精巣及びその右側の精巣上体から得られた病理所見であった。この例の左側の精巣、精巣上体には特に異常は認められず、精巣、精巣上体共に萎縮は見られず、精子細胞及び精子は数的にも十分確保されていた。従って、この例は検体による影響ではないと考えられた。

また最近本試験施設で行われた別の検体による二世世代繁殖性試験において、P 世代で対照群/低/中/高用量群で 1/5/2/1 例 (25 例中) の頻度精細管の萎縮が認められ、程度も Grade 1 から 5 まで様々で、用量に関連性はなかった。またこの試験に加え、最近の数年間に本試験施設で行われた別の検体による二世世代繁殖性試験 5 試験の対照群において、P 世代では 4 試験で計 4 例 (各 1 例)、F1 世代では 2 試験で計 2 例 (各 1 例) に精細管のびまん性萎縮が認められた。これら背景データによれば、70ppm でみられた 1 例は、背景データ範囲内であると考えられた。

表 13. 雄生殖器に対する病理組織学的所見頻度表 (F1 世代)

投与用量	0	70	350	1750
平均体重 (19 週時)	470	471	447	391
平均体重 (19 週時) / 4 例 [#] を除く				410
生殖器に所見を呈した動物数	0	1	1	5 ^{&}
精巣				
精細管のびまん性萎縮 / Grade 3	0	0	0	2
/ Grade 4	0	1	1	2
精細管の小型化, 基底膜の肥厚, ライディッヒ細胞の増生	0	1	0	2
精巣上体				
精子減少症 / Grade 4	0	0	0	2
/ Grade 5	0	1	1	2
びまん性萎縮 / Grade 3	0	0	0	1
/ Grade 4	0	1	1	3
上皮細胞の空胞化	0	1	0	2
前立腺				
萎縮	0	0	0	3 ^{&}
精囊				
萎縮	0	0	0	2
凝固腺				
萎縮	0	0	0	1

Fisher の片側検定; 統計学的に有意差なし,
 精巣と精巣上体は片側について病理組織学的検査を実施
[#]: 精子数, 精子細胞数のカウントが 0 であった 4 例
[&]: 上記 4 例以外の 1 例を含む (前立腺萎縮; Grade 1)

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

副腎ではP、F1世代ともに皮質組織(束状帯)に、通常雄では粗大に、雌では微細にみられる空胞化の程度が対照群に比して雄では1750ppm、雌では350ppm以上でわずかに増加し、検体の影響と考えられた。

この他、小腸では、P世代雄の最高用量群で、空腸絨毛末端部の細胞質に空胞化の発生数が対照群に比してわずかに増加した(対照群/低/中/高用量群で4/0/5/17例)。この所見の程度は軽微から軽度であった。一方、P世代の雌では対照群/低/中/高用量群で6/7/5/10例、F1世代では雄18/15/24/19例、雌10/12/13/17例と、発生数はすべての群で同様であったが、P世代雄の高用量群でみられたこの変化と検体投与との関連性を否定することはできなかった。

これらの所見以外にP、F1世代ともに、少数の非特異的鏡検所見が観察されたが、これらの発症数と程度において、対照群と投与群との差は明らかではなく、検体の影響とは考えられなかった。

以上の結果より、2世代にわたって検体を飼料中に混入して投与した場合、繁殖への影響として、F1世代の1750ppm雄では、体重増加抑制に伴い性成熟の指標として包皮分離のわずかな遅延が認められた。また、著しい体重増加抑制を示し、精子検査で精子数および精子細胞数が0であった4例のため平均精子細胞数、精子数の減少がみられ、さらに精巣上体、前立腺の平均実重量の減少、病理組織学的検査では精巣、精巣上体のびまん性萎縮が認められた。

一般毒性として、1750ppmで、親動物の摂餌量の増加（F1世代、雌雄）、体重増加の抑制（P世代雌雄、F1世代雌雄）がみられた。また同群ではアルカリホスファターゼ活性の増加、コレステロール、トリグリセリド、非エステル結合型脂肪酸の減少がみられ、両世代雌雄で副腎対体重比の増加がみられた（F1）。病理組織学的検査では、1750ppmにおいて、副腎皮質の空胞化（P世代雌雄、F1世代雌雄）、小腸の空胞化（P世代雄）がみられた。

350ppmでは体重増加抑制（P世代雄）、副腎皮質の空胞化（P世代雌、F1世代雌）がみられた。

また新生児の体重においては、350ppm以上の群で（雌雄）で軽度な減少が観察された。

70ppmでは、検体の影響は認められなかった。

従って、無毒性量は、親動物、児動物ともに70ppm（雄；5.2mg/kg/日、雌；5.5mg/kg/日）と判断した。また繁殖性に対する無毒性量は、350ppm（雄；26.2mg/kg/日、雌；27.6mg/kg/日）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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

表 5-1 総括表(親動物)

	世代		親 : P				親 : F ₁			
	投与用量(ppm)		0	70	350	1750	0	70	350	1750
検体採取量 [∞]	♂			5.2	26.2	134.8		6.4	30.2	177.6
	♀			5.5	27.6	139.2		7.0	34.4	192.7
動物数	♂		25	25	25	25	25	25	25	25
	♀		25	25	25	25	25	25	25	25
死亡/屠殺動物							♀1			
一般観察										
親	体重				♂↓	♂↓♀↓				♂↓♀↓
	摂餌量									♂↑♀↑
動物	発情周期(日)		4.07	4.24	4.05	4.24	4.22	4.12	4.09	4.20
	交尾率(%) [§]		100	100	100	100	100	96	96	92*
	受胎率(%) [§]		96.0	96.0	96.0	92.0	96.0	91.7	91.7	91.3
	出産率(%) [§]		95.8	100	100	100	95.8	100	100	95.7
	妊娠期間(日) [§]		21.9	22.1	22.0	21.6	22.3	22.1	22.5	22.1
	精子細胞数/精巣 1mg		48760	—	—	46217	47971	—	47606	37087
	精子数/精巣上体 1mg		780617	—	—	755865	889967	—	982994	733837
	精子の運動性(%) 1分後 / 5分後		86 / 76	—	—	88 / 83	89 / 81	—	—	92 / 87
	精子の異常(%)		0.88	—	—	0.48	0.96	—	—	0.52
剖検										前立腺, 精囊, 精巣, 精巣上体の矮小化
臓器重量 / 体重										↓♂
脳	♂			R↑	R↑	R↑		A↑		A↓, R↑
	♀					R↑				
下垂体	♂				A↓					
	♀									
副腎	♂			A↓	A↓	R↑				
	♀					R↑				
肝臓	♂			A↓R↓	A↓R↓	A↓R↓				A↓R↓
	♀					A↓				
脾臓	♂					A↓				A↓
	♀					A↓				
腎臓	♂				A↓	A↓				A↓
	♀					A↓R↓				A↓R↓
精巣	♂					R↑				
精巣上体	♂			A↓R↓	A↓R↓					A↓
前立腺	♂			A↑R↑	A↑R↑					A↓
精のう	♂			A↓R↓	A↓					
病理組織所見/数										
副腎皮質空胞化	♂/♀		24/22	24/24	23/24	25/25	22/22	25/20	25/22	24/24
程度	♂/♀		2.0/1.2	1.9/1.2	1.8/1.6	2.7/2.1	1.9/1.2	2.0/1.2	2.1/1.5	2.8/2.1
小腸の空胞化	♂/♀		4/6	0/7	5/5	17/10	18/10	15/12	24/13	19/17
精巣/びまん性萎縮			0	0	0	0	0	1	1	4
精巣上体/びまん性萎縮			0	0	0	0	0	1	1	4

§:再交配を含まない, &:再交配を含む, #:臍垢が認められたが、精子が認められなかった2例を含む, ∞:交配前期間の平均摂取量, A:臓器実重量, R:対体重比, *:P<0.05, **:P<0.01(U-test), ↑↓;P<0.05, ↑↓;P<0.01(Dunnett+variance 検定)

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

表 5-2 総括表 (児動物)

	世代	児 : F ₁				児 : F ₂			
	投与用量(ppm)	0	70	350	1750	0	70	350	1750
児 動 物	新生児数(出生時)	263	265	284	254	230	222	214	205
	死亡児数(出生時)	1	0	0	1	1	2	1	4
	出生時同腹児数	11.39	11.04	11.83	11	9.96	10	9.68	10.05
	出生時生存率(%)	99.6	100	100	97.2	99.6	99.1	99.5	98.0
	4日生存率(%)	98.1	97.7	99.3	96.8	98.3	98.2	99.1	97.5
	哺育率(%)	94.5	86.4 [#]	87.5 [#]	98.3	97.8	98.8	95.0	99.3
	性比(%) 雄	50.2	52.1	48.2	53.5	48.7	47.3	50.0	51.7
	哺育児体重0日♂	5.73	6.08**	5.66	5.62	6.39	6.44	6.10*	5.99**
	♀	5.59	5.66	5.41**	5.30**	6.17	6.06	5.72**	5.37**
	4日(選抜後)♂	9.61	10.00	9.01**	8.73**	10.68	10.48	10.11	9.90**
	♀	9.40	9.41	8.55**	8.40**	10.44	10.03	9.87	8.97**
	7日 ♂	14.52	14.71	13.88*	12.80**	15.27	16.23*	15.59	14.75
	♀	14.32	14.05	13.17**	12.42**	15.39	16.06	15.34	13.52**
	14日 ♂	28.77	30.40**	28.12**	23.64**	30.09	30.14	29.50	25.73**
	♀	28.51	29.49*	27.00**	23.19**	30.03	29.19	29.31	24.22**
	21日 ♂	44.98	46.94*	43.28**	35.32**	46.00	45.70	45.58	38.31**
	♀	44.26	45.25	41.89**	34.85**	45.51	44.44	44.74	35.92**
	28日 ♂	75.34	77.45	71.27**	58.20**	74.17	72.50	72.19	62.28**
	♀	71.09	71.40	67.13**	56.66**	70.31	68.72	69.07	57.57**
包皮分離(日齢)	35.4	35.0	35.4	37.4	—	—	—	—	
陰開口(日齢)	37.0	37.4	37.0	37.6	—	—	—	—	
剖検									
臓器重量 / 体重			↓ ♀	↓ ♂ ♀				↓ ♂	
脳 ♂				A ↓ R ↑					
♀			R ↑	R ↑					
脾臓 ♂				A ↓			R ↓		
♀				A ↓					
胸腺 ♂				A ↓					
♀				A ↓					

A:臓器実重量, R:対体重比,

#;P<0.05(Fisher test), *;P<0.05, **;P<0.01(U-test), ↑ ↓ ;P<0.05, ↑ ↓ ; P<0.01(ANOVA+Dunnett 検定)

スピロジクロフェンのラットを用いた催奇形性試験

(毒性資料 No. 原体-18)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：2000年3月29日

検体の純度：
試験動物：ウイスター系ラット 1群交尾雌 28匹
(妊娠0日雌体重；185～241g)
試験期間：1998年1月～1998年11月
投与期間；14日間(妊娠6～19日)

【試験方法】：

検体を、0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁し、動物に10 mL/kgの容量で0(対照群)、100、300、1000mg/kgの投与量を、妊娠6日目から19日目までの14日間毎日1回経口投与した。

無処理の雌雄各1匹のラットを一晚同居させ交配させた。交尾の確認は、交配の翌朝に採取した膣スメアの精子検査により行った。交尾が観察された雌を、無作為に対照群と投与群に配分した。精子が確認された日を妊娠0日とし、妊娠20日目に動物を屠殺し検査した。

投与用量設定の理由：

試験項目：

妊娠動物について、一般症状は交配後から屠殺までの間毎日観察した。体重は妊娠0日及び6日から20日まで毎日測定し、妊娠0～6, 6～9, 9～12, 12～15, 15～18及び18～20日の摂餌量を測定した。飲水量は残存量を算出し、評価した。

屠殺時（帝王切開時）には、肉眼的病理検査、黄体数、着床数、子宮重量、胎盤の外観と重量、生存児動物数、吸収胚数、死亡児動物数について検査した。

生存児動物については性別、外表奇形を観察し、体重を測定した。約半数の児動物を内臓検査用、残りの半数の児動物を骨・軟骨の二重染色による骨格検査用とした。内臓観察についてはウィルソン法の変法により、骨格検査はアルシャンブルーGXでの軟骨染色とアリザリンレッドSでの骨格染色後に行った。

【試験結果】

1. 母動物に対する所見

全用量群の動物の臨床所見に検体の影響は認められなかった。また摂餌量、飲水量及び排泄物に検体の影響はみられなかった。

投与期間中における体重増加に検体による影響はみられなかった。

剖検時に子宮異常（一側性の子宮角形成不全）を示した動物1例（1000mg/kg群）が認められたが、先天的な異常と考えられ、検体に関連する所見とは認められなかった。したがって、この動物及びその児動物は以降の評価系から除外した。1000mg/kgまでの用量群での他の所見に、投与に関連する変化は認められなかった。

2. 子宮内発育に対する所見

黄体数、着床前死胚数、着床数に対照群と全投与用量群の間で有意な差は認められなかった。対照群で1例の総吸収胚がみられたが、これは本系統のラットでも通常みられるものと考えられる。

妊娠率、着床後死胚数、生存児動物数、児動物の性比に、対照群と各投与用量群の間で有意な差はみられなかった。児動物体重に変動は認められなかった。また胎盤の重量及び外観に検体に起因する明らかな影響はみられなかった。

外表検査では、いくつかの奇形が全ての群で散発的にみられたが検体投与に起因する異常は認められなかった。

内臓検査では、腎盂の軽度拡張及び精巣の軽度未下垂が対照群を含む全群に見

られたが、統計学的有意差あるいは用量関連性は認められなかったことから、この変動は検体投与との関連はないものと考えられた。

骨化遅延あるいは変異に関する検査では、波状肋骨の減少（100及び1000mg/kg：児動物1.9%及び0.6%、母動物12%及び3.8%）、胸椎体の扁平化の減少（1000mg/kg：児動物15.4%、母動物50.0%）や非対称胸骨の増加（1000mg/kg：児動物10.3%、母動物46.2%）等が観察された。しかしこれらは対照群にも認められ、またその頻度は背景値（

）と同程度あるいは低く、毒性学的関連はないものと考えられた。

以上の結果より、本検体を妊娠ラットに1000mg/kgまでの用量で投与したとき、母動物の一般観察項目あるいは子宮内発育の検査項目に何ら投与に関連する影響は認められなかった。また児動物の骨化段階への影響はなく、さらに外表、内臓及び骨格の検査所見に検体投与に起因する変化は認められず、催奇形性も認められなかった。

したがって、母動物及び児動物における無毒性量は1000mg/kg/日であった。また、1000mg/kg/日までの用量に催奇形性は認められなかった。

投与用量 (mg/kg/day)		0	100	300	1000			
交配動物数		28	28	28	28			
受胎動物数(a)		25	25	25	26			
妊娠維持動物数(b)		24	25	25	26			
母動物	一般症状	--	--	--	--			
	流産	--	--	--	--			
	全吸収胚雌数	1	--	--	--			
	体重	d	--	--	--			
	摂餌量	d	--	--	--			
	飲水量	d	--	--	--			
	剖検所見	--	--	--	--			
	着床所見	黄体数★ (b)	d	13.7	14.6	14.0	14.5	
		着床数★ (b)	d	12.0	12.5	11.5	12.2	
		着床前死胚★ (b)	k	1.8	2.1	2.5	2.3	
		着床後死胚★ (b)	k	0.9	0.9	0.6	0.7	
		生存児動物数★ (b)	d	11.5	11.6	10.9	11.5	
		雄の割合(%)	f	50.0	49.9	48.7	50.2	
生存児動物体重(g)雄		d	3.69	3.88	3.82	3.85		
雌	d	3.52	3.65	3.62	3.64			
胎盤重量(g)	雄	d	0.60	0.63	0.60	0.61		
	雌	d	0.57	0.57	0.59	0.59		
児動物	外表検査	検査動物数		277(24)	291(25)	272(25)	300(26)	
		奇形	巨舌症	χ^2	0	1	0	0
	内臓検査	検査動物数		133(24)	137(25)	129(25)	144(26)	
		奇形	内脳水腫	χ^2	1	0	0	0
			小眼球症	χ^2	0	0	0	1
		異常	腎盂拡張(軽度)	χ^2	8(4)	5(4)	4(2)	14(8)
	未下垂(軽度)/精巣		χ^2	7(5)	2(2)	5(5)	2(2)	
	骨格検査	検査動物数		144(24)	154(25)	143(25)	156(26)	
		奇形	肋骨と脊椎骨の結合	f	1	0	0	0
			四肢骨の異形成	f	2(2)	0	1	0
			過剰腰椎	f	0	1	0	0
		変異	胸椎体の扁平化	f	42(20)	40(22)	35(17)	24*(13)
			波状肋骨(全体)	f	12(7)	3*(3)	5(2)	1**(1)
第4胸骨の非対称			f	3(3)	10(10)	12(10)	16*(12*)	
第7頸椎椎弓の変形	f		0	0	0	1		

f : Fisher 検定(*:p<0.05, **:p<0.01) χ^2 : χ^2 検定(*:p<0.05) d : Dunnett 検定

k : Kruskal-Wallis 検定。児動物所見の統計は腹毎でも実施した。胎盤重量の統計は申請者が実施した。

★ : 1匹の妊娠動物あたり - : 異常なし ()内の数字 : 母動物数

(a):全吸収胚を含まない (b):全吸収胚を含む

児動物の所見は奇形と異常に分類し、骨格の異常(deviations)は変異(variations)と骨化遅延(retardations)からなる。

スピロジクロフェンのウサギを用いた催奇形性試験

(毒性資料 No. 原体-19)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日： 1998年7月7日

検体の純度：
試験動物： ヒマラヤン系ウサギ 1群交尾雌 16匹
(妊娠0日雌体重；1873～3163g)
試験期間： 1997年9月～1998年3月
投与期間；23日間(妊娠6～28日)

【試験方法】

0.5%カルボキシメチルセルロース脱イオン水懸濁液を用いて検体投与液を調製した。動物に5ml/kgの容量で0(対照群)、100、300、1000mg/kgの投与量を、妊娠6日目から28日目までの23日間毎日1回経口投与した。

なお無処理の雌雄各1匹のウサギを同居させ交配し、肉眼的に交尾を確認した。交尾が観察された雌を、無作為に対照群と投与群に配分した。交尾が確認された日を妊娠0日とし、妊娠29日目に動物を屠殺し検査した。

投与用量設定の理由：

【試験項目】

妊娠動物について、交配後から屠殺までの間、一般症状を毎日観察した。体重を交配0日及び交配6日から29日まで測定し、摂餌量を妊娠0～6、6～9、9～12、12～15、15～18、18～21、21～24、24～27及び27～29日に給餌量と残餌量との重量さにより測定した。

屠殺時には、内臓の肉眼的検査、黄体数、着床数、子宮重量、胎盤の外観と重量、早期及び後期吸収胚数、死亡児動物数、生存児動物数及び胎盤の外観と重量について検査した。

生存児動物については性別、体重、外表、腹腔、胸腔並びに脳を観察した。約50%の児動物については脳の横断切片を作製した。内臓観察と脳に対する薄切の検査後に

アルシアンブルーを用いて軟骨染色を行った。その後アリザリンレッドSで染色後骨格検査に供した(頭蓋については脳の横断切片を作製した動物については検査せず)。

【試験結果】

母動物に対する毒性

本試験において死亡例は認められなかった。

1000mg/kg 群の雌 1 例が交配後 20 日で流産した。この 1 例は明らかな全身作用(投与開始後の耳介の冷感、摂食不全及び体重減少並びに剖検時に肝小葉構造の明瞭化を示していた。使用したウサギの系統では単発的な自然流産が起こることもあるが、投与開始直後から摂餌量や体重に影響が認められているので、この用量の 1 例の流産については投与に関連した影響であることも否定できない。更に、脱毛の発生頻度増加が 1000mg/kg 群で認められた。脱毛は妊娠ウサギの一般的な所見であり、1000mg/kg で影響を受けた雌の発生頻度は背景データ範囲内()であった。従って、投与による影響かどうかは明らかではない。しかし、同用量で摂餌量の低下や体重増加抑制が投与後から認められているので、投与との関連性を完全には否定できなかった。

雌の摂餌量が 300mg/kg 群(交尾後 6~9 日)及び 1000mg/kg 群(交尾後 6~15 日)で一過性に減少した。これに伴って糞の排泄量が 300 及び 1000mg/kg 群で減少した。

1000mg/kg 群で認められた便の淡色化の発生頻度増加は、便の硬さに影響が認められなかったことから、白色ないし微黄色を示す検体の排泄によるものと考えられた。

飲水量の減少と尿量の減少及びこれに伴う尿の濃縮と色調変化が 1000mg/kg 群で認められた。

雌の体重増加量は 300 及び 1000mg/kg 群で投与開始後(交尾後 6~9 日)に一過性に減少した。1000mg/kg 群では投与及び妊娠期間を通じての体重増加量並びに補正した体重増加量が軽度に減少した。

交配後 29 日の雌の剖検では 1000mg/kg までの用量において投与に関連した所見は認められなかった。

子宮内発育に対する毒性

1000mg/kg 群では 1 例の流産によって妊娠率がわずかに低下し、投与に関連した影響であることも否定できない。投与に関連した影響とした場合、この流産は生殖に及ぼす特異的な影響というよりも、むしろ全身性の母動物毒性によるものと考えられた。

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

胎盤の外観及び重量では 1000mg/kg 用量まで投与に関連した影響は認められなかった。
交配後 29 日に生存児動物が認められた雌における着床後死胚数及びこれに対応する児動物数にも、1000mg/kg まで投与に関連した影響は認められなかった。

児動物の性比及び児動物体重は 1000mg/kg まで投与による影響を受けなかった。

検体 1000mg/kg までの投与では、奇形の発生率又は種類に影響を及ぼしたと思われる所見は認められなかった。

1000mg/kg 群の児動物の肝臓に明瞭な小葉構造が認められた。この変化は児動物にしばしば観察され、児動物あたり 0~7%、母動物あたり 0~33%の背景データがあることから投与との関連はないものと考えられた。

骨格検査では、児動物単位の統計で骨化遅延あるいは促進に統計学的な有意差が認められたが、親動物単位では有意差は認められず、また発生率は背景値の範囲内にあったので、投与に起因した影響とは考えられなかった。

第 5 指中節骨不完全骨化 100mg/kg 群 : 10.7% 背景値 :

第 5 指(趾)中節骨不完全骨化 100mg/kg 群 : 5.1% 背景値 :

第 8 尾椎弓の存在 100mg/kg 群 : 28.4% 1000mg/kg 群 : 30% 背景値 :

舌骨不完全骨化 1000mg/kg 群 : 47.5% 背景値 :

1000mg/kg 群まで児動物の外表面、内臓又は骨格検査において、投与に関連すると考えられる所見も認められなかった。

以上の本試験の結果より、本検体を妊娠ウサギに投与したとき、全身性の母動物毒性が 300mg/kg 以上の用量で認められた(摂餌量又は飲水量の減少、体重増加量の抑制、おそらく脱毛も含まれる)。

また、1000mg/kg 群で認められた 1 例の流産については投与に関連した母動物に対する毒性の影響であることも否定できないが、これを除けば、1000mg/kg までの用量において子宮内発育に及ぼす影響は認められなかった。

児動物については、1000mg/kg まで何ら影響は認められず、催奇形性は認められなかった。

従って母動物に対する NOAEL は 100mg/kg/日、児動物に対する NOAEL は 1000mg/kg/日であった。

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

投与量 mg/kg		0	100	300	1000		
交配動物数		22	22	23	22		
着床動物数		21&	22	20#	21+		
生存児動物を有する動物数		21	22	20	20		
母動物	総吸収胚数		0	0	0	0	
	流産		0	0	0	1	
	一般症状					脱毛(頻度の増加)	
	体重 d						
	摂餌量 d				↓(6-9日)	♁(6-9, 12-5日) ↓(9-12日)	
	剖検所見						
	着床所見	黄体数 ★	d	7.4	7.1	7.6	7.8
		着床数 ★	d	7.1	6.8	7.2	7.3
		着床前死胚数 ★	k	0.3	0.4	0.4	0.5
		着床後死胚数 ★	k	0.6	0.5	0.3	0.3
生存児動物数 ★		d	6.6	6.2	6.8	6.9	
雄の割合		k	45.1	59.7	55.8	48.6	
生存児動物体重(g)		d	37.36	38.82	37.13	37.83	
胎盤重量 d		4.40	4.83	4.32	4.41		
検査動物数		138(21)	137(22)	136(20)	139(20)		
児動物	外表検査	奇形	前肢の位置異常(手首の関節部分における腹側への屈曲) χ^2	5(3)	3(3)	1	0
		奇形	外水頭症 χ^2	1	0	0	0
	内蔵検査	奇形	心中隔欠損 χ^2	1	0	2(2)	0
			腹腔内赤色腹水貯留 χ^2	2(2)	0	0	2(2)
		異常	肝小葉構造の明瞭化 χ^2	3(2)	0	1	14*(3)
			小さい肝副葉 χ^2	1	0	0	0
			胃/腸内容物の黄色化及び/あるいは皮膚、全臓器の退色化 χ^2	0	0	3(1)	0
			胃/小腸の暗褐色化 χ^2	0	0	0	5(1)
			腎盂の軽度の拡張 χ^2	1	0	0	0
	脳室の軽度の拡張 χ^2	0	0	0	1		
	骨格検査	奇形	軟骨癒合を伴う/伴わない肋骨の肥厚 f	0	1	1	0
			肋骨軟骨部の二分/癒合 f	0	3(3)	1	3(3)
			胸椎及び肋骨の複合奇形 f	0	1	0	0
			13番目の肋骨対を伴う過剰腰椎 f	0	1	0	
胸/腰椎欠損: 肋骨一对欠損を伴う/伴わない f			1	2(2)	2(2)	0	
尾椎の癒合 f			0	1	0	0	
骨化遅延		第5指中節骨不完全骨化 f	43(12)	14**(7)	38(13)	41(12)	
		第5指(趾)中節骨不完全骨化 f	25(10)	7**(4)	19(10)	35(9)	
	第8尾椎弓の存在 f	67(18)	39**(17)	47(15)	42**(16)		
	舌骨不完全骨化 f	95(21)	91(21)	83(20)	66**(16)		

★: 1匹の母動物あたり, 空欄: 異常なし, (): 母動物数

d: Dunnett (↓: P<0.05 ↑: P<0.01), k: Kruskal-Wallis, f: Fisher (*: P<0.05 **: P<0.01) 検定, χ^2 : χ^2 (*: P<0.05) 検定。児動物所見の統計は腹毎でも実施した。

[&; 1例の子宮異常, #; 1例の死亡及び2例の子宮異常: 評価の対象からはずした。] +; 流産1例を含む児動物の所見は奇形と異常に分類し、骨格の異常(deviations)は変異(variations)と骨化遅延(retardations)からなる。

(11)変異原性

スピロジクロフェンの細菌を用いた復帰突然変異性試験

(毒性資料 No. 原体-20)

試験機関： 日本バイエルアグロケム株式会社
環境安全研究部

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 2000年 8月 2日

検体の純度：

試験系： 細菌（サルモネラ菌〈TA98、TA100、TA1535、TA1537〉、
大腸菌〈WP2uvrA/pKM101〉）

【試験方法】

試験用量設定の理由及び試験液の調製方法

Ames 試験（プレインキュベーション法）

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) の 4 株およびトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli*) の 1 株を用いた。フェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンで薬物代謝系を誘導したラット肝臓から調製した S9 の非存在及び存在の条件下で、Ames らの方法により変異原性を検定した。

S9-Mix 又は緩衝液 0.5mL と菌懸濁液 0.1mL、さらに検体溶液 0.1mL を試験管に加え、37°C で 20 分間プレインキュベーション後、トップアガー 2mL を試験管に加えて混合し、最少グルコース寒天平板培地に広げた。この培地を 37°C で 48 時間培養後、生育阻害の有無を調べた後、復帰変異コロニー数を計測した。各濃度とも 3 プレートを用い、試験は再現性を確認するために 2 回行った。

各菌株について各濃度ごとの復帰変異コロニー数の平均値を算出し、溶媒対照の値と比較した。各菌株共に各濃度ごとの平均復帰変異コロニー数が、溶媒対照の数の 2 倍以上で用量相関性のある増加を示した場合を、変異原性陽性と判定した。

【結果及び考察】

表 1、2 に示したように、2 回の試験共に検体を用いた全用量において代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数に溶媒対照の 2 倍以上で、かつ用量相関性を伴った増加は認められなかった。また、すべての菌株でいずれの濃度においても、生育阻害は認められなかった。

一方、陽性対照として用いた非代謝活性化条件下での AF-2¹⁾、NaN₃²⁾、9-AA³⁾では、溶媒対照と比較して明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、代謝活性化条件下での 2-AA⁴⁾は、試験に用いたすべての菌株に明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、検体は本試験条件下において、復帰変異誘発作用は有さないものと判断された。

- 1) : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide
- 2) : Sodium azide
- 3) : 9-aminoacridine
- 4) : 2-aminoanthracene

[表 1]

復帰変異試験成績 (1回目)

検体：スピロジクロフェン

代謝活性化系の有無	検体濃度 (µg/プレート)	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			
		TA 100		TA 1535		WP2uvrA/pKM101		TA 98		TA 1537	
S9 Mix (-)	DMSO (溶媒対照)	164	184	18	21	66	78	16	21	8	9
		189	(179)	23	(21)	84	(76)	21	(19)	13	(10)
	313	169	175	12	13	58	74	17	22	3	6
		176	(173)	13	(13)	76	(69)	24	(21)	8	(6)
	625	180	184	9	11	60	67	11	12	4	7
		188	(184)	17	(12)	76	(68)	18	(14)	7	(6)
1250	167	182	10	13	72	75	13	13	6	6	
	195	(181)	15	(13)	78	(75)	15	(14)	8	(7)	
2500†	164	171	9	10	65	66	12	14	5	7	
	174	(170)	12	(10)	77	(69)	16	(14)	10	(7)	
5000†	166	182	7	11	78	79	7	12	4	7	
	188	(179)	11	(10)	88	(82)	16	(12)	7	(6)	
S9 Mix (+)	DMSO (溶媒対照)	144	144	17	19	107	116	29	32	8	13
		186	(158)	22	(19)	118	(114)	38	(33)	14	(12)
	313	163	163	15	17	104	104	25	35	9	10
		186	(171)	24	(19)	109	(106)	37	(32)	11	(10)
	625	139	156	12	15	91	95	23	24	6	11
		163	(153)	17	(15)	100	(95)	26	(24)	13	(10)
1250	152	164	12	14	98	105	19	20	10	10	
	181	(166)	19	(15)	113	(105)	29	(23)	13	(11)	
2500†	122	145	14	15	101	103	18	21	7	7	
	154	(140)	15	(15)	113	(106)	23	(21)	11	(8)	
5000†	114	135	8	12	95	98	15	17	4	5	
	173	(141)	12	(11)	101	(98)	19	(17)	7	(5)	
陽性対照	S-9 Mix を必要とするもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA				
		(µg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	80				
	S-9 Mix を必要とするもの	コロニー数/プレート	555 589	208 286	1378 1456	180 191	148 221				
			638 (594)	290 (261)	1604 (1479)	216 (196)	235 (201)				
	S-9 Mix を必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA				
		(µg/プレート)	1	2	2	0.5	2				
S-9 Mix を必要とするもの	コロニー数/プレート	843 906	156 157	551 604	208 224	43 86					
		936 (895)	219 (177)	617 (591)	241 (224)	86 (72)					

†: 結晶析出 (広範囲に細かい針状結晶)
(数値) : 平均値

[表 2]

復帰変異試験成績 (2回目)

検体：スピロジクロフェン

代謝活性化系の有無	検体濃度 (µg/プレート)	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			
		TA 100		TA 1535		WP2uvrA/pKM101		TA 98		TA 1537	
S9 Mix (-)	DMSO (溶媒対照)	142	157	12	14	64	73	19	21	5	6
		161	(153)	16	(14)	78	(72)	32	(24)	11	(7)
	313	141	150	5	10	68	70	19	22	5	8
		156	(149)	15	(10)	79	(72)	31	(24)	9	(7)
	625	142	144	8	9	64	73	21	22	8	9
		152	(146)	11	(9)	79	(72)	28	(24)	10	(9)
	1250	170	177	8	14	69	70	27	30	5	10
		186	(178)	18	(13)	72	(70)	37	(31)	11	(9)
	2500†	140	148	9	9	65	69	28	31	6	7
		184	(157)	10	(9)	75	(70)	35	(31)	7	(7)
	5000†	125	144	9	11	70	75	17	26	3	6
		152	(140)	12	(11)	76	(74)	26	(23)	7	(5)
S9 Mix (+)	DMSO (溶媒対照)	136	153	7	8	99	104	38	42	5	9
		163	(151)	9	(8)	111	(105)	43	(41)	13	(9)
	313	135	157	6	7	84	92	38	45	10	11
		161	(151)	7	(7)	99	(92)	51	(45)	13	(11)
	625	140	145	8	9	90	106	36	40	7	7
		159	(148)	10	(9)	112	(103)	53	(43)	12	(9)
	1250	147	160	8	11	95	109	35	38	10	11
		160	(156)	11	(10)	114	(106)	43	(39)	12	(11)
	2500†	135	144	12	12	74	90	34	38	4	12
		151	(143)	14	(13)	96	(87)	41	(38)	13	(10)
	5000†	114	137	6	10	80	87	28	34	5	10
		145	(132)	14	(10)	100	(89)	40	(34)	10	(8)
陽性対照	S-9 Mix を必要とするもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA				
		(µg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	80				
	コロニー数/プレート	798	847	341	354	1520	1765	370	404	1050	1071
		906	(850)	359	(351)	1829	(1705)	415	(396)	1173	(1098)
	S-9 Mix を必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA				
		(µg/プレート)	1	2	2	0.5	2				
コロニー数/プレート	815	988	172	184	701	737	174	187	86	101	
	996	(933)	196	(184)	794	(744)	199	(187)	125	(104)	

†: 結晶析出 (広範囲に細かい針状結晶)
(数値) : 平均値

スピロジクロフェンの V79-HPRT (前進突然変異) 法による
in vitro 変異原性誘発試験

(毒性資料 No. 原体-21)

試験機関： バイエル社毒性研究所 (ドイツ)

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 1997 年 2 月 11 日

検体の純度 :

試験系 : チャイニーズハムスター由来 V79 培養細胞

【試験方法】

試験用量設定の理由

コロニー形成率と突然変異試験

フラスコあたり 4×10^6 細胞の V79 由来細胞を、各処理濃度あたり 2 個の 250mL のフラスコの培養用培地に入れた。接着後 (16~24 時間後) に、細胞を低血清量 (2%) の培地を用い、非代謝活性下及び代謝活性下条件で 5 時間各濃度の検体に暴露させた。各対照群は同じ条件下で培養した。その後、単層細胞を PBS で洗浄してトリプシン処理した。これをフラスコ中の培地に約 1.5×10^6 細胞の密度で、また 3 枚のペトリ皿それぞれに 200 個の細胞を、再播種した。ペトリ皿を 7 日間培養し、コロニー数を算定

することにより細胞毒性を判定した。

一方、フラスコに再播種した細胞は、細胞増殖と誘発変異株の発現のために培養し、4日と7日に継代した。最初の継代では、各処理群および対照群の2個の培養を各々2個の250mLのフラスコに、約 1.5×10^6 個の細胞を再播種し、約7日間培養した。突然変異株細胞分離のために、 $10 \mu\text{g/mL}$ の6-チオグアニン(6-TG)を添加したヒポキサンチン無含有培養液のペトリ皿(合計8皿)に 3×10^5 個の細胞を播種した。さらに、3枚のペトリ皿には各用量群のコロニー形成率を求めるために、ペトリ皿あたり200個の細胞を播種した。約5%炭酸ガスを含んだ加湿された空気中で、 37°C で6~7日間の培養後、コロニーを固定してギムザ液で染色した。突然変異株分離用のペトリ皿では6-TG抵抗性コロニー数を、コロニー形成率測定用ペトリ皿ではコロニー数を測定した。ただし、50個以下の細胞から形成されるのコロニーは除外した。

【結果及び考察】

1. コロニー形成率

変異原性試験における溶媒対照群のコロニー形成率は、非活性化の条件下で71.5%から86.0%まで、活性化の条件下で77.2%から98.2%の範囲であった。試験におけるコロニー形成率は良好であった。

2. 非代謝活性化条件における突然変異原性試験

非活性化条件下で2試験を実施した。相対生存率および相対増殖とも、用量相関的な細胞毒性が観察された。処理直後に両試験の $20 \mu\text{g/mL}$ の検体濃度で全細胞が死滅し、1試験の $15 \mu\text{g/mL}$ の濃度では検体の細胞毒性のために全細胞が死滅した。1培養での $6 \mu\text{g/mL}$ 、 $8 \mu\text{g/mL}$ および $10 \mu\text{g/mL}$ の濃度で、突然変異の頻度にわずかな増加がみられた(統計学的有意差なし)。しかし、併行した培養および2回目の試験で再現性がなかったことから、これらの増加は検体投与に起因したものとは考えられなかった。また、2回の試験の総合的な統計学的解析において、処理した濃度のいずれにも突然変異の頻度に有意な増加は認められなかった。

陽性対照群のEMSは、すべての試験で明らかに変異原性を誘発した。従って、検体は本非活性化試験において非変異原性物質と判断された。

3. 代謝活性化条件における突然変異原性試験

活性化条件下で2試験が実施された。両試験で、相対生存率および相対増殖ともに用量相関的な細胞毒性が観察された。1培養における $10 \mu\text{g/mL}$ および $20 \mu\text{g/mL}$ の濃度

で、突然変異の頻度にわずかな増加がみられた（統計学的有意差なし）。しかし、併行した培養および2回目の試験で再現性がなかったことから、これらの増加は検体投与に起因したものとは考えられなかった。

陽性対照物質のDMBAは、すべての試験で明らかに変異原性を誘発した。

従って、検体は本代謝活性化試験において非変異原性物質と判断された。

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、V79-HPRT 前進突然変異原性試験において非変異原性物質であると判断された。

非代謝活性化

群	濃度 μg/mL	1回目試験					2回目試験				
		生存 細胞数	相対 増殖 ^A	総変異 株数 ^B	コロニー 形成率 ^C	変異率 ×10 ⁻⁶	生存 細胞数	相対 増殖 ^A	総変異 株数 ^B	コロニー 形成率 ^C	変異率 ×10 ⁻⁶
陰性対照		144.3	62.9	1	76.5	0.5	187.7	81.1	6	94.2	2.7
		177.7	70.4	1	76.3	0.6	191.3	66.6	3	82.0	1.5
溶媒対照 (DMSO)		151.0	100.0	2	86.0	1.0	185.3	100.0	7	83.5	3.5
		180.7	100.0	4	71.5	2.3	189.0	100.0	4	77.8	2.1
陽性対照 EMS	900	134.0	24.9	812	77.7	435.6	71.3	25.8	1075	77.8	575.5
		166.3	47.1	776	54.3	595.1	109.0	23.9	1033	64.7	665.6
検体	4	165.3	71.2	2	83.8	1.0	160.3	71.8	7	78.3	3.7
		167.7	95.8	2	71.0	1.2	172.7	101.1	5	68.2	3.1
	6	186.3	81.9	10	76.3	5.5	163.3	69.6	6	72.3	3.5
		168.0	107.4	3	84.7	1.5	163.0	95.8	1	72.3	0.6
	8	141.0	48.5	10	72.0	5.8	220.7	73.2	3	79.0	1.6
		182.0	104.3	4	81.5	2.0	144.3	124.6	4	65.3	2.6
	10	74.7	16.6	17	73.2	9.7	167.3	69.3	6	80.2	3.1
		133.3	32.9	3	73.8	1.7	147.3	83.7	1	71.8	0.6
	15	1.0	-	-	-	-	10.0	8.1	1	69.3	0.6
		15.0	-	-	-	-	4.3	5.9	1	72.3	0.6
	20	0.0	-	-	-	-	2.0	-	-	-	-
		2.7	-	-	-	-	2.3	-	-	-	-

A: 溶媒対照に対する百分率 B: 8ペトリ皿のコロニーの合計 C: 細胞 200 個あたりのコロニー形成率
-: 全細胞の消滅

EMS : エチルメタンサルホネート

統計学的処理 : DUNNETT 検定

代謝活性化

群	濃度 μg/mL	1回目試験					2回目試験				
		生存 細胞数	相対 増殖 ^A	総変異 株数 ^B	コロニー 形成率 ^C	変異率 ×10 ⁻⁶	生存 細胞数	相対 増殖 ^A	総変異 株数 ^B	コロニー 形成率 ^C	変異率 ×10 ⁻⁶
陰性対照		221.0	107.6	6	79.2	3.2	223.0	112.9	13	89.3	6.1
		228.3	90.7	12	99.0	5.1	220.3	91.5	9	83.5	4.5
溶媒対照 (DMSO)		191.3	100.0	2	91.2	0.9	215.3	100.0	3	98.2	1.3
		221.7	100.0	5	88.2	2.4	217.3	100.0	1	77.2	0.5
陽性対照 DMBA	20	159.7	57.3	281	89.2	131.3	222.3	48.6	334	83.0	167.7
		163.7	43.7	225	89.7	104.6	204.3	61.2	163	86.2	78.8
検体	10	207.3	132.9	10	81.7	5.1	232.7	82.1	5	79.5	2.6
		246.3	75.7	22	85.3	10.7	216.3	99.0	4	89.5	1.9
	20	215.7	110.2	25	91.0	11.4	200.7	65.5	5	94.3	2.2
		221.3	92.6	13	83.3	6.5	206.0	85.9	4	83.3	2.0
	40	211.7	88.8	2	80.5	1.0	189.3	62.2	4	108.7	1.5
		205.0	87.2	14	88.5	6.6	204.3	74.6	9	85.7	4.4
	50	213.0	71.6	12	79.3	6.3	217.3	55.3	23	122.3	7.8
		166.5	57.8	9	83.7	4.5	211.7	64.8	5	83.8	2.5
	60	167.7	84.3	9	78.8	4.8	133.3	42.6	8	113.7	3.4
		122.0	45.4	10	87.2	4.8	159.7	24.6	1	99.5	0.4
	80	116.3	34.8	14	80.8	7.2	2.0	-	-	-	-
		0.0	30.9	5	91.5	2.3	6.0	-	-	-	-

A: 溶媒対照に対する百分率 B: 8ペトリ皿のコロニーの合計 C: 細胞200個あたりのコロニー形成率

-: 全細胞の消滅

DMBA: ジメチルベンゾアントラセン

統計学的処理: DUNNETT 検定

スピロジクロフェンのチャイニーズハムスター由来 V79 培養細胞を用いた
in vitro 染色体異常試験

(毒性資料 No. 原体-22)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 1996 年 12 月 5 日

検体の純度：

試験系：チャイニーズハムスター由来 V79 細胞

試験期間：第 1 回試験：

S9-Mix 非存在下および S9-Mix 存在下

4 時間処理、処理開始後 18(全濃度)及び 30 時間観察(溶媒対照群及び高用量の 3 群)

：第 2 回試験：

S9-Mix 非存在下

4 時間処理、処理開始後 18(全濃度)及び 30 時間観察(溶媒対照群及び高用量の 3 群)

【試験方法】

継代培養したチャイニーズハムスター由来 V79 細胞を用い、代謝活性化および非代謝活性化の条件下で染色体異常誘発性を検定した。

投与用量の決定

検体の調製

検体を所定量のジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、陽性対照物質であるマイトマイシンCおよびシクロホスファミドはハンクス液に溶解した。

標本の作成

フラスコに牛胎仔血清を含む培地 20mL を入れ、そこに 1×10^6 個の V79 細胞を播種した。これを一定時間 CO₂ インキュベーターで培養した。処理直前に培養液から培地を除去し、S9-Mix 非存在下では 20mL の新鮮な培地および 0.2mL の検体液を、S9-Mix 存在下では 19mL の新鮮な培地、0.2mL の検体液および 1mL の S9-Mix、を加えて 4 時間 CO₂ インキュベーターで培養した。この後、さらに新鮮な培地と交換し、残りの培養時間(処理後 18 時間あるいは 30 時間まで) CO₂ インキュベーターで培養した。各培養の終了 2 時間前に中期分裂細胞の分裂を停止するために、0.2mL のコルセミド溶液を培養液中に添加した。なお、S9 分画は Aroclor 1254 によって酵素誘導したウィスター系ラットの肝臓から分離されたものを用いた。各処理群とも 2 連で培養した。陽性対照群、溶媒対照群(培養液あたり 0.2mL の溶媒) および陰性対照群(無処理群) は 2 連で設定し、検体処理培養と同様に操作した。

培養終了後、各染色体標本を作製した。細胞を低張液(0.56%KCl ; 37°C) 処理した後、冷却した(4°C) 固定液[エタノール/酢酸(3:1)] で固定した。固定した細胞液を凍結させたスライドグラス上に滴下して乾燥後、ギムザ染色を実施した。陽性対照群では培養 18 時間後にのみ、標本を同様に作製した。陽性対照物質として、S9-Mix 非存在下の場合はマイトマイシン C (0.1µg/mL)、S9-Mix 存在下の場合はシクロホスファミド(2.0µg/mL)を用いた。

細胞生存率

各培養終了後、各期間の全培養細胞をトリプシン処理し、血球計算板を用いて適当な希釈溶液の生存細胞数を測定して生存率を算出した。

有糸分裂指数

1 培養あたり、1000 個の細胞中の分裂細胞数を計測して有糸分裂指数を求めた。

中期分裂細胞の検査

光学顕微鏡を用いて、スライドあたり 100 個の中期分裂細胞の染色体と染色分体についてギャップ、切断、断片、欠失、交換、重複異常などの構造異常を検査した。従って、2 連で培養を行っているので各濃度当り 200 個の中期分裂細胞の染色体を観察した。

【結果】

1) 一般事項

予備試験における検体の 400 μ g/mL までの濃度は、培地の浸透圧及び pH に変化を与えなかった。

2) 細胞生存率

S9-Mix 非存在下

細胞生存率は、18 時間の培養では 12 μ g/mL で溶媒対照群に対して 75%に抑制され、30 時間の培養では 3、6 および 12 μ g/mL で各々 73、54 および 22%に抑制された。

S9-Mix 存在下

細胞生存率は、18 時間の培養では 40、80 および 160 μ g/mL で溶媒対照群に対して各々 59、68 および 28%に抑制された。

3) 細胞分裂頻度

S9-Mix 非存在下

有糸分裂指数は、18 時間の培養では 0.75、1.5、3、6 および 12 μ g/mL の全濃度で、溶媒対照群に対して各々 65、76、23、82 および 12%に抑制された。

S9-Mix 存在下

有糸分裂指数は、18 時間の培養では 10、80 および 160 μ g/mL で溶媒対照群に対して各々 61、37 および 6%に抑制された。しかし、10 μ g/mL でみられた抑制は偶発的なものであり、生物学的に有意なものとは考えられなかった。

4) 染色体異常

検査結果は、次頁の表に示した。

S9-Mix 非存在下

18 時間培養での 3 μ g/mL で、構造異常を有する中期細胞数の統計学的に有意な増加がみられた。しかし、これらの数値は陰性対照群の背景データの範囲内（
）にあり、加えて 30 時間培養の溶媒対照群の値と同等であった。従って、これらは生物学的に有意なものとは考えられなかった。

S9-Mix 存在下

18 時間培養で構造異常を有する中期細胞数の生物学的および統計的に有意な増加はみられなかった。30 時間培養の 80 μ g/mL で、構造異常を有する中期細胞数有意な増加がみられた。しかし、これら陰性対照群の背景データの範囲内（
）にあった。従って、これらは生物学的に有意なものとは考えられなかった。

陽性対照物質として使用したマイトマイシン C およびシクロホスファミドでは、染色体異常を示す中期分裂細胞数が明らかに増加した。

以上の結果より、検体には代謝活性化を含む本試験条件下でのチャイニーズハムスター由来 V79 細胞に対して、染色体異常誘発はないものと判断された。

実験群 濃度 µg/mL	S9- Mix	回収 時間	観察 細胞数	ギャップ		構造異常の分類										構造異常細胞 ^c				
						染色分体型			染色体型			その他				ギャップ		交換		
						g	ig	b	f	d	ib	if	id	ex	maE	ma	cd		含む	除外
溶媒対照	-	18	200	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1.0	1.0	0.0		
無処理			200	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	1.5	1.5	0.0		
0.75			200	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	1.5	1.5	0.0		
1.5			200	0	0	1	0	0	1	0	4	0	0	0	0	2.5	2.5	0.0		
3			200	2	0	4	0	0	0	0	4	1	0	0	0	5.5*	4.5*	0.5		
陽性対照 ^A			200	7	11	30	1	0	48	1	4	44	1	0	0	48.0**	44.0**	20.5**		
溶媒対照			+	18	200	0	0	1	0	0	2	0	3	1	0	0	3.5	3.5	0.5	
無処理					200	2	1	0	0	0	2	0	5	5	0	0	0	6.0	4.5	2.0
20					200	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1.5	1.5	1.0
40					200	0	0	0	0	0	3	0	2	3	0	0	0	3.5	3.5	1.0
80					200	2	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0	0	2.5	2.0	0.0
陽性対照 ^B					200	4	0	8	1	0	13	3	6	13	0	0	0	20.5*	19.0*	6.0*
溶媒対照	-	30	200	0	0	0	0	0	2	0	6	1	0	0	0	4.5	4.5	0.5		
3			200	3	0	2	0	0	0	1	3	7	1	0	0	5.0	4.0	2.0		
溶媒対照			+	30	200	0	0	0	0	0	1	1	3	0	0	0	2.5	2.5	0.0	
80					200	1	2	7	0	0	1	0	6	8	0	0	0	7.5*	7.0*	3.0*

処理時間；4時間

* : $p \leq 0.05$, ** : $p \leq 0.01$ (Fisher の正確率検定)

A : マイトマイシンC(0.1µg/mL),

B : シクロホスファミド(2.0µg/mL)

C : 百分率

g ; 染色分体型ギャップ

ig ; 染色体型ギャップ

b ; 染色分体型切断

ib ; 染色体型切断

f ; 染色分体型断片

if ; 染色体型断片

d ; 染色分体型欠失

id ; 染色体型欠失

ex ; 交換

maE ; 交換を含む重複異常

ma ; 重複異常

cd ; 染色体破損

スピロジクロフェンのマウスにおける小核試験

(毒性資料 No. 原体-23)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 1996 年 8 月 21 日

検体の純度 :
試験系 : NMRI系マウス、 1群雌雄各5匹
(試験開始時： 6～12 週齢、体重 雌 28～33g 雄 36～42g)
試験期間 : 投与後 16、24、48 時間

【試験方法】

検体の投与量は、雌雄 5 匹からなる群に 250mg/kg、750mg/kg および 1250mg/kg を腹腔内に投与した予備試験に基づいた。以下の症状が 250mg/kg 以上の投与量で 48 時間まで記録された。すなわち、無関心、被毛粗剛、けいれん、呼吸困難および閉眼の症状がみられた。さらに、1250mg/kg 群で 5 匹中 4 匹が死亡した。

これらの結果に基づいて、検体の800mg/kgが最大許容投与量と判断し、本試験での投与量として選択した。

検体を0.5%クレモホア液に懸濁して、1群雌雄各5匹（死亡例補充用として雌雄各5匹の予備動物を含む）のマウスに800mg/kgを1回腹腔内投与し、16、24、48時間後に屠殺し、大腿骨の骨髄を摘出した。

陰性対照として0.5%クレモホア液のみを、陽性対照として脱イオン水に溶解したシクロホスファミドの20mg/kgを検体と同様に腹腔内投与した。24時間後に屠殺し、大腿骨の骨髄を摘出した。

投与容量は、全投与群ともに10mL/kgとした。

Schmidの方法を用いて検査用の塗抹標本を作製した。標本を染色後、光学顕微鏡を用いて評価した。1動物につき1000個の多染性赤血球を観察し、同時に正染性赤血球数も観察した。

【試験結果】

1) 一般症状

検体投与後48時間までに、無関心、被毛粗剛、けいれん、閉眼が観察された。摂餌行動は正常であった。死亡は検体投与群の40匹(雌雄群各5匹の死亡動物対応の補充群を含む)中1匹に認められた。対照群の動物には、中毒症状および死亡は認められなかった。

2) 突然変異誘発性

検体の染色体異常誘発作用の評価に関して、雌雄間の結果に差はなかった。従って、それらを合わせて評価して下表に示した。

投与群	評価した多染性赤血球総数	1000個の多染性赤血球あたりの正染性赤血球数	小核を有する細胞数	
			1000個の正染性赤血球あたり	1000個の多染性赤血球あたり
陰性対照群	10000	942±203	1.1±1.5	1.8±1.2
検体 16時間	9000	2501±663*	2.3±1.1	1.4±1.1
検体 24時間	10000	2166±651	1.0±1.2	1.9±1.4
検体 48時間	10000	2035±858	2.1±0.9	1.9±1.0
陽性対照群 シクロホスファミド	10000	913±491	1.8±1.3	16.4±7.7*

*: Wilcoxonの順位和検定で有意差あり (p < 0.01)

多染性赤血球に対する正染性赤血球の比率は、検体投与によって明らかに変化した。この病態発現の理由は明らかではないが、投与量が致死量に近似していることから[40例中1例が死亡、さらに一般薬理試験(毒性資料 No. 28)においても同用量で死亡例がみられている]、全身状態の悪化に伴った変動とも考えられた。

小核を有する多染性赤血球数の出現頻度には、陰性対照群と検体投与群との間に統計的な有意性は認められなかった。小核を有するこれら頻度は、陰性対照群で1.8/1000、検体投与群では16、24および48時間後で、各々1.4/1000、

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

1.9/1000および1.9/1000であった。陽性対照薬剤のシクロホスファミドは、小核を有する多染性赤血球数の明らかな増加を誘発した。小核を有する細胞数の出現頻度は16.4/1000であり、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示した。

小核を有する正染性赤血球数には投与群と陽性対照群とも有意な増加を認めなかった。

以上の結果から、本検体には突然変異誘発作用はないものと判断した。

(12) 生体機能影響

スピロジクロフェンの生体機能に及ぼす影響に関する試験

(毒性資料 No. 原体-24)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 2000年 3月 13日

検体の純度：

供試動物： ICR系マウス、SD系ラット

試験期間： 1999年 9月～2000年 3月

【投与方法】

検体を 1%Tween80 水溶液に懸濁させて用時調整した。投与方法は、マウスには腹腔内投与、ラットには経口投与とした。これらの投与経路は、本検体の急性中毒発症の可能性を探るのに適した投与経路であるため採用した。

検体の投与用量は、マウスでは 0、51.2 (ヘキソバルビタール睡眠および小腸炭末輸送能に対する試験項目で設定)、128、320、800、2000 および 5000mg/kg、ラットでは 0、2000、5000mg/kg とした。いずれの検査時においても対照群には、同用量の溶媒を投与した。投与容量は、いずれの動物種とも 20mL/kg とした。

【試験項目および結果】

1. 中枢神経系に対する作用

(1) マウスの一般状態および体重

供試動物： ICR系雌雄マウス、6週齢、1群各3匹

体重；雄 28.9～36.5g、雌；21.0～28.2g

方 法：投与直前、投与後 30分、3、6時間、1、2、3 および 7日に Irwin 法に準じ、一般状態を観察した。

結 果：雄マウスでは 2000mg/kg 以上、雌マウスでは 800mg/kg 以上の群において、用量に依存して認知力、運動性、運動失調、筋緊張、反射および自律神経系の項目に抑制性の徴候および死亡が認められた。これらの徴候は、雄マウスに比べて雌マウスで強く発現した。すなわち、雌雄マウスに受動態の

発現、自発運動の低下、反応性の低下、触覚反応の低下、よろめき歩調の発現、握力の低下、躯体筋緊張の低下、腹筋緊張の低下、同側屈筋反射の低下、眼裂の縮小、流涙、チアノーゼ、体温低下および呼吸数の減少が認められた。さらに、雌では警戒性の低下、位置視覚の低下、間代性痙攣、正向反射の低下、四肢筋緊張の低下および角膜反射の低下も認められた。これらの症状は、投与後 30 分以降に認められた。雄では、5000mg/kg 群の全例が投与 2 日以内に死亡した。雌では、800mg/kg 群の 2 例、2000 および 5000mg/kg 群の全例が投与 2 日以内に死亡した。

また、雌雄マウス共に検体投与に起因したと考えられる体重の変化は認められなかった。

(2) ラットの一般状態および体重

供試動物：SD 系雄ラット、6 週齢、1 群各 5 匹

体重；216～256g

方 法：投与 1 日前、投与後 1、6 時間、1、2、3 および 7 日に急性中毒症状の観察を行った。

結 果：5000mg/kg の最高用量群まで、検体に投与に起因したと考えられる異常症状および体重の変化は認められなかった。

(3) 雄マウスのヘキソバルビタール睡眠に対する作用

供試動物：ICR 系雄マウス、6 週齢、1 群各 8 匹

体重；30.3～38.0g

方 法：投与 1 日後にヘキソバルビタール注射液を 100mg/kg の用量で皮下注射し、正向反射の消失から回復までの時間を測定した。

結 果：2000mg/kg 群の 3 例と 5000mg/kg 群の 3 例は、ヘキソバルビタール投与前に死亡した。さらに、2000mg/kg 群の 1 例と 5000mg/kg 群の 4 例は、ヘキソバルビタール投与後 3 時間以内に死亡した。2000mg/kg 以上の群で睡眠時間の延長がみられたが、800mg/kg 以下の群では検体に投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。

(4) 雄ラットの体温に対する作用

供試動物：SD系雄ラット、6週齢、1群各5匹

体重；216～256g

方 法：投与1日前、投与後1、6時間、1、2、3および7日にデジタルラボラトリーサーモメーターを用いて、肛門内約4cmの直腸温を測定した。

結 果：5000mg/kgの最高用量群まで、検体に投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。

2. 循環器系に対する作用

(1) 雄ラットの血圧および心拍数に対する作用

供試動物：SD系雄ラット、6週齢、1群各5匹

体重；216～240g

方 法：投与1日前、投与後1、6時間、1、2、3および7日に非観血式血圧測定装置を用いて、安静時の最高血圧および心拍数を測定した。

結 果：5000mg/kgの最高用量群まで、検体に投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。

3. 自律神経系に対する作用

(1) 雄ラットの瞳孔径に対する作用

供試動物：SD系雄ラット、6週齢、1群各5匹

体重；216～256g

方 法：投与1日前、投与後1、6時間、1、2、3および7日にルーペを用いて、瞳孔径を測定した。

結 果：5000mg/kgの最高用量群まで、検体に投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。

4. 消化器に対する作用

(1) 雄マウスの小腸炭末輸送能に対する作用

供試動物：ICR系雄マウス、6週齢、1群各8匹

体重；29.2～37.5g

方 法：投与1日後に炭末懸濁液を10mL/kgの容量で経口投与した。炭末投与30分後にマウスを屠殺し、小腸を摘出した。小腸開始部から炭末先端までの長さを測り、全小腸の長さに対する炭末移動距離の比率(%)を求めた。

結 果：320mg/kg以上の群で二相性の炭末輸送能の変化が認められた。320mg/kgおよび800mg/kg群では促進が認められ、2000mg/kg群では明確な変化は認められず、5000mg/kg群では抑制が認められた。

5. 骨格筋に対する作用

(1) 雄ラットの握力に対する作用

供試動物：SD系雄ラット、6週齢、1群各5匹

体重；216～256g

方 法：投与1日前、投与後1、6時間、1、2、3および7日に、握力測定装置のグリッドに四肢をつかまらせて保定した尾を後方に引き、グリッドから四肢が離れた時点(最大)の握力を測定した。

結 果：5000mg/kgの最高用量群まで、検体に投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。

6. 腎機能に対する作用

(1) 雄ラットの尿量、尿中電解質排泄量、浸透圧、pH、潜血、蛋白質、ケトン体およびグルコースに対する作用

供試動物：SD系雄ラット、6週齢、1群各5匹

体重；216～256g

方 法：投与1日後に生理食塩液を25mL/kgの容量で30分おきに2回経口投与し、2回目の生理食塩液投与後直ちにラットを採尿ケージ入れ、3時間の尿を採取した。

結 果：5000mg/kgの最高用量群まで、検体に投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。

7. 血液に対する作用

(1) 雄ラットの血液に対する作用

供試動物：SD系雄ラット、6週齢、1群各5匹

体重；188～218g

方 法：投与1日後に動物をエーテルで麻酔して腹部下行大静脈より採血し、溶血の指標としての血漿ヘモグロビン濃度、凝固の指標としての血漿のプロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間を測定した。血漿ヘモグロビン濃度はCrippsの方法に従って分光光度計を用いて、血漿のプロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間は全自動血液凝固測定装置を用いて各々測定した。

結 果：5000mg/kgの最高用量群まで、検体に投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。

以上の結果から、本検体を雌雄マウスに腹腔内投与すると、800mg/kg以上の投与群に抑制性の非特異的な症状が発現し、死亡も認められた。さらに、雄マウスに本検体を腹腔内投与すると、2000mg/kg以上の投与群でヘキソバルビタール睡眠時間の延長が、320および800mg/kg投与群で炭末輸送能の促進が、5000mg/kg投与群では炭末輸送能の抑制が観察された。一方、雄ラットに本検体を5000mg/kgまで投与しても異常は認められず、体重、体温、血圧、心拍数、瞳孔径、握力、腎機能および血液パラメーター（溶血、凝固）にも明確な変化はみられなかった。本試験の結果ならびに別に実施された急性毒性試験の結果は、本検体の経口、経皮および吸入経路からの急性毒性は非常に弱いことを示しており、本検体が散布作業に伴って摂取された場合や誤って摂取された場合に、急性中毒が発現する可能性は極めて低いと推測された。

スピロジクロフェンの「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

項目	投与経路	投与量 mg/kg	動物数/ 群	無作用量 mg/kg	作用量 mg/kg	結果の 概要	
中枢神経系	マウスの一般状態 (Irwin 法)	腹腔	0、128、 320、800、 2000、5000	♂♀: 各 3	♂:800 ♀:320	♂:2000 ♀:800	受動態の発現、 自発運動の低下、 反応性の低下、 触覚反応の低下、 よろめき歩調、 握力の低下、 躯体筋緊張の低下、 腹筋緊張の低下、 同側屈筋反射の低下、 眼裂の縮小、流涙、 チアノーゼ、 体温低下および呼吸数の減少
	ラットの一般状態	経口	0、2000、 5000	♂:5	♂:5000	♂:>5000	変化なし
	マウスのヘキソバルビタール睡眠時間	腹腔	0、51.2、 128、320、 800、2000、 5000	♂:8	♂:800	♂:2000	延長
	ラットの体温	経口	0、2000、 5000	♂:5	♂:5000	♂:>5000	変化なし
循環系	ラットの血圧および心拍数	経口	0、2000、 5000	♂: 5	♂:5000	♂:>5000	変化なし
自律神経系	ラットの瞳孔径	経口	0、2000、 5000	♂: 5	♂:5000	♂:>5000	変化なし
消化管	マウスの小腸炭末輸送能	腹腔	0、51.2、 128、320、 800、2000、 5000	♂:8	♂:128	♂:320	320 および 800 で促進 5000 で抑制
骨格筋	ラットの握力	経口	0、2000、 5000	♂: 5	♂:5000	♂:>5000	変化なし
腎機能	ラットの尿排泄	経口	0、2000、 5000	♂: 5	♂:5000	♂:>5000	変化なし
血液	ラットの溶血	経口	0、2000、 5000	♂: 5	♂:5000	♂:>5000	変化なし
	ラットの血液凝固	経口	0、2000、 5000	♂: 5	♂:5000	♂:>5000	変化なし

(13) その他

スピロジクロフェンのラットにおける発達神経毒性

(毒性資料 No. 原体-25)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：2006年4月3日

検体の純度：

試験動物：ウイスター系ラット，1群雄雌各30匹

交配開始時；雄15週齢、雌12週齢(平均体重 雄155g, 雌117g)

投与期間：妊娠0日～哺育21日(2002年8月～2002年10月)

妊娠0日は膺垢塗沫標本で授精が確認された日とした。

【投与方法】

交配後、検体を0(対照群)、70、350及び1500ppmの濃度で飼料に混入し、妊娠雌親動物に妊娠0日から児動物の哺育21日まで投与した。児動物は離乳後、無添加の飼料を試験終了時の出生後75±5日まで与えた(哺育28日目までは群飼育、その後個別飼育とした)。雄親動物は交配後屠殺、雌親動物は哺育21日に屠殺した。

投与用量設定の根拠；

試験項目及び結果：

1. 繁殖成績

妊娠期間を含み、交尾率、受胎率、出産率を指標とした繁殖成績に検体投与の影響は認められなかった。

2. 親動物

2-1. 臨床観察

ケージサイド観察は少なくとも1日1回（休日及び週末は1日1回）行った。詳細な身体的観察も1日に1回、妊娠0日より哺育21日まで行った。

試験期間を通じて何らの臨床症状も認められなかった。投与に関連する死亡は認められなかった。

2-2. 体重及び摂餌量

妊娠期間（0、6、13及び20日）及び哺育期間（0、7、14及び21日）を通じ、個体毎に体重及び摂餌量の測定を行った。更に哺育期間4日にも体重を測定した。

妊娠期間中雌親動物の体重、増体重及び摂餌量に投与に関連する変動は認められなかった。哺育期間中では1500ppm群において、摂餌量が第2週に有意に減少した。また、増体重が抑制し哺育21日に対照群と比較して統計学的に有意に体重が減少した。

2-3. 検体摂取量

雌親動物における検体の平均1日摂取量を表1に示した。

表1. 検体摂取量(mg/kg体重/日)

用量	70ppm	350ppm	1500ppm
妊娠期間	6.5	32.1	135.9
哺育期間	14.0	69.7	273.8

2-4. 雌親動物の機能観察(FOB)

機能観察(FOB：ホームケージ内、ハンドリング時、オープンフィールド)を妊娠6および20日（雌親動物全例を対象）と哺育11および21日（各群最低10例）に実施した。観察は主として流涙、流涎、立毛、眼球突出、排尿、排便、瞳孔機能、眼瞼閉鎖、瘻れん、振せん、異常動作/異常行動、姿勢、歩行異常について実施した。

その観察の結果、検体投与に起因した異常はいずれの投与群にも認められなかった。

3. 児動物

3-1. 児動物のデータ

各群ごとの総産児数、同腹児数、死産児数、出生率、生存率を検査した。

その結果、これらの項目に投与に起因した変化は認められなかった。

3-2. 臨床観察

児動物は出生後直ちに性別を判定し、体重を測定した。以降、哺育期間及び離乳後の飼育期間中の死亡率、瀕死状態、神経行動学的変化、一般毒性症状についてケージサイドから少なくとも1日1回観察した。詳細な身体的観察も離乳前は1日に1回、その後は週に1回行った。

児動物に検体投与に起因すると考えられる臨床的異常及び死亡は認められなかった。

3-3. 体重

児動物の体重を出生後0、4、11、17、21日、その後毎週1回測定した。

出生時体重に投与群と対照群との間に差は認められなかったが、哺育期間中、1500ppm群で対照群と比較して統計学的に有意に増体重抑制がみられ、体重も有意に低下した（哺育21日に最大-8%）。

離乳後の飼育期間中では、検体投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

3-4. 摂餌量

検体の無添加の飼料を給餌した児動物における摂餌量を生後28日より試験終了日まで週1回測定した。

その結果、児動物の摂餌量に検体投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

3-5. 発育の指標

全ての児動物について包皮分離（生後38日から）、臆開口（生後29日から）の認められた日齢を観察した。瞳孔収縮については、全児動物について生後21日に調べた。

これらの項目において検体投与群と対照群に差は認められなかった。

3-6. 機能観察 (FOB)

各腹雌雄1例の児動物（各群雌雄16匹、最低10匹）についてホームケージ外で雌親動物と同様の項目について、生後4、11、21、35、45、60日に観察した。ただし生後4及び11日にはオープンフィールドでの観察は実施しなかった。

その結果、対照群に比して用量群に著変は観察されなかった。

神経行動学的検査：

3-7. 運動能及び移動運動能試験

各腹雌雄 1 例の児動物(各群雌雄 16 匹、最低 10 匹)について運動能、移動運動能を生後 13、17、21 及び 60 日に 8 の字型迷路を用いて自動測定器で測定した。

運動能と移動運動能ともに、いずれの投与群においても対照群と比較して統計学的有意差は認められず、検体投与による変化は認められなかった。また、慣れへの影響は全ての投与群で認められなかった。

3-8. 聴覚性驚愕反応

自動聴覚測定装置を用い、各腹雌雄 1 例の児動物(各群雌雄 16 匹、最低 10 匹)を用いて各段階の周波数音に対する反応を生後 22、38、60 日に測定した。

児動物の聴覚性驚愕反応に対照群と各用量群の差は認められなかった。

70ppm 群雄において、生後 60 日で対照群と比較して統計学的に有意に増加し、各測定日のいくつかのインターバルでも有意に増加した。しかしながら、用量関連性がなく雄のみに認められたことから、偶発的なもので投与による変化とは考えられなかった。

表 2. 生後 60 日の反応強度 (g)

用量 (ppm)		0	70	350	1500
反応強度 (平均±S.D)	雄	180±112	311±161***	161±82	165±82
	雌	87±36	101±67	81±53	92±40

* : ANOVA+Dunnett's Test p<0.05

表 3. 各ブロック毎の反応強度(g) 雄

検査時期	用量 (ppm)	ブロック 1	ブロック 2	ブロック 3	ブロック 4	ブロック 5
生後 22 日	0	50±23	44±23	38±19	36±17	33±14
	70	57±24	58±25	55±26***	54±27***	44±25
	350	44±19	38±14	37±13	36±13	33±14
	1500	50±21	46±23	40±16	39±12	36±15
生後 38 日	0	89±52	81±51	62±32	58±30	52±31
	70	112±75	107±73	101±52	96±48***	88±49***
	350	99±57	91±66	74±63	53±28	48±28
	1500	112±54	75±34	64±36	71±35	63±30
生後 60 日	0	239±138	251±194	155±113	143±88	111±69
	70	433±204***	381±194	253±192	240±121***	248±168***
	350	224±148	182±91	150±84	131±68	117±71
	1500	204±104	201±121	178±106	126±74	115±58

* : 反復測定 ANOVA+Dunnett's Test p<0.05

3-9. 受動回避能

各腹雌雄 1 例の児動物(各群雌雄 16 匹、最低 10 匹)を用い、四肢への電気ショックに対する受動回避能について、その学習能と短時間記憶能力及び長時間記憶能力を生後 22 及び 29 日に測定した。

その結果、これらの能力獲得において対照群と用量群との間に差は認められなかった。

3-10. M 型水迷路試験

各腹雌雄 1 例の児動物(各群雌雄 16 匹、最低 10 匹)について水迷路を用いた学習能力及び記憶能力を生後 60 日に測定した。またその 7 日後に再試験を行った。

雌の 70ppm 群及び 350ppm 群において、記憶保持段階での達成までの試行数が対照群と比較して有意に増加したが、用量関連性がなく雌のみに認められたことから、偶発的なもので投与に関連する変化とは考えられなかった¹。

雄の全用量群及び雌の 1500ppm 群では学習能力及び記憶能力獲得において対照群と用量群との間に差は認められなかった。

表 4. 記憶保持段階の基準達成までの試行数

用量 (ppm)		0	70	350	1500
試行数 (平均±S.D)	雄	6.5±2.8 (6/9)	5.6±1.3 (4/12)	5.4±0.7 (4/12)	5.3±0.6 (4/12)
	雌	5.8±1.9 (3/13)	8.5±3.7 *(11/5)	7.3±2.3 *(10/6)	8.9±4.5 (7/8)

*: $p < 0.05$ [申請者追記] 統計は各群の失敗動物と成功動物の頻度から Fisher 検定 (直接確率計算、片側検定) を実施した。なお、初回から 5 回続けてエラーしなかったものを成功動物、1 回でもエラーしたものを失敗動物と定義した。(): 失敗動物数/成功動物数。

3-11. 眼科学的検査

各群雌雄最低 10 匹の灌流固定用の児動物について、生後 50~60 日に眼科学的検査を半暗室で実施した。ペンライトあるいは透光器を用いて瞳孔反射を検査し、ついで散瞳剤を各々の眼に点眼し瞳孔を散大させ、結膜、角膜及びレンズをスリットランプ顕微鏡を用いて検査し、硝子体液、網膜、脈絡膜及び視神経円板については集光レンズ付きの間接検眼鏡を用い検査した。

観察された眼科学的所見には検体投与に関連するものは認められなかった。

3-12. 血液生化学的検査

血漿中のコレステロールを児動物については生後 4 及び 21 日に、親動物については哺育 21 日に測定した。生後 4 日にはその後の検査に選抜されなかった動物を対象にでき

¹ 申請者注: この結論は、追加試験 (毒性資料 No.原体-26) において同用量で M 型水迷路に加えシンシナティ水迷路試験を実施した結果、いずれの用量群でも対照群と比較し有意差が認められなかったことから支持されるものである。

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

るだけ多くの親動物から得られた児動物（約 10 匹/群）のサンプルをプールして検査した。生後 21 日及び哺育 21 日目には、各群 10 匹の親動物と剖検用の各群雌雄各 10 匹の児動物の眼窩静脈叢からサンプルを採取した。

その結果、親動物及び児動物ともにいずれの検査時期においても対照群と用量群との間に差は認められなかった。

4. 剖検

4-1. 中間検査動物の剖検

中間検査のため、生後 21 日に各群雌雄それぞれ 10 例の児動物を剖検した。

検査した例には肉眼的に著変は認められなかった。

4-2. 最終屠殺動物の剖検

試験終了時に灌流固定した動物及び灌流固定しなかった動物について、各群雌雄それぞれ 10 例を剖検した。

検査した例には肉眼的に著変は認められなかった。

5. 病理組織学的検査及び脳計測

生後 21 日と試験終了時に各群雌雄それぞれ 10 例を対象に、ペントバルビタール (50mg/kg) の腹腔内投与で深麻酔した後、左心室からリン酸緩衝液に溶解した亜硝酸ナトリウムで灌流後、1% (w/v) グルタルアルデヒドと 4% (w/v) の EM 級ホルムアルデヒドのリン酸緩衝液からなる汎用固定液を用いて灌流固定した。生後 21 日の動物は脳のみ、試験終了時の動物は以下の組織も採取し、10%緩衝ホルマリンで後固定した。

脳、脊髄、両眼（視神経付）、末梢神経（坐骨神経、脛骨神経および腓腹神経）、ガッセル神経節、腓腹筋、両前肢、神経組織や骨格筋における肉眼的異常部位および個体標識部位。

脳は灌流固定後頭蓋骨から摘出し、ホルマリンによる固定前に重量を測定し、脳体重比を算出した。なお、脳重量については、試験終了時の灌流固定しなかった動物、各群雌雄各 10 例についても測定し脳体重比を算出した。

さらに脳については、肉眼的計測した後、8つの冠状断面にし、病理標本用と形態計測用の切片を作製し、高用量群および対照群について検鏡した。

5-1. 脳重量

生後 21 日の中間検査では、1500ppm 群雄の最終体重が対照群と比較して統計学的に有意に減少した。脳の対体重比が増加したが、脳実重量に有意な差が認められないことから低

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

体重に関連するものと考えられた。雌では対照群との差は認められなかった。また、最終屠殺動物の最終体重及び脳重量（灌流、非灌流とも）に用量群と対照群との差は認められなかった。

表 5. 脳重量（生後 21 日）

性別		雄			雌		
投与量(ppm)		70	350	1500	70	350	1500
最終体重				↓ 89			
脳	実重量						
	対体重比			↑ 110			

↑ ↓ : $p < 0.05$ (ANOVA + Dunnett's)

5.2. 脳の肉眼的計測

大脳及び小脳の長軸の長さを計測した。

生後 21 日の中間検査及び最終屠殺動物の脳の計測結果に用量群と対照群との差は認められなかった。

5.3. 鏡検的計測

対照群と高用量群の以下の部位について形態計測した。

前頭葉皮質背部の厚さ（前脳）、頭頂葉皮質背側部の厚さ（前脳）、尾状核・被殻の幅（前脳）、脳梁の厚さ（前脳）、海馬回の厚さ（中脳）、小脳高（小脳橋）

生後 21 日の中間検査では、雌の尾状核・被殻の幅が統計学的に有意に減少した。しかしながら、肉眼的及び病理組織学的に検査において尾状核・被殻に形態学的な変化は認められなかったこと、脳重量に差は認められなかったこと、さらに同齢の雄や最終屠殺の雌雄にも同じ影響がみられなかったことから、投与による変化とは考えられなかった。雄ではいずれの測定値にも対照群との差は認められなかった。

最終屠殺動物では、対照群と比較し雄の頭頂葉皮質の厚さが減少し、雌の尾状核・被殻の幅が増加した。しかしながら、肉眼的及び病理組織学的に検査において頭頂葉あるいは尾状核・被殻に形態学的な変化は認められなかったこと、脳重量に差は認められなかったこと、さらに中間検査例や最終屠殺の雄あるいは雌に同じ影響がみられなかったことから、投与による変化とは考えられなかった。

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

表 6. 脳の計測

検査時期	中間検査 (生後 21 日)				最終屠殺			
	雄		雌		雄		雌	
用量	0	1500	0	1500	0	1500	0	1500
尾状核・被殻	3.05	3.04	3.08	3.00*	3.42	3.29	3.38	3.47*
頭頂葉	1.88	1.85	1.90	1.89	1.88	1.75*	1.82	1.81

* : $p < 0.05$ (ANOVA + Dunnett's)

5-4. 病理組織学的検査

以下の組織はパラフィン包埋し、H.E 染色法で染色した。

脳の 8 部位、脊髄の 3 部位 (頸部、胸部および腰部)、馬尾、眼、視神経および腓腹筋

以下の組織はグリコールメタアクリレートで包埋し、Lee の変法で染色した。

後根および前根を含む脊髄神経節 (頸膨大及び腰膨大)、ガッサー神経節、末梢神経 (頸骨神経、腓腹神経および坐骨神経) の縦断面または横断面

高用量群及び対照群について、病理組織学的検査を実施した。

中間検査及び最終屠殺動物の病理組織学的検査結果に用量群と対照群との差は認められなかった。

以上、本発達神経毒性試験の結果、1500ppm を投与された雌親動物の哺育期間中の摂餌量及び体重が対照群と比較して低下した。児動物では、雌雄 1500ppm 群において対照群と比較して哺育期間中の増体重が抑制して体重が低下したが、離乳後に回復した。一方、児動物の各種機能検査、神経行動学的検査、眼科学的検査、脳重量及び脳の計測ならびに神経組織の病理組織学的検査の結果には検体投与の影響は認められなかった。

これらの結果に基づいて、本試験条件下における無毒性量 (NOEL) は親動物、児動物とも 350ppm (69.7mg/kg 体重/日 [親動物 : 哺育期間] *) であると判断した。

* : 検体に起因する影響が哺育期間のみであったため哺育期間中に暴露した混餌濃度に基づいた。

スピロジクロフェンのラットにおける発達神経毒性 追加試験

(毒性資料 No. 原体-26)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：2007年6月18日

検体の純度：

試験動物：ウイスター系ラット、1群雄雌各30匹

交配開始時；雄15週齢、雌12週齢(体重雌169.3~229.7g)

投与期間：妊娠0日~哺育21日(2006年8月~2006年10月)

妊娠0日は膣垢塗沫標本で授精が確認された日とした。

【投与方法】

交配後、検体を0(対照群)、70、350及び1500ppmの濃度で飼料に混入し、妊娠雌親動物に妊娠0日から児動物の哺育21日まで投与した。児動物は離乳後、無添加の飼料を試験終了時の出生後75±5日まで与えた。雄親動物は交配後屠殺、雌親動物は哺育21日に屠殺した。

本試験の目的及び用量設定；

試験項目及び結果：

1. 繁殖成績

妊娠期間を含み、交尾率、受胎率を指標とした繁殖成績に検体投与の影響は認められなかった。

2. 親動物

2-1. 臨床観察

ケージサイド観察は少なくとも1日1回行った。詳細な身体的観察も1日に1回、妊娠0日より哺育21日まで行った。

試験期間を通じて何らの臨床症状も認められなかった。投与に関連する死亡は認められなかった。

2-2. 体重及び摂餌量

妊娠期間（0、6、13及び20日）及び哺育期間（0、7、14及び21日）を通じ、個体毎に体重及び摂餌量の測定を行った。更に哺育4日にも体重を測定した。

妊娠期間中雌親動物の体重、増体重及び摂餌量に有意な変動は認められなかった。哺育期間中では体重には投与の影響がみられなかったが、摂餌量は1500ppm群において対照群と比較して統計学的有意差は認められないもののやや減少した（-4.1～-5.1%）。

2-3. 検体摂取量

雌親動物における検体の平均1日摂取量を表1に示した。

表1. 検体摂取量(mg/kg体重/日)

用量	70ppm	350ppm	1500ppm
妊娠期間	5.4	28.6	119.2
哺育期間	13.0	65.7	262.1

3. 児動物

3-1. 児動物のデータ

各群の総産児数、同腹児数、死産児数、出生率、生存率を検査した。

その結果、これらの項目に投与に起因した変化は認められなかった。

3-2. 臨床観察

児動物は出生後直ちに性別を判定し、体重を測定した。死亡率、瀕死状態、一般毒性症状についてケージサイドから哺育期間中は少なくとも1日1回、離乳後は1日2回観察

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

した。詳細な身体的観察も離乳前は1日に1回、その後は週に1回行った。

児動物に検体投与に起因すると考えられる臨床的異常及び死亡は認められなかった。

3-3. 体重

児動物の体重を出生後0、4、11、17、21日、その後毎週1回測定した。

出生時体重に投与群と対照群との間に差は認められなかったが、哺育期間中、雌雄1500ppmの児動物に対照群と比較して統計学的に有意に増体重抑制がみられ、体重も有意に低下した(哺育21日に最大-8%)。

離乳後の飼育期間中では、1500ppm群雄の生後29~50日において対照群と比較し減少(-5~6%)し、生後35及び42日は統計学的に有意であった。雌の全投与群および雄の低、中用量群では検体投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

表2. 哺育期間中の児動物の体重

性	雄			雌		
	70	350	1500	70	350	1500
用量(ppm)						
生後21日			↓92			↓92
体重増加量(4-21日)			↓90			↓91

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの。

↑↓ : $p < 0.01$ (Dunnett's)

表3 離乳後の児動物の体重

性	雄			雌		
	70	350	1500	70	350	1500
用量(ppm)						
生後35日			↓94			
生後42日			↓95			

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの。

↑↓ : $p < 0.05$ (ANOVA+Dunnett's)

3-4. 摂餌量

離乳21日以降は検体無添加の飼料を給餌し、摂餌量を測定しなかった。

3-5. 学習と記憶試験

1) M型水迷路試験

各腹雌雄1例の児動物(各群雌雄16匹)についてM型水迷路を用いた学習能力及び記憶能力を生後60日と67日に検査した。

その結果、これらの能力獲得において対照群と用量群との間に投与による影響は認められず、さらに統計学的な有意差も認められなかった。

2) シンシナティ水迷路試験

各腹雌または雄 1 例の児動物(各群雌雄最低 10 匹)についてシンシナティ水迷路を用いた学習能力及び記憶能力を生後 60 日から 5 日間測定した。またその 7 日後に再試験を行った。

その結果、これらの能力獲得において対照群と投与群との間に投与に関連する影響は認められず、さらに統計学的有意差も認められなかった¹。

3-6. 眼科学的検査

各群雌雄最低 10 匹の児動物について、生後 50~60 日に眼科学的検査を半暗室で実施した。ペンライトあるいは透光器を用いて瞳孔反射を検査し、ついで散瞳剤を各々の眼に点眼し瞳孔を散大させ、結膜、角膜及びレンズをスリットランプ顕微鏡を用いて検査し、硝子体液、網膜、脈絡膜及び視神経円板については集光レンズ付きの間接検眼鏡を用い検査した。

観察された眼科学的所見には検体投与に関連するものは認められなかった。

4. 剖検

4-1. 中間検査例の剖検(出生後 21 日)

中間検査のため、出生後 21 日に各群雌雄それぞれ 10 例の児動物を剖検した。

検査した例には肉眼的に著変は認められなかった。

4-2. 最終屠殺例の剖検(出生後 75 日)

試験終了時に各群雌雄それぞれ 10 例について剖検した。

検査した例には肉眼的に著変は認められなかった。

5. 脳の計測

生後 21 日及び試験終了時の児動物各群雌雄それぞれ 10 例について、灌流固定した。

5-1. 脳重量

脳重量を測定し脳体重比を算出した。

生後 21 日の中間検査では、最終体重および脳重量ともに対照群と投与群との間に差は認められなかった。最終屠殺動物では、1500ppm 群雄の最終体重が対照群と比較して統計学的に有意に減少した。雌の最終体重はいずれの投与群でも対照群との差は認められなかった。また、実脳重量では雌雄いずれの投与群とも対照群との差は認められなかったが、対体重比は 1500ppm 群雄で有意に増加し、最終体重の減少によるものと考えられた。

¹ 前試験(毒性資料 No. 原体-25) でみられた雌の低、中用量群の有意差は、検体の影響ではないとする結論を担保するものであった。

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

表4 脳重量 (最終屠殺)

性別		雄			雌		
投与量(ppm)		70	350	1500	70	350	1500
最終体重				↓92			
脳	重量						
	対体重比			↑109			

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの。

↑ ↓ : $p < 0.05$ (ANOVA + Dunnett's)

5-2. 肉眼的計測

鏡検的計測用切片を作製する前に大脳及び小脳の長軸の長さを計測した。

中間検査及び最終屠殺動物の脳の計測結果に用量群と対照群との差は認められなかった。

5-3. 鏡検的計測

全群の以下の部位を形態計測した。

前頭葉皮質背部の厚さ (前脳)、頭頂葉皮質背側部の厚さ (前脳)、尾状核・被殻の幅 (前脳)、海馬回の厚さ (中脳)、小脳高 (小脳/橋)

生後21日の中間検査では、いずれの投与群の雌雄においても対照群との差は認められなかった。

最終屠殺動物でも、いずれの投与群の雌雄においても対照群との差は認められなかった。

以上、本発達神経毒性試験の結果、雌親動物では投与による影響は認められなかった。児動物では、雌雄1500ppm群において哺育期間中に増体重抑制が認められ、生後21日には対照群と比較し体重が減少した。雄では離乳後も体重が低値であった。児動物の学習と記憶試験及び脳の計測の結果には検体投与の影響は認められなかった。これらの結果に基づいて、本試験条件下における無毒性量 (NOAEL) は親動物が1500ppm (262.1mg/kg 体重/日 [親動物: 哺育期間])、児動物は350ppm (65.7mg/kg 体重/日 [親動物: 哺育期間]) であると判断した。なお、1500ppmまでの用量に発達神経毒性は認められなかった。

申請者注: 本試験は前試験に対するU. S. EPAからの要求を満たしたものであり、また、各試験項目で前試験と同様の結果が得られ発達神経毒性を示唆する所見は認められなかった。

2. 代謝物

(1) 急性毒性

代謝物： のラットを用いた急性経口毒性試験
(毒性資料 No. 代謝物-1)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 2000年6月2日

検体の純度：

試験動物： ウィスター系ラット、1群雌雄各3匹
試験開始時；雄 8～9週齢(209～264g)
雌 9週齢(158～202g)

試験期間： 14日間観察

【試験方法】

検体調製

被験物質を所定量秤量し、カルボキシメチルセルロース(CMC)0.5% (W/V) 水を用いて懸濁液を調製した。

投与方法

投与前約17時間絶食させたラットに、胃ゾンデを用いて強制的に単回経口投与した。投与容量は、体重100gあたり1mLとした。

一般症状の観察及び体重の測定

観察期間は14日間とし、検体投与日は頻繁に、翌日からは毎日1回注意深く臨床観察を行った。

体重測定は、検体投与直前、投与後7日及び14日に行った。

剖検

観察終了時に、全生存動物をエーテル麻酔下で屠殺後、剖検した。

また、途中死亡動物についても剖検した。

LD₅₀値に対する評価

OECDガイドラインに示されている、cut-off valuesに基づいて評価した。

【結果】

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雄：200, 500, 2000 雌：200, 500, 2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄：500 以上 1000 未満 雌：300 以上 500 未満
死亡開始時間及び 終了時間	雄：4 時間から 2 日 雌：4 時間から 2 日
症状発現時間及び 消失時間	雄：2 時間から 5 日 雌：1 時間から 5 日
最大無作用量 (mg/kg)	雄：200 雌：—
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：200 雌：200

*：OECD 指針 No. 423 に準拠

一般症状の観察及び体重の測定

200mg/kg の用量において、雄では臨床症状みられなかった。同用量群の雌では全例で投与後 1 時間から 2 時間の間に運動性の低下が見られた。死亡は 200mg/kg 群では雌雄共に認められなかった。

500mg/kg、2000mg/kg 群では運動性及び反応性の低下が見られ、また穴掘りや身づくろい行動の亢進、呼吸困難、流涎の増加及び歩行失調(500mg/kg のみ)が認められ、更 2000mg/kg では一時的に円運動を示す動物が雄 1 例(No. 2)で認められた。死亡は 500mg/kg 群雄では 1 例、雌では 2 例でみられ、2000mg/kg 群では雌雄共に全例が死亡した。中毒症状は 2000mg/kg の動物では死亡するまで持続し、500mg/kg の動物では試験後 4 日まで観察された。

体重増加に、検体投与による影響は雌雄ともに認められなかった。

剖検

死亡動物では、肝臓で暗赤色化、脾臓で退色化が認められた。生存動物では肉眼的病理所見は認められなかった。

試験終了時に屠殺した動物には、肉眼的病理所見は認められなかった。

代謝物： のラットを用いた急性経口毒性試験
(毒性資料 No. 代謝物-2)
試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 2001年 2月 1日

検体の純度：

試験動物： ウィスター系ラット、1群雌雄各3匹

試験開始時；雄 9週齢(257～267g)

雌 9週齢(161～168g)

試験期間： 14日間観察

【試験方法】

検体調製

被験物質を所定量秤量し、クレモホア EL 2%脱塩水でを用いて懸濁液を混和調製した。

投与方法

投与前約 17 時間絶食させたラットに、胃ゾンデを用いて強制的に単回経口投与した。投与容量は、体重 100g あたり 1mL とした。

一般症状の観察及び体重の測定

観察期間は 14 日間とし、検体投与日は頻繁に、翌日からは毎日 1 回注意深く臨床観察を行った。

体重測定は、検体投与直前、投与後 7 日及び 14 日に行った。

剖検

観察終了時に、全生存動物をエーテル麻酔下で屠殺後、剖検した。

また、途中死亡動物についても剖検した。

LD₅₀ 値に対する評価

OECD 指針 No. 423 に示されている、cut-off values に基づいて評価した。

【結果】

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雄：2000 雌：2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄：>2500* >2000# 雌：>2500* >2000#
死亡開始時間及び 終了時間	雄：－ 雌：－
症状発現時間及び 消失時間	雄：－ 雌：－
最大無作用量 (mg/kg)	雄：2000 雌：2000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：2000 雌：2000

*：OECD 指針 No. 423 に準拠

#：12 農産第 8147 号に基づく

一般症状の観察及び体重の測定

中毒症状及び死亡は、雌雄共に認められなかった。

順調な体重増加が、雌雄共にみられた。

剖検

剖検において、雌雄共に検体に起因する所見は認められなかった。

【結果】

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雄：2000 雌：2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄：>2500* >2000# 雌：>2500* >2000#
死亡開始時間及び 終了時間	雄：－ 雌：－
症状発現時間及び 消失時間	雄：－ 雌：－
最大無作用量 (mg/kg)	雄：2000 雌：2000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：2000 雌：2000

*：OECD 指針 No. 423 に準拠

#：12 農産第 8147 号に基づく

一般症状の観察及び体重の測定

中毒症状及び死亡は、雌雄共に認められなかった。

順調な体重増加が、雌雄共にみられた。

剖検

剖検において、雌雄共に検体に起因する所見は認められなかった。

(2) 変異原性

代謝物： の細菌を用いた復帰突然変異性試験
(毒性資料 No. 代謝物-4)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 1999年 4月 8日

検体の純度：

試験系： 細菌 (サルモネラ菌) TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537

【試験方法】

まず、プレート法を用いて S9-Mix の非存在下と存在下で、0、16、50、158、500、1581、5000 μ g/プレートの濃度で実施した。本試験で 158 μ g/プレートの用量まで生育阻害がみられなかったことから、次のプレインキュベーション法は、S9-Mix の非存在下と存在下でプレート法と同じ濃度で実施した。溶媒として DMSO を用いた。

Ames 試験 (プレート法)

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (Salmonella typhimurium) の 5 株を用いた。屠殺 5 日前に Aroclor 1254 を 500mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与し、薬物代謝系酵素を誘導したラット肝臓から調製した S9 の非存在及び存在の条件下で、Ames らのプレート法で変異原性を検定した。各濃度とも 3 プレートを用いた。

Ames 試験 (プレインキュベーション法)

S9-Mix 又は緩衝液 0.5mL と菌懸濁液 0.1mL、さらに検体溶液 0.1mL を試験管に加え、37°C で 20 分間インキュベーション後、軟寒天液 2mL を試験管に加えて混合し、プレート上に広げた。各濃度とも 3 プレートを用いた。

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

【結果及び考察】

表 1、2 に示したように、2 回の試験共に検体を用いた全用量において代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数に溶媒対照の 2 倍以上で、かつ用量相関性を伴った増加は認められなかった。

一方、2 回の試験とも、陽性対照として用いた NF¹⁾、CUMENE²⁾、NaN₃³⁾、4-NPDA⁴⁾では溶媒対照と比較して著明な復帰変異コロニー数の増加が認められ、また、2-AA⁵⁾は S-9 Mix を加えることにより代謝活性化され、試験に用いたすべての株に著明な復帰変異を誘起した。

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

- 1) : nitrofurantoin
- 2) : cumene hydroperoxide
- 3) : sodium azide
- 4) : 4-nitro-1,2-phenylene diamine
- 5) : 2-Aminoanthracene

[表 1]

復帰変異試験成績 (1回目:プレート法)

検体:

代謝活性化系の有無	検体濃度 (µg/プレート)	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					
		TA 100		TA 102		TA 1535		TA 98		TA 1537		
S9 Mix (-)	DMSO (溶媒対照)	78	99	142	178	7	11	11	15	7	7	
		88	(88)	180	(167)	9	(9)	11	(12)	8	(7)	
	16	78	74	187	183	11	10	13	11	6	4	
		61	(71)	165	(178)	12	(11)	11	(12)	6	(5)	
	50	79	79	172	164	10	8	11	7	9	5	
		85	(81)	183	(173)	10	(9)	16	(11)	5	(6)	
	158	60	66	173	215	7	5	8	7	7	9	
84		(70)	209	(199)	6	(6)	12	(9)	5	(7)		
500	67	103	161	209	9	8	12	6	5	7		
	99	(90)	202	(191)	7	(8)	11	(10)	6	(6)		
1581	50 B	55 B	177	150	9	5	12	12	2	4		
	63 B	(56)	195	(174)	9	(8)	12	(12)	2	(3)		
5000	42 B	40 B	79	67	4	3	8	4	1 B	2 B		
	46 B	(43)	80	(75)	6	(4)	5	(6)	1 B	(1)		
S9 Mix (+)	DMSO (溶媒対照)	84	80	188	176	8	8	29	22	8	6	
		74	(79)	162	(175)	10	(9)	20	(24)	6	(7)	
	16	97	88	271	259	11	10	15	23	6	6	
		74	(86)	273	(268)	11	(11)	20	(19)	5	(6)	
	50	72	73	232	251	14	11	11	20	5	7	
		74	(73)	307	(263)	12	(12)	25	(19)	6	(6)	
	158	63	56	219	233	12	21	13	14	7	3	
64		(61)	270	(241)	9	(11)	16	(14)	8	(6)		
500	94	79	196	216	7	10	18	20	7	5		
	85	(86)	201	(204)	9	(9)	16	(18)	7	(6)		
1581	70	79	195	249	5	10	15	14	5	4		
	77	(75)	233	(226)	7	(7)	23	(17)	5	(5)		
5000	66 B	64 B	129	109	6	4	6	12	3 B	3 B		
	70 B	(67)	159	(132)	6	(5)	9	(9)	3 B	(3)		
陽性対照	S-9 Mixを必要としないもの	名称	NF	CUMENE	NaN ₃	4-NPDA	4-NPDA					
		(µg/プレート)	0.2	50	10	0.5	10					
陽性対照	S-9 Mixを必要とするもの	コロニー数/プレート	227	204	343	325	508	548	134	108	96	100
			217	(216)	318	(329)	541	(532)	124	(122)	82	(93)
陽性対照	S-9 Mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA					
		(µg/プレート)	3	3	3	3	3					
陽性対照	S-9 Mixを必要とするもの	コロニー数/プレート	871	860	576	467	232	176	1052	943	92	66
			832	(854)	447	(497)	185	(198)	927	(974)	50	(69)

(数値) : 平均値

B : 背景細菌叢の減少

[表 2]

復帰変異試験成績 (2回目: プレインキュベーション法)

検体:

代謝活性化系の有無	検体濃度 (µg/プレート)	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				
		TA 100		TA 102		TA 1535		TA 98		TA 1537		
S9 Mix (-)	DMSO (溶媒対照)	66	77	227	233	11	9	13	12	7	5	
		85	(76)	198	(219)	11	(10)	13	(13)	5	(6)	
	16	92	72	208	252	12	7	20	14	5	6	
		91	(85)	195	(218)	8	(9)	16	(17)	8	(6)	
	50	81	71	208	179	11	7	14	13	8	9	
		94	(82)	190	(192)	13	(10)	20	(16)	4	(7)	
	158	68	60	186	176	8	7	10	16	5	7	
	80	(69)	190	(184)	8	(8)	12	(13)	8	(7)		
500	84	78	153	154	8	11	11	8	4	5		
	86	(83)	163	(157)	7	(9)	12	(10)	5	(5)		
1581	64	92	139	151	6	6	9	9	3	3		
	63	(73)	177	(156)	3	(5)	8	(9)	4	(3)		
5000	29 B	31 B	57	45	4 B	6 B	5 B	2 B	B			
	12 B	(24)	53	(52)	3 B	(4)	9 B	(5)				
S9 Mix (+)	DMSO (溶媒対照)	105	88	264	255	9	10	18	19	7	7	
		93	(95)	267	(262)	9	(9)	26	(21)	8	(7)	
	16	73	83	290	283	14	9	22	20	8	3	
		89	(82)	290	(288)	11	(11)	24	(22)	6	(6)	
	50	79	81	275	312	8	6	20	14	5	6	
		93	(84)	324	(304)	6	(7)	14	(16)	5	(5)	
	158	72	65	263	261	6	4	19	17	5	5	
	82	(73)	254	(259)	6	(5)	19	(18)	4	(5)		
500	75	78	263	290	4	7	22	18	5	6		
	77	(77)	309	(287)	8	(6)	15	(18)	9	(7)		
1581	90	84	289	235	9	5	24	19	8	9		
	77	(84)	274	(266)	6	(7)	24	(22)	4	(7)		
5000	29 B	63 B	108	100	5 B	3 B	8	15	B			
	64 B	(52)	84	(97)	3 B	(4)	11	(11)				
陽性対照	S-9 Mix	名称	NF	CUMENE	NaN ₃	4-NPDA	4-NPDA					
	を必要とするもの	(µg/プレート)	0.2	50	10	0.5	10					
		コロニー数/プレート	245	244	485	449	470	569	123	121	131	107
			237	(242)	457	(464)	535	(525)	145	(130)	155	(131)
	S-9 Mix	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA					
	を必要とするもの	(µg/プレート)	3	3	3	3	3					
	コロニー数/プレート	1112	1148	493	522	175	139	1074	956	152	160	
		1078	(1113)	522	(512)	162	(159)	922	(984)	103	(138)	

(数値) : 平均値

B : 背景細菌叢の減少

代謝物：

の細菌を用いた復帰突然変異性試験

(毒性資料 No. 代謝物-5)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 2001年 2月 1日

検体の純度：

試験系： 細菌 (サルモネラ菌) TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537

【試験方法】

まず、プレート法を用いて S9-Mix の非存在下と存在下で、0、16、50、158、500、1581、5000 μ g/プレートの濃度で実施した。本試験では 16 μ g/プレートの用量で生育阻害がみられず、また 16 μ g/プレート以上の用量では検体の菌株特異的な抗菌作用は弱かった。従って、次のプレインキュベーション法は、S9-Mix の非存在下と存在下でプレート法と同じ濃度で実施した。溶媒として DMSO を用いた。

Ames 試験 (プレート法)

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (Salmonella typhimurium) の 5 株を用いた。屠殺 5 日前に Aroclor 1254 を 500mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与し、薬物代謝系酵素を誘導したラット肝臓から調製した S9 の非存在及び存在の条件下で、Ames らのプレート法で変異原性を検定した。各濃度とも 3 プレートを用いた。

Ames 試験 (プレインキュベーション法)

S9-Mix 又は緩衝液 0.5mL と菌懸濁液 0.1mL、さらに検体溶液 0.1mL を試験管に加え、37°C で 20 分間インキュベーション後、軟寒天液 2mL を試験管に加えて混合し、プレート上に広げた。各濃度とも 3 プレートを用いた。

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

【結果及び考察】

表 1、2 に示したように、2 回の試験共に検体を用いた全用量において代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数に溶媒対照の 2 倍以上で、かつ用量相関性を伴った増加は認められなかった。

一方、2 回の試験とも、陽性対照として用いた NF¹⁾、CUMENE²⁾、NaN₃³⁾、4-NPDA⁴⁾では溶媒対照と比較して著明な復帰変異コロニー数の増加が認められ、また、2-AA⁵⁾は S-9 Mix を加えることにより代謝活性化され、試験に用いたすべての株に著明な復帰変異を誘起した。

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

- 1) : nitrofurantoin
- 2) : cumene hydroperoxide
- 3) : sodium azide
- 4) : 4-nitro-1,2-phenylene diamine
- 5) : 2-Aminoanthracene

[表 1]

復帰変異試験成績 (1回目: プレート法)

検体:

代謝活性化系の有無	検体濃度 (µg/プレート)	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				
		TA 100		TA 102		TA 1535		TA 98		TA 1537		
S9 Mix (-)	DMSO (溶媒対照)	92	100	233	228	8	7	17	25	9	11	
		83	(92)	235	(232)	10	(8)	29	(24)	8	(9)	
	16	75	92	222	235	8	5	31	30	9	12	
		78	(82)	219	(225)	10	(8)	45	(35)	9	(10)	
	50	82	94	234	231	6	8	25	32	9	9	
		72	(83)	227	(231)	9	(8)	40	(32)	7	(8)	
	158	69	71	213	246	7	10	39	36	7	9	
68		(69)	210	(223)	7	(8)	28	(34)	5	(7)		
500	79	91	197	219	8	12	32	31	4	8		
	102	(91)	216	(211)	6	(9)	44	(36)	9	(7)		
1581	97	103	224	224	14	8	40	33	10	6		
	84	(95)	220	(223)	5	(9)	41	(38)	13	(10)		
5000	46	101	197	210	5	9	32	31	5	6		
	71	(73)	185	(197)	4	(6)	37	(33)	10	(7)		
S9 Mix (+)	DMSO (溶媒対照)	108	103	233	235	12	10	37	43	12	9	
		111	(107)	202	(223)	12	(11)	42	(41)	13	(11)	
	16	133	96	123	222	12	8	40	44	13	11	
		113	(114)	151	(165)	10	(10)	38	(41)	11	(12)	
	50	103	91	207	255	7	8	33	31	14	8	
		100	(98)	255	(239)	12	(9)	30	(31)	9	(10)	
	158	105	127	276	164	13	8	52	39	12	11	
88		(107)	314	(251)	7	(9)	39	(43)	11	(11)		
500	128	113	265	288	11	7	44	48	8	3		
	115	(119)	270	(274)	13	(10)	38	(43)	9	(7)		
1581	93	63	174	138	7	9	33	31	8	10		
	106	(87)	140	(151)	9	(8)	21	(28)	11	(10)		
5000	90	118	203	125	10	16	28	8	8	5		
	88	(99)	116	(148)	8	(11)	8	(15)	2	(5)		
陽性対照	S-9 Mix を必要とするもの	名称	NF	CUMENE	NaN ₃	4-NPDA	4-NPDA					
		(µg/プレート)	0.2	50	10	0.5	10					
陽性対照	S-9 Mix を必要とするもの	コロニー数/プレート	227	170	275	307	671	647	221	193	125	122
			195	(197)	326	(303)	575	(631)	252	(222)	95	(114)
陽性対照	S-9 Mix を必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA				
		(µg/プレート)	3	3	3	3	3	3				
陽性対照	S-9 Mix を必要とするもの	コロニー数/プレート	1032	992	589	424	163	193	1238	1383	236	210
			977	(1000)	585	(533)	181	(179)	1434	(1352)	148	(198)

(数値) : 平均値

B : 背景細菌叢の減少

[表 2]

復帰変異試験成績 (2回目: プレインキュベーション法)

検体:

代謝活性化系の有無	検体濃度 (µg/プレート)	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			
		TA 100		TA 102		TA 1535		TA 98		TA 1537	
S9 Mix (-)	DMSO (溶媒対照)	86	95	279	262	12	8	21	27	8	9
		112	(98)	251	(264)	12	(11)	24	(24)	7	(8)
	16	111	89	250	306	14	11	24	16	8	3
		84	(95)	283	(280)	8	(11)	20	(20)	10	(7)
	50	86	90	297	282	14	13	15	25	5	7
		97	(91)	264	(281)	10	(12)	28	(23)	3	(5)
	158	96	101	273	291	10	12	29	31	5	5
	99	(99)	250	(271)	6	(9)	19	(26)	9	(6)	
500	81	100	251	251	12	5	29	26	6	3	
	105	(95)	267	(256)	10	(9)	40	(32)	7	(5)	
1581	75	112	272	252	10	10	29	28	10	6	
	89	(92)	282	(269)	11	(10)	27	(28)	8	(8)	
5000	93	101	272	261	15	14	27	25	5	4	
	97	(97)	252	(262)	8	(12)	13	(22)	9	(6)	
S9 Mix (+)	DMSO (溶媒対照)	99	90	296	292	13	11	33	36	9	8
		85	(91)	240	(276)	11	(12)	40	(36)	7	(8)
	16	74	84	297	302	13	11	44	43	5	5
		81	(80)	298	(299)	14	(13)	33	(40)	6	(5)
	50	92	94	335	298	9	17	29	38	10	9
		77	(88)	286	(306)	9	(12)	30	(32)	9	(9)
	158	88	90	264	321	14	15	40	32	4	7
	103	(94)	351	(312)	13	(14)	43	(38)	6	(6)	
500	129	97	298	332	10	13	37	38	9	6	
	100	(109)	324	(318)	17	(13)	33	(36)	6	(7)	
1581	111	124	160	165	17	13	45	44	9	4	
	85	(107)	296	(207)	14	(15)	36	(42)	7	(7)	
5000	106	93	314	219	12	8	32	43	10	11	
	115	(105)	333	(289)	9	(10)	36	(37)	7	(9)	
陽性対照	S-9 Mix	名称	NF	CUMENE	NaN ₃	4-NPDA	4-NPDA				
	を必要としなもの	(µg/プレート)	0.2	50	10	0.5	10				
		コロニー数/プレート	361 317	493 507	513 498	206 185	187 132				
			300 (326)	418 (473)	434 (482)	185 (192)	165 (161)				
	S-9 Mix	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA				
	を必要とするもの	(µg/プレート)	3	3	3	3	3				
	コロニー数/プレート	1781 1622	639 630	199 182	1335 1613	275 273					
		1893 (1765)	675 (648)	196 (192)	1464 (1471)	245 (264)					

(数値) : 平均値

B: 背景細菌叢の減少

代謝物： の細菌を用いた復帰突然変異性試験
(毒性資料 No. 代謝物-6)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 2001年 1月 30日

検体の純度：

試験系： 細菌 (サルモネラ菌) TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537

【試験方法】

まず、プレート法を用いて S9-Mix の非存在下と存在下で、0、16、50、158、500、1581、5000 μ g/プレートの濃度で実施した。本試験で 40 μ g/プレートの用量まで生育阻害がみられなかったことから、次のプレインキュベーション法は、S9-Mix の非存在下と存在下で 0、5、10、20、40、80、160、320 μ g/プレートの濃度で実施した。溶媒としてエタノールを用いた。

Ames 試験 (プレート法)

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (Salmonella typhimurium) の 5 株を用いた。屠殺 5 日前に Aroclor 1254 を 500mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与し、薬物代謝系酵素を誘導したラット肝臓から調製した S9 の非存在及び存在の条件下で、Ames らのプレート法で変異原性を検定した。各濃度とも 3 プレートを用いた。

Ames 試験 (プレインキュベーション法)

S9-Mix 又は緩衝液 0.5mL と菌懸濁液 0.1mL、さらに検体溶液 0.1mL を試験管に加え、37 $^{\circ}$ C で 20 分間インキュベーション後、軟寒天液 2mL を試験管に加えて混合し、プレート上に広げた。各濃度とも 3 プレートを用いた。

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

【結果及び考察】

表 1、2 に示したように、2 回の試験共に検体を用いた全用量において代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数に溶媒対照の 2 倍以上で、かつ用量相関性を伴った増加は認められなかった。

一方、2 回の試験とも、陽性対照として用いた NF¹⁾、CUMENE²⁾、NaN₃³⁾、4-NPDA⁴⁾では溶媒対照と比較して著明な復帰変異コロニー数の増加が認められ、また、2-AA⁵⁾は S-9 Mix を加えることにより代謝活性化され、試験に用いたすべての株に著明な復帰変異を誘起した。

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

- 1) : nitrofurantoin
- 2) : cumene hydroperoxide
- 3) : sodium azide
- 4) : 4-nitro-1,2-phenylene diamine
- 5) : 2-Aminoanthracene

[表 1]

復帰変異試験成績 (1回目: プレート法)

検体:

代謝活性化系の有無	検体濃度 (µg/プレート)	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				
		TA 100		TA 102		TA 1535		TA 98		TA 1537		
S9 Mix (-)	エタノール (溶媒対照)	95	113	210	207	11	12	27	26	5	7	
		82	(97)	211	(209)	14	(12)	41	(31)	7	(6)	
	16	90	92	204	171	12	12	42	30	8	6	
		86	(89)	185	(187)	13	(12)	27	(33)	5	(6)	
	50	112	79	197	193	8	7	30	34	6 B	6 B	
		89	(93)	240	(210)	13	(9)	40	(35)	8 B	(7)	
	158	83 B	55 B	199	193	13 B	9 B	26	26	8 B	7 B	
	64 B	(67)	171	(188)	8 B	(10)	23	(25)	5 B	(7)		
500	42 B	36 B	152 B	149 B	B		18 B	11 B	B			
	45 B	(41)	153 B	(151)			16 B	(15)				
1581	0	0	108 B	97 B	0	0	B		0	0		
	0	(0)	92 B	(99)	0	(0)			0	(0)		
5000	0	0	60 B	37 B	0	0	0	0	0	0		
	0	(0)	36 B	(44)	0	(0)	0	(0)	0	(0)		
S9 Mix (+)	エタノール (溶媒対照)	102	111	235	222	15	10	47	38	12	13	
		106	(106)	233	(230)	12	(12)	40	(42)	13	(13)	
	16	123	116	210	188	12	9	45	51	9	9	
		119	(119)	222	(207)	12	(11)	52	(49)	7	(8)	
	50	124	104	242	244	14	6	38	37	12 B	13 B	
		105	(111)	220	(235)	6	(9)	33	(36)	13 B	(13)	
	158	102	100	230	188	8 B	12 B	39	33	12 B	12 B	
	108	(103)	199	(206)	15 B	(12)	42	(38)	14 B	(13)		
500	78 B	57 B	176 B	136 B	10 B	9 B	35 B	29 B	7 B	6 B		
	45 B	(60)	185 B	(166)	B	(10)	28 B	(31)	3 B	(5)		
1581	B		122 B	117 B	B		B		0	0		
			122 B	(120)					0	(0)		
5000	B		51 B	29 B	0	0	0	0	0	0		
			21 B	(34)	0	(0)	0	(0)	0	(0)		
陽性対照	S-9 Mix を必要としな いもの	名称	NF	CUMENE	NaN ₃	4-NPDA	4-NPDA					
		(µg/プレート)	0.2	50	10	0.5	10					
	S-9 Mix を必要とする もの	コロニー数 /プレート	281	283	305	331	609	608	194	223	103	96
			284	(283)	329	(322)	582	(600)	189	(202)	89	(96)
	S-9 Mix を必要とする もの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA				
		(µg/プレート)	3	3	3	3	3	3				
S-9 Mix を必要とする もの	コロニー数 /プレート	1792	1791	578	501	232	243	1507	1567	527	414	
		1643	(1742)	483	(521)	226	(234)	1514	(1529)	348	(430)	

(数値) : 平均値

B : 背景細菌叢の減少

[表 2]

復帰変異試験成績 (2回目: プレインキュベーション法)

検体:

代謝活性化系の有無	検体濃度 (µg/プレート)	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				
		TA 100		TA 102		TA 1535		TA 98		TA 1537		
S9 Mix (-)	エタノール (溶媒対照)	103	89	253	199	10	10	42	42	13	8	
		118	(103)	232	(228)	6	(9)	47	(44)	13	(11)	
	5	103	95	229	237	5	9	59	52	9	11	
		105	(101)	264	(243)	7	(7)	47	(53)	13	(11)	
	10	104	118	200	242	13	9	52	57	6	8	
		102	(108)	237	(226)	5	(9)	44	(51)	11	(8)	
	20	116	118	249	268	10	11	47	74	9	16	
		88	(107)	228	(248)	6	(9)	38	(53)	6	(10)	
40	84	79	199	187	7	11	49	41	14 B	6 B		
	85	(83)	175	(187)	11	(10)	34	(41)	13 B	(11)		
80	37 B	28 B	77 B	56 B	B		13 B	26 B	B			
	47 B	(37)	36 B	(56)			22 B	(20)				
160	B		44 B	84 B	B		17 B	11 B	B			
			57 B	(62)			15 B	(14)				
320	B		111 B	32 B	B		B		B			
			61 B	(68)								
S9 Mix (+)	エタノール (溶媒対照)	123	128	224	235	12	12	50	52	13	16	
		129	(127)	174	(211)	14	(13)	51	(51)	12	(14)	
	5	124	104	231	205	15	11	55	68	9	14	
		129	(119)	216	(217)	10	(12)	62	(62)	18	(14)	
	10	119	97	228	220	11	10	61	64	11	13	
		113	(110)	213	(220)	12	(11)	56	(60)	9	(11)	
	20	116	118	237	229	10	10	58	58	8	15	
		88	(107)	216	(227)	9	(10)	67	(61)	13	(12)	
40	84	79	257	257	13	11	52	51	8 B	13 B		
	85	(83)	282	(265)	16	(13)	58	(54)	13 B	(11)		
80	37 B	28 B	273	243	11	13	51	60	17 B	15 B		
	47 B	(37)	222	(246)	13	(12)	51	(54)	12 B	(15)		
160	B		177	194	4 B	7 B	16 B	30 B	B			
			192	(188)	5 B	(5)	29 B	(25)				
320	B		175 B	149 B	B		19 B	17 B	B			
			186 B	(170)			11 B	(16)				
陽性対照	S-9 Mix	名称	NF	CUMENE	NaN ₃	4-NPDA	4-NPDA					
	を必要	(µg/プレート)	0.2	50	10	0.5	10					
	としな	コロニー数	301	325	401	415	608	555	211	221	162	139
	いもの	/プレート	319	(315)	408	(408)	574	(579)	242	(225)	139	(147)
	S-9 Mix	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA				
	を必要	(µg/プレート)	3	3	3	3	3	3				
とする	コロニー数	1550	1455	481	452	239	239	1134	1023	405	351	
もの	/プレート	1412	(1472)	448	(460)	272	(250)	1228	(1128)	372	(376)	

(数値) : 平均値

B : 背景細菌叢の減少