

(6) 繁殖毒性及び催奇形性

①ピリダリルのラットにおける繁殖性試験

(資料 6-1)

試験機関：財団法人 残留農薬研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：2002 年

検 体：ピリダリル原体

純 度： %

試験動物：Sprague-Dawley 系 (Crj:CD (SD)) ラット、1 群当り雄 24 匹、雌 24 匹

投与開始時 5 週齢、体重範囲；雄 133~145 g、雌 112~125 g

試験期間：2000 年 7 月 11 日 P 世代投与開始

2001 年 4 月 13 日 F2 世代児動物最終剖検

投与期間：P 世代； 交配の 10 週間前から F1 児動物の離乳まで

F1 世代； 交配の 10 週間前（離乳時）から F2 児動物の離乳まで

F2 世代； 雌，離乳時から剖検までの約 5 週間

投与方法：検体を 0, 40, 200 または 1000 ppm の濃度で混合した飼料を自由に摂取させた。飼料は 2~4 週間に 1 度調製し、使用時まで低温、暗所で保存した。なお、対照群の動物には基礎飼料のみを同様に摂取させた。

[用量設定根拠]

方法及び試験項目：概要を以下の表にまとめた。

試験の概要

世代	期間 (週)	作業手順	試験項目
P	育成 (10)	一般状態及び死亡の有無の観察(投与期間中毎日) 体重及び摂餌量測定 (投与期間中原則として毎週)	一般状態, 死亡 体重, 体重増加量, 摂餌量, 検体摂取量 食餌効率
	交配 (2)	性周期観察 (交配前少なくとも3週間) 雌雄1対1で交配, 陰垢中の精子で	性周期の長さ, 正常 性周期の出現率 交尾成立までの日数, 交尾率
	妊娠 (3)		
	出産 哺育 (3)	出産状況の観察 (哺育0日) 出産児の生死, 性, 外表観察, 生存(哺育0,4,21日)の観察, 体重測定 (哺育0,4,7,14,21日), 死亡児の剖検 同腹児数調整 (生後4日, 雌雄各4匹) 選抜されなかった4日齢児の剖検 生後21日	出産率, 妊娠期間 産児数, 児の一般状態, 死亡, 性比, 生存率, 体重 剖検所見 剖検所見
	離乳	F1親動物の選抜 (各腹各性1匹または2匹を選抜) 選抜されなかったF1離乳児の剖検 P親動物の剖検, 臓器重量測定, 精子検査, 病理組織学的検査 (卵胞数を含む)	剖検所見, 臓器重量 剖検所見, 着床数, 臓器重量, 精子数, 運動率形態, 病理組織学的所見(卵胞数を含む) 包皮分離, 腔開口
F1	育成 (10) 交配 (2) 妊娠 (3)	性成熟の観察 (雄35日齢, 雌27日齢から) (兄妹交配は避けた) (P親動物及びF1児動物に準ずる)	(P親動物及びF1児動物に準ずる)
	出産 哺育 (3) 離乳	一般状態及び死亡の有無の観察(投与期間中毎日)	一般状態, 死亡 体重, 摂餌量 腔開口
F2	育成 (5)	体重及び摂餌量測定 (投与期間中毎週) 性成熟の観察 (雌27日齢から) 剖検, 子宮重量測定	剖検所見, 子宮重量

P 及び F1 親動物：

一般状態及び死亡；

各動物の一般状態及び死亡について毎日少なくとも 1 回（妊娠 21 日から分娩完了までは 2 回）ケージの外から観察した。体重測定時には、詳細な身体検査を行った。

体重；

雄の体重を投与開始日、交配前育成期間中と繁殖期間中は毎週、及び剖検日に測定した。雌の体重を投与開始日、交配前育成期間中は毎週、繁殖期間中は妊娠 0、7、14、20 日と哺育 0、4、7、14、21 日及び剖検日に測定した。交尾しなかった雌及び出産しなかった雌は、それぞれ交配期間終了日及び交尾後 25 日に、その後は毎週及び剖検日に測定した。

体重増加量；

雄は、投与開始時の体重を基準値として、交配前育成期間中、繁殖期間中及び剖検日の体重増加量を各々算出した。

雌は、投与開始時、妊娠 0 日及び哺育 0 日の体重を基準値として、交配前育成期、妊娠期及び哺育期の各期間中の体重増加量を各々算出した。剖検日の体重増加量は、投与開始時の体重を基準値として算出した。

摂餌量；

哺育 4 日の雌を除いて、体重測定日に飼料の給与量と残量を測定し、飼料総消費量を給与日数で除して各動物の 1 日当りの摂餌量（g/rat/日）を算出した。哺育期間中の摂餌量については、母動物と児動物によって消費された総量として表した。交配期間中は雌雄とも摂餌量を測定しなかった。

検体摂取量；

各投与群の雌雄親動物それぞれについて、交配前育成期間および繁殖期間中の検体摂取量（mg/kg/日）を次の式から週ごとに求めた。

$$\text{検体摂取量 (mg/kg/日)} = \frac{\text{平均摂餌量 (g/rat/日)} \times \text{投与量 (ppm)}}{\text{平均体重 (g)}}$$

食餌効率；

交配前育成期間中及び繁殖期間中の各群の平均食餌効率を平均摂餌量に対する平均体重増加量の割合（%）として算出した。

交配及び妊娠の確認；

雌を同群の雄と 1 対 1 で同居させて交配を行った。F1 動物については、兄妹交配を避けた。同居後、膣栓または膣垢中の精子を認めた場合に交配成立と判断した（膣栓／精子確認日＝妊娠 0 日）。妊娠の有無を分娩、また子宮内の着床痕によって確認した。

繁殖性に関する指標；

育成、交配、妊娠及び哺育の各期間と剖検時に以下の指標について調べた。

性成熟；F1 雄の包皮分離について 35 日齢から、F1 雌の膣開口について 27 日齢からそれぞれ完了するまで観察した。包皮分離または膣開口が完了した時点の動物の体重を測定した。

性周期；交配前に少なくとも3週間、各雌から腔垢を採取し、発情の周期性と性周期の長さを調べた。各雌の性周期の長さは、発情の第1日から次の発情の前日までの平均日数として表した。正常性周期は、発情前期または発情期の腔垢像を示した雌の百分率として表した。但し、発情前期または発情期の腔垢像を7日以上示す雌は正常とはみなさなかった。

交配成立までの期間；雌雄を同居後、腔栓または腔垢中の精子が確認されるまでの日数として表した。

交尾率（％）＝（交尾を認めた雄(雌)数／交配に用いた雄(雌)数）×100

受胎率（％）＝（妊娠雌数／交尾を認めた雌数）×100

出産率（％）＝（正常出産雌数／妊娠雌数）×100

1匹以上の生存児を出産したものを正常出産とした。

妊娠期間；交尾成立日（妊娠0日）から分娩完了日（哺育0日）までの期間を日数で表した。

着床数；剖検時に各雌の子宮内の着床痕を数えた。

精子検査；精巢の精子頭部数は精巢から精子頭部を採取し、血球計算盤を用いて測定した。精子頭部数は、精巢当り及び精巢1g当りの数として表した。精巢上体の精子の数、運動性及び形態は精巢上体尾部から精子を採取し、数と運動性については精子自動解析装置を用いて計測し、形態は10%中性緩衝ホルマリンで固定後、顕微鏡で観察した。精子数は、精巢上体尾部当り及び精巢上体尾部1g当りの数として表した。精子の運動性は、自動性を示す精子の百分率を精子運動率として表した。精子の形態は、各雄で観察した200個当りの正常形態精子の百分率として表した。

病理学的検査；

剖検所見；雄は交尾した雌が児を出産した後に、雌は児動物が離乳した後に性周期の段階を調べ、発情休止期または発情後期の腔垢像を示しているものを安楽死させて、体表、すべての体孔ならびに頭蓋腔、胸腔及び腹腔とそれらの内容物を含む各動物の全身を肉眼で検査した。

試験途中で死亡または瀕死状態のため安楽死させた動物についても、発見後速やかに剖検して、すべての病理学的所見を記録した。

臓器重量；最終剖検時まで生存した全親動物の以下の臓器を秤量した。脳、下垂体、甲状腺、肺、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、卵巣、子宮、精巢、精巢上体、精囊（凝固腺含む）及び前立腺。臓器重量は、絶対重量と体重比重量の両方で表した。腎臓、副腎、卵巣、精巢および精巢上体については、両側の平均値として表した。精巢を除く臓器、腔及び肉眼的に変化の認められた臓器または組織は10%中性緩衝ホルマリン液で固定して保存した。精巢はFSA液（ホルマリン－ショ糖－酢酸混合液）で固定した。試験途中で死亡または瀕死状態のため安楽死させた動物については、上記の臓器または組織を固定して保存したが、重量は測定しなかった。

病理組織学的所見；対照群と高用量群において児の得られた雌雄各10匹を無作為に選抜して、以下の臓器を病理組織学的に検査した。下垂体、甲状腺、副腎及び

生殖器官（卵巢，卵管，子宮，膣，精巣，精巣上体，精嚢，凝固腺または前立腺）。また，標的臓器である肺及び肝臓も病理組織学的に検査した。精巣は精子形成の異常について精査した。

F1雌親動物の卵巢については原始卵胞数の測定も行った。また，すべての群において交配不成立あるいは児の得られなかった交配ペアの雌雄，及び1腹の全哺育児が死亡した母動物について，下垂体，副腎及び生殖器官を病理組織学的に検査した。

また，1000 ppm群で甲状腺，肺及び卵巢に病理組織学的異常が認められたため，全親動物のこれらの臓器を病理組織学的に検査した。

F1 及び F2 児動物：

一般状態及び死亡；

哺育期間中毎日，ケージの外から児動物を観察した。また，体重測定の際に詳細な外表検査を行った。

産児数；

哺育 0 日における生存児と死亡児の合計として表した。

性比；

哺育 0 日に雌雄の児数を記録し，次式から求めた。性比＝総雄産児数／総産児数

生存率；哺育 0，4 及び 21 日における生存率を次の式から求めた。

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

哺育 4 日の生存率 (%)＝(哺育 4 日の生存児数／哺育 0 日の生存児数) × 100

哺育 21 日の生存率 (%)＝(哺育 21 日の生存児数／生後 4 日に選抜した児数) × 100

体重；

各腹について哺育 0，4，7，14 及び 21 日に児動物の体重を測定した。哺育 0 日は雌雄別に腹ごとに，哺育 4 日の選抜後は個体別に体重を測定し，それらの値から腹当りの平均体重を求めた。また，母動物を標本単位として各群の平均値を算出した。

肛門生殖突起間距離；

200 及び 1000 ppm 群において F1 雌の膣開口日が高値であったため，F2 全児動物の肛門生殖突起間距離を哺育 0 日に測定した。肛門生殖突起間距離は，各腹の雌雄別に絶対値及び体重の 3 乗根に対する相対値として表し，それらの値から各群の平均値を求めた。

剖検所見；

哺育 4 日の哺育児数調整時に選抜されなかった哺育児はその日に，F1 世代の親動物に選抜されなかった F1 離乳児と性成熟の観察用に選抜されなかった F2 離乳児はそれぞれ 26 日齢で剖検した。哺育期間中に死亡した児動物は，発見後速やかに剖検した。

臓器重量；

各腹で雌雄それぞれ 1 匹（同腹児のなかに片方の性がない場合は他方の性のみ 1 匹）について，脳，脾臓，胸腺及び子宮を測定した。また，1000 ppm 群の F2 離乳児雄において胸腺重量（絶対および相対）の低値が認められたことから，F2 離乳児

のうち、対照群および1000 ppm 群の雄児各10例の胸腺を病理組織学的検査に供した。

腔開口観察のため選抜されたF2雌：

一般状態及び死亡；

毎日少なくとも1回ケージの外から観察した。また、体重測定の際に詳細な身体検査を行った。

体重；

選抜日、その後は毎週及び剖検日に測定した。

摂餌量；

体重測定日に各ケージについて飼料の給与量と残量を測定し、1口当りの摂餌量（g/rat/口）を算出した。

性成熟；

腔開口について27日齢から毎日観察し、完了日を確認した。腔開口の完了時に体重を測定した。

病理学的検査

剖検；約8週齢で性周期を調べ、発情前期の腔垢像を示しているものを剖検した。

臓器重量；選抜された全F2雌の子宮を秤量し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定して保存した。

結果：概要を以下の表に示す。

結果：

世代		親：P 児：F1				親：F1 児：F2				
投与量 (ppm)		0	40	200	1000	0	40	200	1000	
動物数	雄	24	24	24	24	24	24	24	24	
	雌	24	24	24	24	24	24	24	24	
親動物	一般状態		検体投与に起因する異常は認められなかった							
	死亡数	雄	0	0	0	1	0	1	0	0
		雌	0	0	0	0	1	0	0	0
	体重	雄	—	有意差なし	↓第2,3,9,10週, ↓第4,7,8週, ↓第5,6週	↓第16週 ↓第1-15週	—	有意差なし	有意差なし	↓第5,11,12週, ↓第6-10週
		雌	—	有意差なし	有意差なし	↓第4,8,9週, 妊娠20日,哺育4,14日	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし
	体重増加量	雄	—	有意差なし	↓第1,10,11週, ↓第2-4,7-9週, ↓第5,6週	↓第1-16週	—	有意差なし	有意差なし	↓第11,12週, ↓第5-10週
		雌	—	有意差なし	有意差なし	↓第1-3,5-10週, ↑哺育21日 ↓第4週	—	有意差なし	有意差なし	↑妊娠20日 ↓第1週 ↑哺育21日
	摂餌量	雄	—	有意差なし	↓第1-3,8週, ↓第4,5,7週, ↓第6週	↓第14,15週 ↓第9,10週 ↓第1-8週	—	有意差なし	有意差なし	↓第5,7週
		雌	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし	—	有意差なし	↓妊娠7-14日	↑哺育7-14日
	検体摂取量 ^a (mg/kg/日)	雄	—	2.80	13.78	68.7	—	3.40	16.96	83.7
		雌	—	3.11	15.7	79.1	—	3.62	18.3	91.4
食餌効率 ^a (%)	雄	21.21	20.97	20.93	20.33	27.56	27.19	26.91	26.66	
	雌	12.81	13.67	12.69	12.18	19.53	19.49	18.73	19.49	

太枠内は検体の影響であることを示す。—:対照群。

a: 交配前育成期間 (10 週間) の平均

Dunnett の多重比較法：体重，体重増加量，摂餌量

Fisher の直接確立計算法：一般状態

↑↓: $P \leq 0.05$, ↑↓: $P \leq 0.01$, ↓↓: $P \leq 0.001$ で対照群と比較して統計学的に有意差あり。

結果（続き）：

世代			親：P 児：F1				親：F1 児：F2			
投与量 (ppm)			0	40	200	1000	0	40	200	1000
親動物	臓器重量 ^a	脳								
		雄 A(mg)	2227	2183	2212	2177	2157	2143	2170	2152
		R(%)	0.398	0.392	0.412	↑0.425	0.363	0.361	0.376	0.387
		雌 A(mg)	1989	1964	2010	1982	1946	1961	1976	↑2014
		R(%)	0.667	0.652	0.684	0.687	0.620	0.626	↑0.656	0.646
		中甲状腺								
		雄 A(mg)	30.8	32.3	30.0	30.2	30.0	30.4	31.5	32.4
		R(%)	0.00546	0.00576	0.00560	0.00584	0.00504	0.00509	0.00541	↑0.00578
		雌 A(mg)	23.2	23.3	23.8	25.8	22.9	22.7	22.2	25.2
		R(%)	0.00778	0.00774	0.00812	↑0.00891	0.00730	0.00725	0.00737	0.00807
		肺								
		雄 A(mg)	2034	1950	1951	1835	2015	2025	2063	2184
		R(%)	0.360	0.350	0.361	0.356	0.336	0.337	0.354	0.391
		雌 A(mg)	1403	1555	1570	1562	1507	1607	1460	1789
		R(%)	0.469	0.517	0.529	↑0.542	0.482	0.514	0.486	0.571
		肝臓								
		雄 A(mg)	20016	19675	18692	↓18424	23362	22670	22653	22187
		R(%)	3.54	3.51	3.46	3.58	3.86	3.76	3.86	3.94
		雌 A(mg)	13427	13287	13392	13163	14788	15186	13441	14994
		R(%)	4.49	4.39	4.53	4.55	4.69	4.82	4.44	4.80
		脾臓								
		雄 A(mg)	834	837	836	↓731	907	881	863	↓785
		R(%)	0.149	0.150	0.154	0.143	0.151	0.147	0.149	0.140
		雌 A(mg)	607	611	622	562	633	625	627	651
		R(%)	0.203	0.202	0.211	0.194	0.201	0.199	0.208	0.208
		腎臓								
		雄 A(mg)	1630	1632	1620	1604	1779	1770	1806	1752
		R(%)	0.290	0.292	0.300	↑0.312	0.297	0.295	0.310	↑0.313
		雌 A(mg)	1103	1083	1077	1083	1182	1185	1144	1189
		R(%)	0.369	0.358	0.366	0.375	0.375	0.378	0.379	0.380
		精巣								
		雄 A(mg)	1716	1666	1741	1711	1754	1800	↑1849	↑1889
		R(%)	0.3071	0.2990	0.3234	↑0.3342	0.2970	0.3027	0.3193	↑0.3394
		精巣上体								
		雄 A(mg)	683	683	700	684	685	677	692	693
		R(%)	0.1222	0.1225	0.1301	↑0.1335	0.1155	0.1137	0.1195	0.1247
		精囊								
		雄 A(mg)	2490	2577	2507	2401	2388	2489	2591	2583
		R(%)	0.444	0.462	0.467	0.470	0.405	0.418	0.448	↑0.465
		卵巣								
		雌 A(mg)	55.1	56.7	58.8	↑61.2	57.0	57.4	↑64.0	↑69.5
		R(%)	0.01847	0.01878	0.01995	↑0.02123	0.01818	0.01836	↑0.02117	↑0.02224

太枠内は検体の影響であることを示す。

a 平均数, A 絶対重量, R 体重比重量

Dunnett の多重比較法：臓器重量

↑ ↓: $P \leq 0.05$, ↑ ↓: $P \leq 0.01$, ↑ ↓: $P \leq 0.001$ で対照群と比較して統計学的に有意差あり。

結果（続き）：

世代		親：P 児：F1				親：F1 児：F2			
投与量 (ppm)		0	40	200	1000	0	40	200	1000
親動物	原始卵胞数 ^a					384			462
	剖検所見	検体投与に起因する異常は認められなかった							
	病理組織学的所見：								
	甲状腺小型濾胞増加								
	雄	1/24	2/24	2/24	2/24	3/24	2/24	2/24	3/24
	雌	1/23	2/24	0/24	↑7/24	1/23	3/23	2/24	↑7/24
	卵巣間質腺細胞空胞化								
	雌	1/23	1/24	0/24	6/24	1/23	0/23	0/24	↑8/24

太枠内は検体の影響であることを示す。斜線:未測定。

^a 平均

Fisher の直接確率計算法：剖検所見，病理組織学的所見

t 検定：原始卵胞数

↑: $P \leq 0.05$ で対照群と比較して統計学的に有意差あり。

結果（続き）：

世代		親：P 兄：F1				親：F1 兄：F2			
投与量 (ppm)		0	40	200	1000	0	40	200	1000
親動物	繁殖能力								
	雄								
	包皮分離								
	口齢 ^a					41.9	42.1	42.5	41.5
	体重 ^a					202.3	196.0	196.8	↓185.5
	交尾率(%)	100.0	100.0	100.0	100.0	95.7	100.0	100.0	100.0
	精子頭部数	211	204	218	202	231	235	247	248
	($\times 10^6$) ^{a,b}	133	128	134	127	143	141	144	142
	精子数	259	250	293	293	254	255	255	278
	($\times 10^6$) ^{a,c}	746	703	829	868	743	757	747	821
	精子運動率(%) ^a	70.6	75.2	↑76.8	75.4	77.2	78.6	76.1	78.5
	正常形態精子(%) ^a	97.8	98.8	↑99.2	99.0	98.8	98.7	96.6	98.5
	雌								
	腔開口								
	H 齢 ^a					29.0	29.8	↑31.0	↑31.1
	体重 ^a					90.5	93.8	94.8	94.4
	性周期の長さ(日) ^a	4.2	4.4	4.2	4.3	4.3	4.4	4.1	4.4
	交配成立までの日数 ^a	2.9	2.8	2.7	2.5	2.9	3.9	2.5	3.1
	正常性周期(%)	100.0	100.0	100.0	95.8	100.0	100.0	100.0	100.0
	交尾率(%)	100.0	100.0	100.0	100.0	95.7	100.0	100.0	100.0
	受胎率(%)	91.7	95.8	91.7	100.0	95.5	91.7	95.8	100.0
	出産率(%)	100.0	100.0	100.0	100.0	95.2	100.0	100.0	100.0
	妊娠期間(日) ^a	22.2	22.1	22.0	22.0	22.4	22.1	↓22.0	↓22.0
	着床数 ^a	15.9	16.0	15.6	14.8	13.3	15.7	15.2	16.5

太枠内は検体の影響であることを示す。斜線：未測定。

a 平均,

b 上段は精巣当りの精子頭部数，下段は精巣 1 g 当りの精子頭部数

c 上段は精巣上体尾部当りの精子数，下段は精巣上体尾部 1 g 当りの精子数

Dunnett の多重比較法：包皮分離日体重，腔開口日体重，精子頭部数，精子数，着床数

Fisher の直接確立計算法：交尾率，受胎率，出産率，正常性周期

Mann-Whitney の U 検定：包皮分離日，腔開口日，精子運動率，正常形態精子，性周期の長さ，交配成立までの日数，妊娠期間

↑↓: $P \leq 0.05$, ↑↓: $P \leq 0.01$, ↑↓: $P \leq 0.001$ で対照群と比較して統計学的に有意差あり。

結果（続き）：

世代		親：P 児：F1				親：F1 児：F2			
投与量 (ppm)		0	40	200	1000	0	40	200	1000
児動物	一般状態	検体投与に起因する異常は認められなかった							
	産児数 ^a	14.4	14.9	14.4	13.5	12.7	14.4	14.0	15.3
	性比 (%) ^b	0.485	0.526	0.498	0.502	0.444	0.492	0.512	0.499
	生存率 (%)								
	哺育0日	98.8	99.2	98.9	97.9	98.4	96.7	98.0	98.0
	哺育4日	98.6	99.5	97.5	98.9	94.4	94.1	95.8	99.5
	哺育21日	99.4	100	99.4	100	100	99.4	100	99.5
	体重 (g) ^a								
	雄 生後 0日	6.4	6.2	6.4	6.3	6.8	6.4	6.4	↓6.1
	生後 4日 ^b	10.4	10.0	10.0	10.0	11.3	10.4	10.5	10.2
	生後 7日	17.4	17.0	16.5	16.6	18.8	17.6	17.6	↓17.1
	生後14日	35.1	34.5	33.4	34.0	38.8	37.6	36.8	37.4
	生後21日	58.5	56.8	↓53.5	↓52.9	63.8	61.8	↓59.2	↓57.9
	雌 生後 0日	6.1	5.9	6.0	5.9	6.3	6.1	6.1	5.9
	生後 4日 ^b	9.9	9.7	9.5	9.6	10.9	10.0	9.9	9.8
	生後 7日	16.6	16.4	15.7	15.8	18.2	17.1	16.9	↓16.4
	生後14日	33.8	33.3	32.4	32.7	37.6	36.7	↓35.3	36.2
	生後21日	55.9	54.6	↓51.3	↓50.5	60.4	59.3	↓56.4	↓55.8
	肛門生殖突起間距離 ^a (哺育0日)								
	絶対値 (mm)					2.88	2.84	2.86	2.81
	相対値					0.93	0.95	0.94	0.95
	雄 絶対値 (mm)					1.524	1.532	1.544	1.536
	雌 絶対値 (mm)					0.503	0.518	0.514	0.530
	体重 ^a (g)					6.8	6.4	6.4	↓6.1
	雄 体重 ^a (g)					6.3	6.1	6.1	5.9
	剖検所見	検体投与に起因する異常は認められなかった							
	臓器重量 ^a ：								
	脳								
	雄 A (mg)	1553	1517	1526	1521	1593	1577	1571	1569
	R (%)	1.86	1.90	↑2.06	↑2.11	1.83	1.86	↑1.94	↑2.00
	雌 A (mg)	1491	1467	1474	1467	1527	1521	1525	1510
	R (%)	1.97	2.00	↑2.15	↑2.22	1.89	1.93	↑2.04	↑2.07
	胸腺								
	雄 A (mg)	312	301	↓261	↓251	351	342	↓297	↓280
	R (%)	0.371	0.375	0.350	0.345	0.401	0.403	0.364	↓0.354
	雌 A (mg)	311	282	↓257	↓239	337	320	299	↓283
	R (%)	0.410	0.380	0.371	0.360	0.414	0.405	0.399	0.386
	病理組織学的雄検査：胸腺					異常なし			異常なし
	雌検査：胸腺								

太枠内は検体の影響であることを示す。斜線：未測定。

a 平均, b 産数調整前

A 絶対重量, R 体重比重量

Dunnett の多重比較法：産数, 体重, 肛門生殖突起間距離, 臓器重量

Fisher の直接確立計算法：性比

Mann-Whitney の U 検定：一般状態, 生存率, 剖検所見

↑↓: $P \leq 0.05$, ↓: $P \leq 0.01$, ↑↓: $P \leq 0.001$ で対照群と比較して統計学的に有意差あり。

結果（続き）：

世代	選抜されたF2雌			
投与量 (ppm)	0	40	200	1000
動物数	18	20	23	24
一般状態	検体投与に起因する異常は認められなかった			
死亡	0	0	0	0
体重	-	↑第5週	有意差なし	有意差なし
摂餌量	-	↑第3週	有意差なし	↑第2,3週
腔開口				
日齢 ^a	29.6	29.5	30.3	↑31.3
体重 ^a	95.4	98.2	97.5	↑104.6
剖検所見	検体投与に起因する異常は認められなかった			
子宮重量 ^a				
A(mg)	612	634	690	597
R(%)	0.312	0.301	0.339	0.291

太枠内は検体の影響であることを示す。

-: 対照群

a 平均

A 絶対重量, R 体重比重量

Dunnett の多重比較法：体重, 摂餌量, 腔開口H体重, 臓器重量

Fisher の直接確立計算法：一般状態

Mann-Whitney の U検定：腔開口

↑: $P \leq 0.05$, ↑↑: $P \leq 0.01$ で対照群と比較して統計学的に有意差あり。

P及びF1親動物において、200 ppm群でP雄の体重、体重増加量及び摂餌量が主に交配前育成期間中に有意に低下した。剖検で卵巢（F1雌の絶対と体重比）と精巣（F1雄の絶対）の重量が有意に増加したが、病理組織学的にはこれらの臓器に異常は認められなかった。1000 ppm群で影響はより明らかとなり、P及びF1雄とP雌の体重、P及びF1雌雄の体重増加量ならびにP及びF1雄の摂餌量が有意に低下した。臓器重量の測定で、甲状腺（P雌とF1雄の体重比）、卵巢（P及びF1雌の絶対と体重比）、肺（P雌の体重比）ならびに精巣（P雄の体重比、F1雄の絶対と体重比）の重量が有意に増加した。なお、有意差の認められた精巣および卵巢の絶対重量は、いずれも背景データの範囲内あるいは若干上回る程度の変化であった（絶対重量の背景データは、精巣：1627-1875 mg、卵巢：45.3-67.9 mg）。病理組織学的検査で、1000 ppm群のP及びF1雌の甲状腺に小型濾胞増加の出現頻度の有意な増加とP及びF1雌の卵巢に間質腺細胞の空胞化の出現頻度の増加（F1雌で有意差あり）が認められた。しかし、卵巢の原始卵胞数は対照群とほぼ同じであった。甲状腺の変化は、ラットでの90日間亜急性経口毒性試験及び慢性毒性・発がん性併合試験において観察されていないことから、経産雌に特有な現象である可能性が考えられた（中略）。一方、肺（P雌）、甲状腺（F1雄）及び精巣（P及びF1雄）の臓器重量に統計学的な有意差がみられたが、病理組織学的な異常はみられず、これら臓器重量の変化の毒性学的意味は明らかでなかった。なお、その他の臓器に

においても絶対あるいは体重比重量に統計学的な差が認められたが、いずれも体重の低値に起因した変化と考えられた。

親動物の繁殖指標に関して、F1雌の200及び1000 ppm群において腔開口が有意に遅延したが、完了日の平均体重に有意差はみられなかった。一方、F2世代の1000 ppm群では、腔開口時の体重の有意な増加を伴う腔開口の遅延が認められた。しかしながら、いずれの投与群の腔開口日も背景データの範囲（29.6～31.5日）内であり、さらに子宮重量、性周期、妊娠状態、分娩及び哺育にも異常はみられないことから、雌の繁殖に及ぼす影響は非常に軽微なものであったことが示唆される^{中諸者註2)}。一方、1000 ppm群で、包皮分離完了時のF1雄の平均体重が軽度ではあるものの、統計学的に有意に低かった。しかし、包皮分離完了の平均日齢は対照群とほぼ同じであった。これらの雄の妊性、精子検査時の所見及び精巢の病理組織学的所見にも異常は認められなかったことから、包皮分離日体重の軽度の低値に毒性学的意味はないと思われる。なお、妊娠期間の短縮がF1世代の200及び1000 ppm群でみられたが、背景データの範囲内（22.0～22.6日）であることから、明らかな検体投与との関連はないと考えられた。

F1及びF2児動物については、200及び1000 ppm群で体重が有意に減少した。胸腺^{中諸者註3)}および脳重量において変化が認められたが、いずれも体重の低値に起因した変化と考えられた。また、胸腺の病理組織学的検査に異常はみられなかった。その他、臨床所見、剖検所見、F2児の肛門生殖突起間距離及び臓器重量など他の指標に検体投与に関連する変化は観察されなかった。また、40 ppm群の児動物に検体投与の影響はなかった。

以上の結果から、親動物の一般毒性学的影響に関する無毒性量は40 ppm（雄：平均3.10 mg/kg/日（2.80～3.40 mg/kg/日）、雌：平均3.37 mg/kg/日（3.11～3.62 mg/kg/日））であり、繁殖能力及び児動物に対する無毒性量は各々40 ppm（雄：平均3.10 mg/kg/日（2.80～3.40 mg/kg/日）、雌：平均3.37 mg/kg/日（3.11～3.62 mg/kg/日））であった。

中諸者註1 甲状腺小型濾胞について：

1000ppm群において甲状腺小型濾胞の増加(P雌、F1雌)が有意に認められたが、次の点を考慮すると当該所見は毒性学的に重篤な変化ではないと考えられた。

- (1) 本所見は対照群でもみられている変化である。
- (2) 有意差の認められた高用量群(1000 ppm)においても児動物の脳重量ならびに生存性などに影響はみられなかった。
- (3) 妊娠動物において、甲状腺機能が亢進すると胎児体重および胎盤重量の増加がみられ、機能低下すると胎児体重の低値がみられるといわれている(Kumar R and Chaudhuri B. N., 1989)が、ピリダリル原体を高用量投与(250 mg/kg/day;本試験の1000ppmより高用量)したラット催奇形性試験(資料6-2)では、胎児体重ならびに胎盤重量には影響は認められなかった。

(4) 従って、P雌、F1雌でみられた甲状腺の変化について、その発生機序は明らかではないが、妊娠動物の甲状腺機能に重篤な影響を及ぼしているとは考えられなかった。

尚、ラットに3500 ppm（雄：232 mg/kg/day、雌：253 mg/kg/day）という高用量を3ヶ月間投与した試験、ならびに2年間にわたり1000 ppm（雄：34.3 mg/kg/day、雌：42.8 mg/kg/day）を投与した試験においても甲状腺に異常がみられなかったことから、ピリダリルは甲状腺に対し直接的な作用は及ぼすものではないと考えられる。

引用文献：

Kumar R and Chaudhuri B. N., Altered maternal thyroid function: Fetal and neonatal development of rat, *Ind. J. Physiol. Pharmac.*, **33**, 233-238 (1989)

申請者註2 ピリダリルは*in vitro*ラット性ホルモン生合成系に対する影響検討試験（資料9-2）の結果、 17β -HSD活性の阻害を介した非常に弱いテストステロン生合成阻害活性を有することが判明した。しかし、アロマトーゼやエストラジオール生合成の阻害は $30\mu\text{M}$ という高濃度でも認められなかった。また、ラットを用いた4週間投与によるホルモン検討試験（資料9-3）の結果、高用量（2000ppm群、雄で94.9mg/kg/day、雌で102.2mg/kg/day）においても、テストステロンおよびエストラジオールの血中濃度に影響は認められなかった。以上のことから、今回認められた腔開口の遅延はエストラジオール等のホルモン変動を介した変化である可能性は低いと考えられた。

申請者註3 200 ppm以上の群で胸腺の絶対重量の低値がみられたほか、1000 ppm群のF2雄児では体重比重量の低値が認められた。ラットの成獣および児動物において、体重増加抑制がみられた場合、体重の増加抑制よりも胸腺重量の増加抑制の程度の方がより大きくなることが知られている（Oishi et al., 1979; Menendez-Patterson et al., 1987）。また、当試験のF2雄児および一般毒性試験において、胸腺の病理組織学的検査に異常がみられないことから、S-1812が胸腺に対し直接的に作用するものではないと考えられる。したがって、今回認められた胸腺重量の低値は、児体重の低値に関連した二次的な変化であると考えられた。

引用文献：

Oishi, S. et al., The effect of food restriction for 4 weeks on common toxicity parameters in male rats, *Toxicol. Appl. Pharm.*, **47**, 15-22 (1979)

Menendez-Patterson A. et al., Malnutrition in rats during pregnancy and lactation period: A study on body, spleen and thymus weights and hematologic parameters in dams and their offspring, *Rev. Esp. Fisiol.*, **43**, 287-296 (1987)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学工業株式会社にある。

②ピリダリルのラットにおける催奇形性試験

(資料 6-2)

試験機関 財団法人 残留農業研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：2001 年

検 体：ピリダリル原体

純 度： %

供試動物：Sprague-Dawley 系 (Crj:CD (SD)) ラット, 1 群当り雌 24 匹
(入荷時 12 週齢, 体重 210~270 g)

試験期間：2001 年 5 月 28 日 交配開始
2001 年 6 月 22 日 最終帝王切開

投与方法：検体をコーンオイルに溶解し, 0 (対照), 10, 50 または 250 mg/kg/日の投与量で妊娠 6 日から 19 日までの 14 日間, 1 日 1 回経口投与した (腔栓/精子確認日=妊娠 0 日)。なお, 対照群の動物にはコーンオイルのみを同様に投与した。投与容量は体重 1 kg あたり 1 mL とし, 最新体重に基づいて算出した。

観察・検査項目：

母動物：一般状態及び死亡について毎日少なくとも 1 回 (投与期間中は 1 日 2 回) 観察して所見を記録した。各動物の体重を妊娠 0, 6, 9, 12, 15, 18 及び 20 日に測定した。妊娠 20 日の体重から妊娠子宮重量を減じて補正体重を算出した。妊娠 9, 12, 15, 18 及び 20 日の各体重から妊娠 6 日の体重を減じて体重増加量を算出した。また, 補正体重値から妊娠 6 日の体重値を減じて補正体重増加量を算出した。各体重測定日間の飼料総消費量を日数で除して 1 日当りの摂餌量を算出した。妊娠 20 日に, 母動物を安楽死させて剖検し, 妊娠の成否と肉眼による病理学的変化について調べた。卵巣と子宮を摘出して, 卵巣については妊娠黄体数, 子宮については妊娠子宮重量, 着床数, 死亡胚・胎児数, 生存胎児数及び胎盤重量を記録した。

胎児：各生存胎児の性を判定して性比を算出するとともに, 体重を測定し, 外表の異常について肉眼で検査した。各腹約半数の胎児を Stuckhardt と Poppe の未固定内臓検査法に従って胸部及び腹部内臓の, 頭部は, ブアン液で固定した後に Wilson 法に準じて軟組織の奇形及び変異についてそれぞれ調べた。各腹の残り約半数の胎児は, エタノールで固定した後, アリザリン・レッド S とアルシアン・ブルーで骨・軟骨の二重染色を施し, 骨格の奇形及び変異について検査した。

結果：概要を次ページ以下の表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学工業株式会社にある。

結果：

母動物：

投与量 (mg/kg/日)		0	10	50	250
1 群当り雌動物数		24	24	23 ^b	24
死亡雌動物数		0	0	0	0
非妊娠動物数		0	0	0	1
妊娠動物数		24	24	23	23
生存胎児のある雌動物数		24	24	23	23
一般状態：脱毛		0/24	3/24	↑4/23	↑4/23
体重		—	有意差なし	有意差なし	↓妊娠 15 日
補正体重 ^a (g)		318	320	313	310
体重増加量		—	有意差なし	↓妊娠 15, 18 日	↓妊娠 9～20 日
補正体重増加量 ^a (g)		22	21	15	↓9
摂餌量		—	有意差なし	有意差なし	↓妊娠 6-9, 9-12, 12-15 日
剖検所見：脱毛		0/24	3/24	↑4/23	↑4/23
妊娠子宮重量 ^a (g)		82	83	81	79
着床所見	妊娠黄体数 ^a	18.1	18.3	18.0	18.7
	着床数 ^a	16.3	16.2	15.4	16.0
	着床前胚死亡率 ^a (%)	9.0	10.9	13.2	13.1
	胚・胎児死亡率 ^a (%)	7.7	5.2	5.8	11.3
	生存胎児数 ^a	15.1	15.3	14.5	14.1
	性比	0.494	0.505	0.483	0.462
	胎児体重 ^a (mg)：雄	3497	3506	3681	3574
	雌	3326	3341	3484	3443
胎盤重量 ^a (mg)		524	511	519	532
検査胎児 (腹) 数		362(24)	368(24)	333(23)	325(23)
奇形胎児のある腹数 (%)		6(25.0)	↓1(4.2)	↓0(0.0)	2(8.7)
変異胎児のある腹数 (%)		15(62.5)	15(62.5)	11(47.8)	14(60.9)

太枠内は検体の影響であることを示す。—：対照群

^a 平均

^b 妊娠 20 日の剖検において、1 例の雌動物で挿管ミスによると思われる胸腹内臓器の癒着がみられたことから、この動物を評価から除外した。

着床前胚死亡率 (%) = (黄体数 - 着床数) × 100 / 黄体数

胚・胎児死亡率 (%) = (胚・胎児死亡数 / 着床数) × 100

性比 = 総雄胎児数 / 総生存胎児数

Dunnett の多重比較検定法：体重、補正体重、体重増加量、補正体重増加量、摂餌量、黄体数、着床数、生存胎児数、妊娠子宮重量、胎児体重、胎盤重量

カイ二乗検定または Fisher の直接確率計算法：一般状態、剖検所見、奇形および変異胎児を有する腹数、性比

Mann-Whitney の U 検定：着床前胚死亡率、胚・胎児死亡率

↑↓：p ≤ 0.05, ↓：p ≤ 0.01 で対照群と比較して統計学的に有意差あり

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学工業株式会社にある。

結果：(続き)

胎児；

投与量 (mg/kg/日)	0	10	50	250
外表奇形：				
検査胎児（腹）数	362(24)	368(24)	333(23)	325(23)
小下顎	0(0)	1(1)	0(0)	1(1)
臍帯ヘルニア	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
合計	0(0)	2(1)	0(0)	1(1)
内臓奇形：				
検査胎児（腹）数	174(24)	179(24)	162(23)	156(23)
内臓逆位	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
水頭	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
肺低形成	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
肺葉癒合（右葉）	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
肺葉欠損（中葉）	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
横隔膜ヘルニア	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
合計	3(3)	0(0)	0(0)	0(0)
内臓変異：				
検査胎児（腹）数	174(24)	179(24)	162(23)	156(23)
胸腺頸部残留	15(10)	10(7)	10(7)	↓1(↓1)
腎盂拡張	0(0)	1(1)	0(0)	1(1)
左臍動脈	1(1)	0(0)	0(0)	2(2)
合計	16(11)	11(8)	10(7)	↓4(4)
骨格奇形：				
検査胎児（腹）数	188(24)	189(24)	171(23)	169(23)
小下顎骨	0(0)	1(1)	0(0)	1(1)
外後頭骨および第1頚椎椎弓の癒合	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
肋軟骨分岐	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
胸椎体ダンベル状軟骨	2(2)	0(0)	0(0)	1(1)
合計	3(3)	1(1)	0(0)	2(2)
骨格変異：				
検査胎児（腹）数	188(24)	189(24)	171(23)	169(23)
頸肋	1(1)	0(0)	0(0)	2(2)
過剰肋骨	6(5)	6(5)	5(4)	6(6)
短小肋骨	0(0)	0(0)	2(2)	2(2)
波状肋骨	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
肋骨欠損（第13肋骨）	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
胸椎体二分骨化	4(2)	1(1)	2(1)	4(4)
胸椎体ダンベル状骨化	3(3)	3(3)	4(4)	4(4)
腰椎弓未骨化	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
仙椎前椎骨数 25	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
合計	12(9)	11(8)	10(6)	17(13)

カイ二乗検定または Fisher の直接確率計算法：奇形および変異の出現頻度

↓： $p \leq 0.05$ ，↓↓： $p \leq 0.01$ で対照群と比較して統計学的に有意差あり

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学工業株式会社にある。

母動物への影響は、50 及び 250 mg/kg 群で認められた。50 mg/kg 群で、体重増加量が妊娠 15 日と 18 日に有意に抑制された。250 mg/kg 群で、妊娠 15 日の体重、投与期間を通した体重増加量、補正体重増加量ならびに妊娠 6～9 日、9～12 日及び 12～15 日の摂餌量に有意な低値がみられた。これらの群で投与期間中または投与終了後の期間中、また剖検時に脱毛の出現頻度が有意に高かった（それぞれ 4/23 例、17.4%；背景値は 0.0～16.7%）が、脱毛はこの種の試験で通常みられる所見であることから、検体投与との関連は明らかでなかった。10 mg/kg 群では、検査したどの指標にも影響はみられなかった。

帝王切開では、卵巣と子宮またそのほかの臓器にも投与に関連する異常は何も認められなかった。妊娠子宮重量、黄体数、着床数及び着床前胚死亡率は、いずれの投与群においても、対照群とほぼ同じであった。

胎児に関しては、いずれの投与群においても生存胎児数、胚・胎児死亡率、胎児体重、胎盤重量及び性比に影響はみられなかった。生存胎児の外表、内臓及び骨格の奇形と変異の出現頻度に、検体投与に関連する増加はなかった。

以上の結果から、母動物の一般毒性学的影響に関する無毒性量は 10 mg/kg/日、次世代に対する無毒性量は 250 mg/kg/日であった。また、胚・胎児致死作用及び催奇形作用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住友化学工業株式会社にある。

③ピリダリルのウサギにおける催奇形性試験

(資料 6-3)

試験機関 財団法人 残留農薬研究所

[GLP 対応]

報告書作成年 2001 年

検 体：ピリダリル原体
純 度： %

供試動物：日本白色種 (Kbl:JW) ウサギ, 1 群当り雌 25 匹 (高用量群は 30 匹)
(入荷時 17 週齢, 体重 3.60~3.70 kg)

試験期間：2001 年 2 月 12 日 交配開始
2001 年 3 月 16 日 最終帝王切開

投与方法：検体をコーンオイルに懸濁し, 0 (対照), 15, 50 または 150 mg/kg/日の投与量で妊娠 6 日から 27 日までの 22 日間, 1 日 1 回経口投与した (人工授精日=妊娠 0 日)。なお, 対照群の動物にはコーンオイルのみを同様に投与した。投与容量は体重 1 kg あたり 0.5 mL とし, 最新体重に基づいて算出した。

観察・検査項目：

母動物：一般状態及び死亡について毎日少なくとも 1 回 (投与期間中は投与の前後にそれぞれ少なくとも 1 回) 観察して所見を記録した。死亡または流産動物は, 発見後速やかに剖検した。体重は妊娠 0, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 及び 28 日に測定した。妊娠 28 日の体重から妊娠子宮重量を減じて補正体重を算出した。妊娠 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 及び 28 日の各体重から妊娠 6 日の体重を減じて体重増加量を算出した。また, 補正体重値から妊娠 6 日の体重値を減じて補正体重増加量を算出した。妊娠 0 日から 27 日までの 3 日間隔と妊娠 27~28 日に, 各測定日間の飼料総消費量を日数で除して 1 日当りの摂餌量を算出した。妊娠 28 日に, 母動物を安楽死させて剖検し, 妊娠の成否と肉眼による病理学的変化について調べた。卵巣と子宮を摘出して, 卵巣については妊娠黄体数, 子宮については妊娠子宮重量, 着床数, 胚・胎児死亡数, 生存胎児数及び胎盤重量を記録した。

胎児：各生存胎児の体重を測定し, 外表の異常について肉眼で検査した。各胎児について, Stuckhardt と Poppe の末固定内臓検査法に従って胸部と腹部の内臓を検査した。その際内部生殖器官を観察して性を判定し, 性比を算出した。各腹で約半数の胎児の頭部をブアン液で固定した後に, Wilson 法に準じて頭部軟組織の奇形及び変異について調べた。各腹残り約半数の胎児の頭部は, 剥皮して眼と脳の断面を検査した。すべての胎児 (ブアン液で固定した頭部を除く) をエタノールで固定した後, アリザリン・レッド S とアルシアン・ブルーで骨・軟骨の二重染色を施し, 骨格の奇形及び変異について検査した。

結果：概要を次ページ以下の表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学工業株式会社にある。

結果：

母動物；

投与量 (mg/kg/日)	0	15	50	150
人工授精実施雌動物数	25	25	25	30
死亡雌動物数	0	0	0	1 (妊娠 26 日)
生存雌動物数	25	25	25	29
非妊娠雌動物数	0	0	1	1
全胚・胎児死亡雌動物数	1	1	2	1
流産雌動物数	0	0	0	3
早産雌動物数	0	0	0	1
生存胎児のある雌動物数	24	24	22	23
一般状態：脱毛	0/24	1/24	↑4/22	2/25
体重	-	有意差なし	有意差なし	有意差なし
補正体重 ^a (g)	3641	3667	3608	3521
体重増加量	-	有意差なし	有意差なし	↓妊娠 18,24 日 ↓妊娠 15,21,28 日
補正体重増加量 ^a (g)	-212	-197	-246	-363
摂餌量	-	有意差なし	有意差なし	↓妊娠 12-15,18-21 日
剖検所見：脱毛	0/24	1/24	↑4/22	2/24
妊娠子宮重量 ^a (g)	416	410	407	364
着床所見	検査腹数	24	24	22
	妊娠黄体数 ^a	10.8	10.4	10.9
	着床数 ^a	8.4	8.3	8.8
	着床前胚死亡率 ^a (%)	22.5	19.7	19.5
	胚・胎児死亡率 ^a (%)	9.0	9.8	13.5
	生存胎児数 ^a	7.6	7.5	7.9
	検査腹数	24	24	22
	性比	0.516	0.497	0.509
	胎児体重 ^a (g)：雄 雌	38.0 37.6	37.6 37.5	35.9 36.9
	胎盤重量 ^a (mg)	5538	5561	5593
検査胎児 (腹) 数	182(24)	181(24)	173(22)	174(23)
奇形胎児のある腹数 (%)	3(12.5)	5(20.8)	2(9.1)	4(17.4)
変異胎児のある腹数 (%)	22(91.7)	20(83.3)	20(90.9)	23(100.0)

太枠は検体の影響であることを示す。－：対照群

^a 平均

着床前胚死亡率 (%) = (黄体数 - 着床数) × 100 / 黄体数

胚・胎児死亡率 (%) = (胚・胎児死亡数 / 着床数) × 100

性比 = 総雄胎児数 / 総生存胎児数

Dunnett の多重比較検定法：体重増加量，摂餌量，黄体数，着床数，生存胎児数，妊娠子宮重量，胎児体重，胎盤重量

カイ二乗検定または Fisher の直接確率計算法：一般状態，剖検所見，奇形および変異胎児を有する腹数，性比

Mann-Whitney の U 検定：着床前胚死亡率，胚・胎児死亡率

↑↓：p ≤ 0.05, ↓：p < 0.01 で対照群と比較して統計学的に有意差あり

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学工業株式会社にある。

結果：(続き)

胎児：

投与量 (mg/kg/H)	0	15	50	150
外表奇形：				
検査胎児（腹）数	182(24)	181(24)	173(22)	174(23)
頭頂部皮膚菲薄化	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
部分的眼瞼開存	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
鉤爪欠損	0(0)	0(0)	1(1)	1(1)
合計	0(0)	0(0)	1(1)	2(2)
内臓奇形：				
検査胎児（腹）数	182(24)	181(24)	173(22)	174(23)
水頭症	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
第四脳室拡張	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
合計	0(0)	0(0)	1(1)	1(1)
内臓変異：				
検査胎児（腹）数	182(24)	181(24)	173(22)	174(23)
胸腺頸部残留	12(9)	8(6)	9(4)	14(9)
頸動脈分岐位置異常	8(3)	8(4)	14(6)	5(4)
肝臓切痕	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
合計	19(11)	16(9)	23(8)	19(11)
骨格奇形：				
頭部検査胎児（腹）数	84(24)	85(24)	80(22)	82(23)
前頭骨癒合	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
体幹・体幹部検査胎児（腹）数	182(24)	181(24)	173(22)	174(23)
胸骨分節癒合	0(0)	1(1)	0(0)	1(1)
胸骨裂	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
肋軟骨分岐	1(1)	5(4)	0(0)	0(0)
肋軟骨癒合	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
胸肋関節不整	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
腰椎半椎	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
指骨欠損	0(0)	0(0)	1(1)	1(1)
合計	2(2)	6(5)	1(1)	3(3)
骨格変異：				
検査胎児（腹）数	182(24)	181(24)	173(22)	174(23)
胸骨分節配列不整	0(0)	1(1)	1(1)	0(0)
頸肋	1(1)	1(1)	2(2)	2(2)
過剰肋骨	87(19)	72(20)	79(20)	82(22)
胸椎体ダンベル状骨化	0(0)	0(0)	0(0)	2(2)
仙椎前椎骨数 25	0(0)	2(2)	0(0)	0(0)
仙椎前椎骨数 27	10(7)	9(6)	12(8)	4(3)
腰仙部移行椎	1(1)	3(2)	1(1)	2(2)
合計	88(19)	76(20)	81(20)	86(22)

カイ二乗検定または Fisher の直接確率計算法：奇形および変異の出現頻度

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学工業株式会社にある。

母動物に及ぼす検体投与の影響は、15 及び 50 mg/kg 群において何も観察されなかった。150 mg/kg 群では、妊娠 15 日以降の体重増加量と摂餌量が減少し、殆どの値に統計学的有意差が認められた。また、母動物 5 匹に死亡、流産または早産も観察された。母動物の死亡、流産および早産は、摂餌量の著しい減少と体重減少に関連していると考えられる。

帝王切開時に、15 及び 50 mg/kg 群で影響は認められなかったが、150 mg/kg 群で、胎児体重の低値（雌のみ）が認められた。その他、投与に関連する異常は認められなかった。

生存胎児の外表、内臓および骨格検査では、いずれの投与群においても検体投与の影響はみられなかった。

以上の結果から、本剤を妊娠ウサギに投与したときの母動物の一般毒性学的影響に関する無毒性量及び次世代に対する無毒性量はいずれも 50 mg/kg/日であった。また、胚・胎児致死作用及び催奇形作用は認められなかった。

(7) 変異原性

①ピリダリルの細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料7-1)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1999年 [GLP 対応]

検体：ピリダリル原体

純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100, TA98, TA1535, TA1537 株) 及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* (WP2uvrA 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下及び非存在下で、Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。

検体は DMSO に溶解し、S-9 Mix 存在下では 39.1~1250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (純度換算値、以下同様)、S-9 Mix 非存在下では 9.77~313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲の 6 濃度で実施した。各試験は 3 連制とし、2 回行った。

用量設定根拠：4.88~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲の 6 濃度で用量設定試験を実施した。試験菌株に対して 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ まで抗菌性が認められなかった。検体の析出が S-9 Mix 存在下の 1250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、S-9 Mix 非存在下の 313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量において認められた。

以上により、検体の析出が認められた用量を最高用量とし、S-9 Mix 存在下では 1250, 625, 313, 156, 78.1 及び 39.1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、S-9 Mix 非存在下では 313, 156, 78.1, 39.1, 19.5 及び 9.77 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量を設定した。

試験結果：結果を次表に示した。

2 回の試験において検体は S-9 Mix の有無にかかわらず、検体の析出が認められた最高用量 (S-9 Mix 存在下 1250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、S-9 Mix 非存在下 313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) においても、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

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

以上の結果より、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は有しないものと判断される。

薬物	濃度 ^{a)} (μ g/ プレート)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数 ^{b)} /プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
対照 (DMSO)	0	—	107	10	17	20	6
			106	8	25	17	6
ピリダリル	9.77	—	130	7	16	16	6
			104	9	22	20	6
	19.5	—	115	6	14	18	7
			111	9	23	13	7
	39.1	—	113	8	17	21	7
			108	8	22	25	7
	78.1	—	113	8	19	21	11
			100	12	25	14	8
	156*	—	116	7	11	19	6
			115	7	22	22	7
	313*	—	122	9	17	19	9
			94	6	28	15	8
陽性対照	c)	—	811	306	139	387	880
			845	299	160	281	647
対照 (DMSO) ピリダリル	0	+	106	8	24	38	15
			91	7	36	26	14
	39.1	+	118	8	25	33	7
			86	7	36	32	11
	78.1	+	122	6	28	24	8
			102	8	35	32	14
	156	+	113	11	24	24	9
			95	8	26	27	10
	313	+	107	11	25	23	12
			107	9	39	24	9
	625		116	7	27	30	14
			98	8	30	25	9
	1250*		118	9	28	34	11
			109	6	29	34	11
陽性対照	c)	+	673	174	443	289	123
			760	200	476	285	173

a) 純度換算値

b) 3反復の平均値、上段は1回目試験、下段は2回目試験の結果を示す。

c) 陽性対照物質(μ g/プレート)：

	S-9 Mix 非存在下	S-9 Mix 存在下
TA100	2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (0.01)	2-アミノアントラセン (1)
TA1535	アジ化ナトリウム (0.5)	2-アミノアントラセン (2)
WP2uvrA	2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (0.01)	2-アミノアントラセン (10)
TA98	2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (0.1)	2-アミノアントラセン (0.5)
TA1537	9-アミノアクリジン (80)	2-アミノアントラセン (2)

*：検体の析出が認められた。

②ピリダリルのチャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHIL/TU) を用いた染色体異常試験

(資料7-2)

試験施設：住友化学工業株式会社

報告書作成年：2000 年[GLP 対応]

検 体：ピリダリル原体

純 度：

試験方法：チャイニーズハムスター肺由来の培養細胞 (CHIL/TU) を用い、薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で染色体異常誘発性を評価した。検体は DMSO に溶解して用いた。観察は 1 濃度あたり 200 個の分裂中期像について行い、試験は 3 回行った (3 回日は確認試験)。

用量設定根拠：試験 1 の S9 mix 非存在下では、被験物質の析出が認められた濃度においても顕著な増殖抑制作用は認められなかったため、溶解限界を目安として最高濃度を設定した。試験 1 の S9 mix 存在下および試験 2 では、増殖率が 50% 以下となる濃度を最高濃度に設定した。試験 3 では、試験 1 の結果に基づいて濃度を設定した。

試験結果：結果を次頁の表に示す。試験 1 (6 時間処理後 18 時間培養) の S9 mix 非存在下では染色体異常細胞 (構造異常あるいは数値異常) の出現頻度の上昇は認められなかった。S9 mix 存在下では、構造異常及び倍数体細胞の出現頻度が軽度上昇した。

試験 2 (24 及び 48 時間処理) では、被験物質は染色体異常細胞 (構造異常あるいは数値異常) の出現頻度を上昇させなかった。

試験 1 の結果確認のために行った試験 3 では、S9 mix 存在下で構造異常細胞の出現頻度が軽度上昇し、再現性が確認された。

陽性対照化合物のマイトマイシン C 及びシクロホスファミド群では、構造異常を示す細胞の出現頻度の明らかな増加が誘発された。

以上の結果から、検体は本試験条件下で、チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHIL/TU) に対して染色体異常を軽度に誘発すると結論された。

	S9 M i x 有 無	処 理 時 間 (h)	標 本 作 製 時 間 (h)	薬 物	濃 度 (μ g/ mL)	増 殖 率 (%)	観 察 細 胞 数	構造異常										数の異常		
								異常数							異常細胞(%)			判定	(%)	判定
								ギ ャ ッ プ	染色 分 体 型		染色 体 型		他	+G	-G					
									切 断	交 換	切 断	交 換								
試 験 1	無	6	24	溶媒対照 (DMSO)	1%	100	200	2	5	1	0	0	0	4.0	3.0	—	0.0	—		
				ビ ⁺ ラ ⁺ リル	20	102.9	200	1	1	0	0	0	0	1.0	0.5	—	1.0	—		
					40	104.4	200	2	2	1	0	0	0	2.5	1.5	—	0.0	—		
					80 *	103.0	200	3	3	1	0	0	0	3.0	1.5	—	0.5	—		
				陽性対照 (MMC)	0.06	101.1	200	13	50	61	0	1	0	38.0	37.0	+	0.0	—		
	有	6	24	溶媒対照 (DMSO)	1%	100	200	3	3	1	0	0	0	3.5	2.0	—	1.0	—		
				ビ ⁺ ラ ⁺ リル	15	79.1	200	1	5	6	0	1	0	5.5	5.0	±	0.5	—		
					20	51.0	200	4	11	11	0	0	1	9.0	7.5	±	4.5	—		
					25	38.4	200	2	12	1	0	1	1	7.0	6.0	±	6.5	±		
				陽性対照 (CP)	10	70.9	200	7	73	85	0	0	0	52.5	50.5	+	0.0	—		

他：10 個以上の異常を有する細胞 +G：ギャップを含む異常 -G：ギャップを除く異常

DMSO：ジメチルスルホキシド MMC：マイトマイシン C CP：シクロホスファミド

数的異常：倍数体細胞及び核内倍加細胞

判定：— 陰性（5 %未満） + 疑陽性（5 %以上 10 %未満） + 陽性（10 %以上）

*：検体の析出が認められた。

	S9 M i x 有 無	処 理 時 間 (h)	標 本 作 製 時 間 (h)	薬 物	濃 度 (μ g/ mL)	増 殖 率 (%)	観 察 細 胞 数	構造異常								数の異常			
								異常数						異常細胞(%)				(%)	判 定
								ギ ャ ッ プ	染色 分 体 型		染色 体 型		他	+G	-G	判 定			
切 断	交 換	切 断	交 換																
試 験 2	無	24	24	溶媒対照 (DMSO)	1%	100	200	1	4	0	0	0	0	2.5	2.0	—	0.5	—	
				ビ ^o リ ^o リ ^o	625 *	71.1	200	2	4	0	0	0	0	2.5	1.5	—	0.0	—	
					938 *	63.5	200	1	3	1	0	0	0	2.5	2.0	—	0.5	—	
					1250 *	44.5	200	3	6	2	0	0	0	4.5	3.5	—	0.0	—	
				陽性対照 (MMC)	0.02	86.3	200	8	46	27	0	0	0	31.0	27.5	+	0.5	—	
	無	48	48	溶媒対照 (DMSO)	1%	100	200	1	2	0	0	0	0	1.5	1.0	—	0.5	—	
				ビ ^o リ ^o リ ^o	39.1	82.0	200	1	3	0	0	0	0	2.0	1.5	—	1.0	—	
					78.1	59.9	200	0	3	0	0	0	0	1.5	1.5	—	0.0	—	
					156 *	45.8	200	1	3	0	0	0	0	2.0	1.5	—	0.0	—	
				陽性対照 (MMC)	0.02	96.4	200	7	59	46	0	1	1	37.0	36.0	+	0.0	—	
試 験 3	有	6	24	溶媒対照 (DMSO)	1%	100	200	2	4	1	0	0	0	3.0	2.0	—	0.0	—	
				ビ ^o リ ^o リ ^o	15	82.3	200	8	9	6	0	1	0	8.5	5.0	±	3.0	—	
					20	51.6	200	6	14	13	0	0	1	10.0	8.0	±	1.0	—	
					25	38.0	200	10	7	15	0	0	2	13.5	9.5	±	4.5	—	
				陽性対照 (CP)	10	66.3	200	14	103	197	0	0	1	73.5	71.0	+	0.0	—	

他：10個以上の異常を有する細胞 +G：ギャップを含む異常 -G：ギャップを除く異常

DMSO：ジメチルスルホキシド MMC：マイトマイシン C CP：シクロホスファミド

数的異常：倍数体細胞及び核内倍加細胞

判定：— 陰性（5%未満） ± 疑陽性（5%以上10%未満） + 陽性（10%以上）

*：検体の析出が認められた。

③ピリダリルのマウスを用いた小核試験

(資料7-3)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1999年 [GLP 対応]

検体：ピリダリル原体

純度：

供試動物：CD-1(ICR)系マウス (8週齢, 体重 32.8~38.1g)

1群雄5匹

試験方法：検体をコーンオイルに溶解し、500、1000及び2000mg/kgの用量で単回経口投与した。投与24時間後(500、1000及び2000mg/kg)及び48時間後(2000mg/kg)に各動物から大腿骨を採取して骨髓塗抹標本作製した。陽性対照群にはシクロホスファミド 60mg/kgを経口投与して24時間後に標本作製した。標本は、メタノールで固定後、5%ギムザ液で染色した。

各動物当たり2000個の多染性赤血球を観察し、小核を有する細胞の出現頻度を求め、1000個の赤血球(多染性赤血球及び正染性赤血球)中の多染性赤血球の割合も求めた。

用量設定根拠：1群雌雄各5匹のマウスを用いた単回投与毒性試験(500、1000、2000mg/kg)の結果、死亡はなく性差も認められなかったため、投与量を500、1000及び2000mg/kgとし、雄マウスを用いて試験を実施した。

試験結果：結果を次頁の表に示す。いずれの投与群においても死亡は認められなかった。一般症状では2000mg/kg投与群において軟便が投与後1日以内に認められた。いずれの投与群においても、溶媒対照群と比較して全赤血球に対する多染性赤血球の割合に有意な減少は認められず、小核を有する多染性赤血球の出現頻度の有意な増加も認められなかった。陽性対照であるシクロホスファミドでは、小核を有する多染性赤血球の出現頻度が溶媒対照群と比較して統計学的に有意に増加した。

以上の結果から、本試験条件下において、ピリダリルはマウス骨髓細胞に対して小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と結論した。

採取時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg)	観察 動物数	MNPCE ^{a)} (%, 平均±SD)	PCE/(PCE+NCE) ^{b)} (%, 平均±SD)
24	陰性対照 (コーンオイル)	— ^{c)}	5	0.14±0.07	52.2±8.8
	ピリダリル	500	5	0.19±0.14	51.6±7.2
		1000	5	0.14±0.12	53.7±4.4
		2000	5	0.19±0.09	52.7±3.3
	陽性対照 (シクロホスファミド [*])	60	5	3.76±0.93**	54.6±7.6
48	陰性対照 (コーンオイル)	—	5	0.18±0.08	49.0±4.3
	ピリダリル	2000	5	0.12±0.08	51.0±2.6

PCE：多染性赤血球 NCE：正染性赤血球

MNPCE：小核を有する多染性赤血球

a) 1個体につき2000個の多染性赤血球を観察した

b) 1個体につき1000個の赤血球を観察した

c) 10mL/kg

統計学的解析：小核を有する多染性赤血球の出現頻度はKastenbaum and Bowmanの方法で行い、全赤血球に対する多染性赤血球の割合についてはt検定を行った。

**p<0.01

④ピリダリルのチャイニーズハムスターの卵巣由来細胞（CHO-K1-BH4）を用いた

遺伝子突然変異試験

（資料 7-4）

試験機関：Covance Laboratories Inc.

報告書作成年：2000 年 [GLP 対応]

検 体：ピリダリル原体

純 度：

試験方法：チャイニーズハムスターの継代培養した卵巣由来細胞（CHO-K1-BH4）を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系（S-9 Mix）の存在下及び非存在下で Hsie らの方法に従って、6-チオグアニン存在下でのコロニー増殖を指標とする HGPRT 遺伝子座の遺伝子突然変異誘発性を検定した。検体は DMSO に溶解して用い、S-9 Mix 非存在下では $9.4 \sim 300 \mu\text{g/mL}$ 、S-9 Mix 存在下では $2.0 \sim 10.0 \mu\text{g/mL}$ の範囲の濃度で試験を実施した。試験は 2 連制とし、2 回行った。

用量設定根拠：用量設定のための細胞毒性試験を 2 回行った。1 回目は S-9 Mix 存在下及び非存在下とも $9.85 \sim 5000 \mu\text{g/mL}$ の範囲の 10 濃度で行った。S-9 Mix 非存在下では $5000 \mu\text{g/mL}$ まで毒性作用は認められず、検体の析出が $157 \mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で認められた。S-9 Mix 存在下では全濃度で致死作用が認められた。2 回目は S-9 Mix 非存在下では $0.590 \sim 300 \mu\text{g/mL}$ 、S-9 Mix 存在下では $0.0740 \sim 37.5 \mu\text{g/mL}$ の範囲の 10 濃度で行った。S-9 Mix 非存在下の全濃度及び S-9 Mix 存在下の $4.70 \mu\text{g/mL}$ 以下では毒性作用は認められなかった。以上の結果から、S-9 Mix 非存在下では $2.35 \sim 300 \mu\text{g/mL}$ の 8 濃度、S-9 Mix 存在下では $0.500 \sim 10.0 \mu\text{g/mL}$ の 9 濃度の用量を設定した。

試験結果：結果を次表に示した。

S-9 Mix 存在下及び非存在下の評価対象とした 6 または 7 濃度の遺伝子突然変異誘発性を検定した。2 回の試験において検体は S-9 Mix の有無にかかわらずいずれの条件においても、突然変異率を有意に増加させず、濃度依存性も認められなかった。

一方、陽性対照として用いた 5-ブromo-2'-デオキシウリジン及び 20-メチルコラントレンは、突然変異率を有意に増加させた。

以上の結果より、検体は代謝活性化存在下及び非存在下で遺伝子突然変異誘発性は有しないものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学工業株式会社にある。

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S-9 Mix の有無	突然変異 コロニー数 ^{a)}	コロニー形成率 ^{b)} (%)	突然変異 率 ^{c)} ($\times 10^{-6}$)
対照 (DMSO)	0	—	5, 5 4, 7	96.5, 86.5 110.0, 102.3	2.2, 2.4 1.5, 2.9
ヒリタリル	9.40	—	2, 1 5, 4	93.7, 103.0 89.8, 84.8	0.9, 0.4 2.3, 2.0
	18.8	—	22, 8 13, 8	118.3, 102.8 85.0, 97.2	7.7**, 3.2 6.4*, 3.4
	37.5	—	9, 2 5, 1	105.5, 101.3 104.0, 95.2	3.6, 0.8 2.0, 0.4
	75.0	—	2, 13 8, 12	119.2, 92.7 104.5, 101.5	0.7, 5.8 3.2, 4.9
	150	—	6, 10 9, 1	99.7, 98.8 109.3, 118.2	2.5, 4.2 3.4, 0.4
	300†	—	10, 8 13, 7	87.7, 104.2 130.8, 101.8	4.8, 3.2 4.1, 2.9
陽性対照 (BrdU)	50	—	248	96.8	106.7#
			228	125.3	75.8#
対照 (DMSO)	0	+	3, 1 14, 9	98.0, 119.7 116.2, 94.3	1.3, 0.3 5.0, 4.0
ヒリタリル	2.00	+	16, 1 4, 1	123.8, 98.7 99.7, 87.7	5.4**, 0.4 1.7, 0.5
	4.00	+	12, 9 4, 13	99.2, 96.5 81.0, 78.7	5.0**, 3.9* 2.1, 6.9
	5.00	+	4, 3 2, 2	125.5, 109.2 79.7, 73.5	1.3, 1.1 1.0, 1.1
	6.00	+	5, 4 18, 10	97.7, 98.5 94.0, 97.8	2.1, 1.7 8.0, 4.3
	7.00	+	4, 0 2, 9	105.7, 92.5 93.3, 78.3	1.6, 0.0 0.9, 4.8
	8.00	+	4, 14 8, 10	101.7, 98.5 81.5, 93.5	1.6, 5.9** 4.1, 4.5
	10.0	+	— 3, 5	— 91.8, 85.3	— 1.4, 2.4
陽性対照 (MCA)	5	+	386	96.0	167.5#
			284	94.7	125.0#

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学工業株式会社にある。

- a) 12 枚のプレートの合計
- b) 3 枚のプレートの平均値
- c) 突然変異率=突然変異コロニー数/(プレート数 $\times 2 \times 10^5 \times$ コロニー形成率)

注) BrdU : 5-ブロモ-2'-デオキシウリジン MCA : 20-メチルコラントレン

† : 検体の析出が認められた。

上段は 1 回目試験、下段は 2 回目試験のそれぞれ 2 反復の各結果を示す。

統計処理 (Kastenbaum Bowman 検定)

- * $p \leq 0.05$, 突然変異率 $< 15 \times 10^{-6}$
- ** $p \leq 0.01$, 突然変異率 $< 15 \times 10^{-6}$
- # (有意な増加あり) $p \leq 0.01$, 突然変異率 $\geq 15 \times 10^{-6}$

⑤ピリダリルのラット初代培養肝細胞を用いた *in vivo/in vitro* 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験

(資料 7-5)

試験施設：Covance Laboratories Inc.

報告書作成年：2000 年 [GLP 対応]

検 体：ピリダリル原体

検体純度：

供試動物：CD(SD)IGS BR 系雄ラット (体重 206~307g)

用量設定試験：1 群 3 匹, UDS 試験：1 群 4 匹

試験方法：検体をコーンオイルに溶解し 500, 1000 及び 2000mg/kg を経口投与した。投与後 2-4 または 15-16 時間に肝臓をコラゲナーゼ溶液で灌流した後に摘出して肝細胞を分離し、10%牛胎児血清を含むウィリアムズ E 培地 (WME) 中で培養した。細胞を ³H-チミジンを含む WME 中で 4 時間培養後、非標識チミジンを含む WME 中で 16-20 時間培養した。細胞を酢酸：エタノール (1:3) で固定後、写真用乳剤に浸して乳剤皮膜を形成させ、暗箱内(2-8℃)で 7-10 日間露出させた後、現像した。各群当り 3 匹の動物の標本を観察した。核内銀粒子を計数し、細胞質銀粒子数 (核に隣接した核と同じ面積の細胞質 3 ヲ所の平均銀粒子数) を差し引いて正味の核内銀粒子数を求めた。正味の核内銀粒子数の平均が対照群の平均値より核当たり 3 個以上増加した場合、及び 5 個以上の正味の核内銀粒子を有する細胞の割合が対照群の群平均値より 10%以上増加した場合を UDS 陽性とした。

用量設定根拠：200~2000mg/kg を経口投与した用量設定試験で症状及び死亡が認められなかったため、2000mg/kg を最高用量とし、以下 1000 及び 500 mg/kg を設定した。

試験結果：結果を表に示す。

2-4 時間処理ではいずれの投与群においても不定期 DNA 合成を誘発しなかった。15-16 時間処理では 1000 mg/kg 投与群において 5 個以上の正味の核内銀粒子を有する細胞の割合が 14.67%で対照群の群平均値より 10%以上増加していた。しかし、増加の程度は小さく用量相関性はなかった。一方、ジメチルニトロソアミン (DMN) 投与群では UDS 陽性の両基準を超える UDS の誘発が認められた。

以上の結果より、本試験条件下において、ラット初代培養肝細胞を用いた *in vivo/in vitro* 不定期 DNA 合成試験の結果は陰性でありピリダリルは DNA 損傷性を示さないと結論した。

肝細胞 採取時間 (hr)	化合物	投与量 (mg/kg)	正味の核内 銀粒子数の 平均 ^a	5個以上の正 味の核内銀粒 子数を有する 細胞の割合 ^a	細胞質 銀粒子数 の平均 ^a
2-4	対照	5ml/kg	-0.71	4.59	7.22
	DMN ピリダリル	10.0	12.20	65.86	6.00
		500	-0.64	6.89	8.13
		1000	-0.67	3.33	6.89
		2000	-0.94	2.67	5.62
15-16	対照	5ml/kg	-0.38	4.22	6.14
	DMN	15.0	10.11	65.78	6.07
	ピリダリル	500	0.42	5.99	4.61
		1000	1.17	14.67	6.44
		2000	0.51	10.89	7.42

a) 群平均値は3例の各平均から求め、動物の平均は各標本の平均から求めた。

対照：コーンオイル

DMN：ジメチルニトロソアミン

(8) 生体機能影響

① ピリダリルにおける一般薬理試験

(資料 8-1)

試験機関：パナファーム・ラボラトリーズ

[GLP 対応]

報告書作成年：2002 年

検 体：ピリダリル原体

純 度：

試験方法：

1) ラットの一般症状及び行動に及ぼす影響

供試動物：SD 系ラット，8 週齢，体重雄 277.1～286.9g，雌 190.9～204.3g，

1 群雌雄各 3 匹

方法：検体を希釈せずに 600 及び 2000mg/kg を経口投与した。投与前，投与後 0.5，1，2，3，4，6 及び 24 時間に Irwin の方法に準じて一般症状及び行動を観察した。対照群には 2000mg/kg と同容量の注射用水を投与した。

結果：一般症状及び行動に対し，600 及び 2000mg/kg 経口投与で検体による影響は認められなかった。

2) 麻酔イヌの呼吸数・血圧・心拍数及び心電図に及ぼす影響

供試動物：ビーグル，8 ヶ月齢，雄，体重 9.5～10.7kg，1 群 4 匹

方法：検体を希釈せずに 80，400 及び 2000mg/kg をペントバルビタール麻酔イヌに十二指腸内投与した。投与前，投与後 0.5，1，2，3，4，5 及び 6 時間において呼吸数・血圧・心拍数・心電図を測定した。対照群には 2000mg/kg と同容量の注射用水を投与した。

結果：400 及び 2000mg/kg 投与で呼吸数の増加傾向が認められた。2000mg/kg 投与で血圧の低下傾向が認められた。心電図では 80mg/kg 投与後 2 時間において QTc の有意な短縮が一過性に認められたが，投与量との関連性はなく検体に起因する変化ではなかった。心拍数は検体による影響は認められなかった。

以上により，ピリダリルは 400mg/kg 以上の十二指腸内投与で呼吸数及び血圧に影響を及ぼす可能性が示された。

「生体機能への影響に関する試験」総括表

試 験 項 目	動物種 (例数/群)	投与経路	投与量 (mg/kg)	試験成績
一般症状及び行動 (Irwin)	ラット (♂3♀3)	経口	600,2000	影響は認められなかった
呼吸数・血圧・心拍 数・心電図	イヌ(♂4)	十二指腸 内	80,400, 2000	400 及び 2000mg/kg で呼吸数の増加 傾向 2000mg/kg 投与で血圧の低下傾向 心電図及び心拍数には影響は認めら れなかった

(9) その他

①ピリダリルのER α 、ARおよびTR α を用いたレポータージーンアッセイ試験*

(資料 9-1)

試験機関 住友化学工業株式会社

[非GFP対応]

報告書作成年 2002年

試験目的：ピリダリルに各種ホルモンレセプター（エストロゲン、アンドロゲンおよび甲状腺ホルモンレセプター）に対する直接作用があるかどうかを調べる目的で、本試験を実施した。

検体純度：

実験材料：(1) 細胞 ; ヒト子宮頸部ガン由来細胞HeLa (ATCCより購入)
 (2) ER α 測定用プラスミド ; レセプター発現プラスミド (pRc-RSV-hER α コザック修正)
 レポータープラスミド (pGL3-TATA-ERE $\times$ 5)
 (3) AR測定用プラスミド ; レセプター発現プラスミド (pRc-RSV-hAR)
 レポータープラスミド (pGL3-MMTV)
 (4) TR α 測定用プラスミド ; レセプター発現プラスミド (pRc/RSV-hTR α コザック)
 レポータープラスミド (pGL3-TATA-TRE $\times$ 5-BSD)
 (5) コントロールプラスミド ; pGL3-TK-BSD

実験方法：HeLa細胞を10cmプレートに約 2×10^6 細胞播種し、FBS含有E-MEM培地で、5 %CO₂条件下37℃にて1日間培養を行った。培養後、細胞に、リポフェクトアミン (Life Technologies社製) を用いて、3.75 μ gのレセプター発現プラスミドと、3.25 μ gのレポータープラスミドを同時に導入した。TR α に関しては予めレセプター発現プラスミドとレポータープラスミドをHeLa細胞の染色体内に導入した安定形質転換細胞を用いた。コントロールアッセイは7 μ gのコントロールプラスミドを同様に導入した。導入細胞は37℃にて約16時間培養した後、培地を交換しさらに約3時間培養した。細胞を集めてFBS含有E-MEM培地に懸濁して均一化し、アゴニストの検討はDMSOで溶解した様々な濃度の被験化合物を、アンタゴニストの検討は様々な濃度の被験物質と典型ホルモン (ER α は100pMのエストラジオール：E2、ARは100pMのジヒドロテストステロン：DHT、TR α は50nMのトリヨードチロニン：T3) を同時に添加 (DMSO終濃度0.1 %) した96穴プレートに上記細胞を播種した。細胞が播種された96穴プレートは37℃にて約40時間培養した後、5倍に希釈した細胞溶解剤PGC50 (ニッポンジーン社製) を15 μ l/wellずつ加えて、時々軽くゆすりながら室温にて30分間放置して細胞を溶解させた。基質自動インジェクター付きのルミノメーターLB96p (ベルトールド社製) で50 μ l/wellずつ酵素基質液PGL100 (ニッポンジーン社製) を添加しながら直ちに発光量を5秒間測定した。

実験結果：ピリダリルのER α 、ARおよびTR α レセプターを用いた試験結果の判定は次のとおりであった。

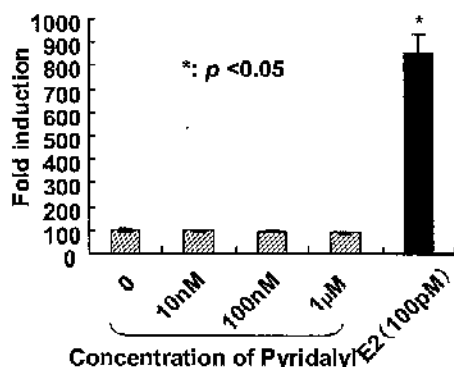
レセプター \ 判定	アゴニスト作用	アンタゴニスト作用
ER α	陰性	陰性
AR	陰性	陰性
TR α	陰性	陰性

各レセプターを用いた試験の結果は次のとおりであった。

(1) ER α を用いたレポーター遺伝子アッセイ試験

本試験において典型ホルモンE2および典型アンタゴニスト、4-ヒドロキシタモキシフェン (IITM) の作用が確認できたことから試験系は保証された(図1a)。しかしピリダリルは10 nMから1 μ Mの濃度でER α に対する転写活性への影響は認めなかった(図1b)。従って、ER α に対するアゴニストおよびアンタゴニスト作用は陰性と判定した。

a) アゴニスト



b) アンタゴニスト

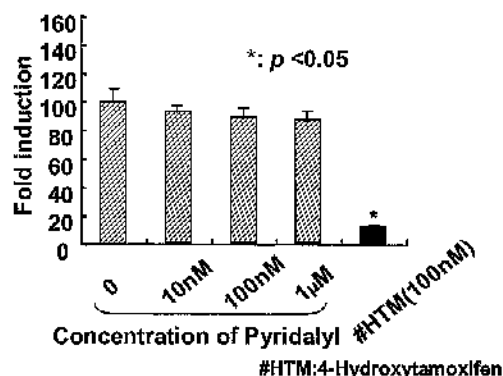
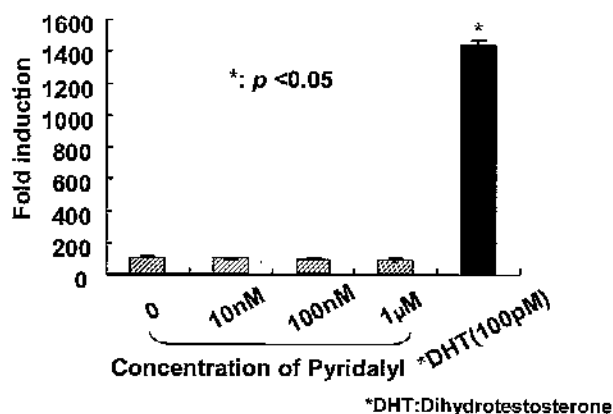


図1 ヒトER α を用いたレポーター遺伝子アッセイ試験によるピリダリルのアゴニストおよびアンタゴニスト作用の検討

(2) ARを用いたレポーター遺伝子アッセイ試験

本試験において典型ホルモンDHTおよび典型アンタゴニスト、ヒドロキシフルタミド (HFT) の作用が確認できたことから試験系は保証された(図2a)。しかしピリダリルは10 nMから1 μ Mの濃度でARに対する転写活性への影響は認めなかった(図2b)。従って、ARに対するアゴニストおよびアンタゴニスト作用は陰性と判定した。

a) アゴニスト



b) アンタゴニスト

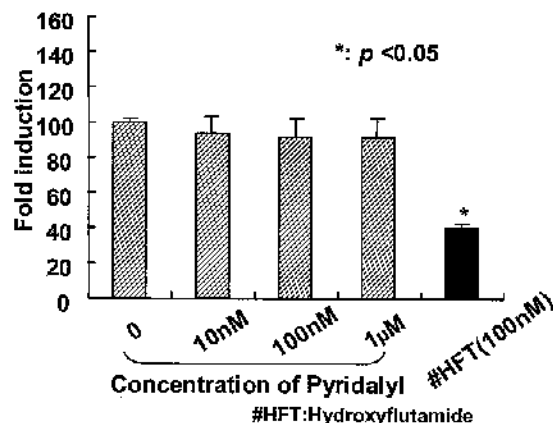
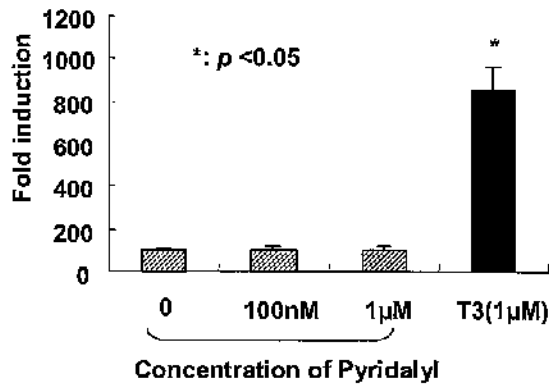


図2 ヒトARを用いたレポーター遺伝子アッセイ試験によるピリダリルのアゴニストおよびアンタゴニスト作用の検討

(3) TR α を用いたレポータージーンアッセイ試験

本試験において典型ホルモンT3の作用が確認できたことから試験系は保証された(図3a)。しかしピリダリルは100 nMおよび1 μ Mの濃度でTR α に対する転写活性への影響は認めなかった(図3b)。従って、TR α に対するアゴニストおよびアンタゴニスト作用は陰性と判定した。

a) アゴニスト



b) アンタゴニスト

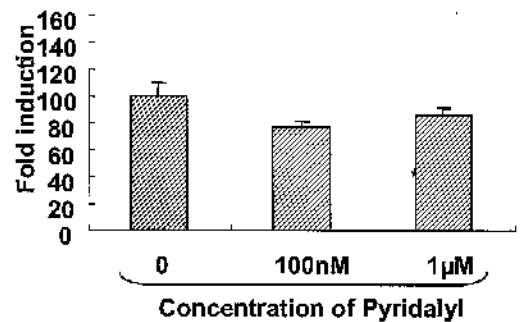


図3 ヒトTR α を用いたレポータージーンアッセイ試験によるピリダリルのアゴニストおよびアンタゴニスト作用の検討

②ピリダリルのラット性ホルモン生合成系に対する影響検討試験

(資料 9-2)

試験機関 住友化学工業株式会社

[非 GLP 対応]

報告書作成年 2002 年

検 体：ピリダリル
純 度：

試験目的：ピリダリルの2世代繁殖性試験（資料6-1）で腔開口の高値、卵巣における重量増加および間質腺細胞の空胞化が、統計学的な有意差を伴って認められた。しかしながら、その変化の程度は軽度であり、雌雄の繁殖能にも影響は認められなかった。また、ラットにおける90日間反復投与毒性試験（資料4-1）において副腎における細胞質空胞化が認められた。さらに、本剤の開発初期に実施した高純度品を用いたラットにおける90日間反復投与毒性試験（資料4-2）において、最高用量群（3500ppm）のみで実施した血中濃度測定において、テストステロンならびにエストラジオールの血中レベルの低下が認められ、本剤のステロイド合成系への影響が示唆された。ピリダリルの内分泌系への影響を *in vitro* でより詳細に検討する目的で本試験を実施した。

試験方法：

供試化合物：

ピリダリル

ketoconazole

hCG

LH

細胞調製・培養： 雄性 Crj:CD(SD)ラット（7週齢）の精巣および発情前期の雌性 Crj:CD(SD)ラット（10～12週齢）の卵巣を採取し、コラゲナーゼ処理を行うことにより、それぞれ初代培養ライディッシュ細胞および卵巣細胞を調製した。Medium199（0.1%BSA添加）を培地として、95%空気、5%CO₂下、37℃で5～48時間の静置培養を行い、途中5および24時間に培地交換を実施した。一部の試験ではピリダリルの代わりに ketoconazole（1μM）、hCG（100mIU/ml）および LH（100ng/ml）を添加した。

添加濃度： 終濃度 1, 3, 10, 30 μM（200倍濃度のDMSO溶液を添加した）

培地中ホルモン濃度の測定：

培地中のプロゲステロン、17α-OH-プロゲステロン、アンドロステンジオン、テストステロンおよびエストラジオール濃度をラジオイムノアッセイ法によって測定した。

17β-HSD 阻害活性の測定

細胞懸濁液に終濃度で 5.9μM になるようにアンドロステンジオンで希釈した[¹⁴C]アンドロステンジオン（0.3GBq/mmol）をエタノール溶液として加えた。37℃で5時間培養した後、培地を採取し、酢酸エチルで生成物を抽出した。抽出液の一部をクロロホルム/酢酸エチル（3:1,v/v）の展開溶媒で TLC 分析し、未変化のアンドロステンジオンの割合を測定した。

アロマターゼ阻害活性の測定

卵巣細胞懸濁液に終濃度で 6.0μM になるようにテストステロンで希釈した[¹⁴C]テストステロン（0.3GBq/mmol）をエタノール溶液として加えた。5時間の培養終了後、培地を採取し、酢酸エチルで生成物を抽出した。抽出液の一部をクロロホルム/メタノール（95:5,v/v）の展開溶媒で TLC 分析し、エストラジオールへ代謝され

た割合を測定した。

結果：

培地中ホルモン濃度（精巣）：

初代培養精巣細胞を M199 培地（0.1%BSA 添加）中、37℃で5時間培養したところ、対照群の培地中の 17 α -OH-プロゲステロン、アンドロステンジオンおよびテストステロン濃度はそれぞれ 0.14 $\pm$ 0.062、4.5 $\pm$ 0.08 および 4.7 $\pm$ 0.17 ng/ml となった。プロゲステロンおよびエストラジオール濃度は検出限界（それぞれ 0.02 ng/ml および 0.008 ng/ml）未満であった。1～30 μ M のピリダリルを添加すると、17 α -OH-プロゲステロンおよびテストステロン濃度は対照群と比較して有意な差が認められなかったが、10 μ M 以上ではピリダリル添加濃度の増加に伴ってアンドロステンジオン濃度の増加が認められ、30 μ M においては溶媒対照群の約2倍の 7.4 $\pm$ 1.21 ng/ml に増加した。

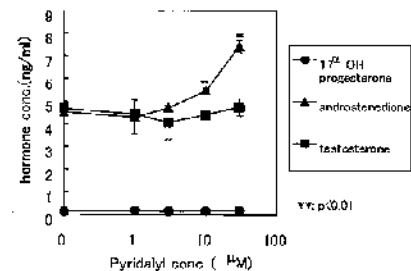


Figure 1 Hormone concentrations in rat primary Leydig cell culture medium 5 hrs after addition of pyridalyl

ホルモン生成量（精巣）：

培養開始後24時間までアンドロステンジオンおよびテストステロンの生成が認められ、48時間まで17 α -OH-プロゲステロンの生成が認められた。Ketoconazole を添加して培養すると、想定どおりアンドロステンジオンおよびテストステロンの生成量が低下し、hCG を添加すると17 α -OH-プロゲステロン、アンドロステンジオンおよびテストステロンの生成量が増加したことから、精巣のステロイドホルモン合成阻害剤の評価系として本実験系が妥当であり、細胞の脳下垂体ホルモンに対する応答機能が維持されていることが示された。ピリダリル（10 μ M）を添加して培養すると、全ての時点においてアンドロステンジオン生成量の増加が認められた。

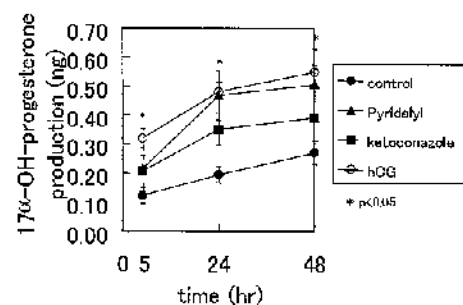


Figure 2 Cumulative production of 17 α -OH progesterone in rat Leydig cell culture medium after addition of pyridalyl (10 μ M), ketoconazole (1 μ M), or hCG (100 mU/ml).

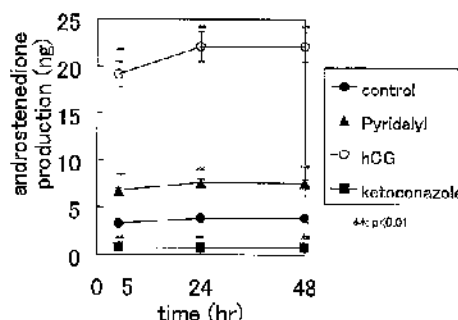


Figure 3 Cumulative production of androstenedione in rat Leydig cell culture medium after addition of pyridalyl (10 μ M), ketoconazole (1 μ M), or hCG (100 mU/ml).

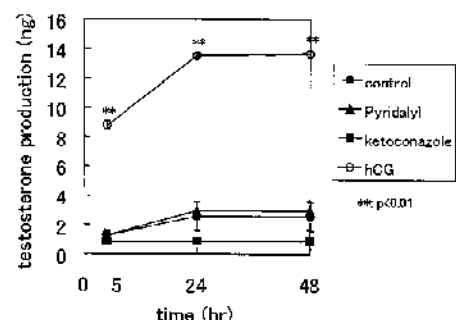


Figure 4 Cumulative production of testosterone in rat Leydig cell culture medium after addition of pyridalyl (10 μ M), ketoconazole (1 μ M), or hCG (100 mU/ml).

17 β -HSD 活性に対する影響：

初代培養精巣細胞の[14 C]アンドロステンジオン代謝活性を調べた。3 μ M以上のピリダリルの添加により、アンドロステンジオン分解量が有意に低下し(10 μ M群を除く)、17 β -HSD活性の阻害が示唆された。しかしながら、阻害の程度は非常に弱く、30 μ Mにおいても溶媒対照と比較して6%の活性が阻害されるに過ぎなかった。

ホルモン濃度(卵巣)：

初代培養卵巣細胞をM199培地(0.1%BSA添加)中、37℃で5時間培養したところ、対照群の培地中のプロゲステロン、17 α -OH-プロゲステロンおよびエストラジオール濃度はそれぞれ18.1 $\pm$ 1.89、0.68 $\pm$ 0.021、0.40 $\pm$ 0.361および0.14 $\pm$ 0.020 ng/mlとなった。テストステロンは検出限界(0.04 ng/ml)未満であった。KetoconazoleおよびLHによる変動は文献の報告どおりであり、卵巣のステロイドホルモン合成阻害剤の評価系として本実験系が妥当であり、細胞の脳下垂体ホルモンに対する応答機能が維持されていることが示された。1~30 μ Mのピリダリルを添加して培養したが、いずれのホルモン濃度にも対照群と比較して顕著な差が認められなかった。

17 β -HSD 活性に対する影響(卵巣)：

初代培養卵巣細胞の[14 C]アンドロステンジオン代謝活性を調べた。1~30 μ Mのピリダリルを添加すると、極めて弱い作用ではあるが、アンドロステンジオンの代謝に対する阻害傾向が認められ、30 μ Mにおいて溶媒対照の11%の代謝活性が阻害された。

アロマターゼ活性に対する影響(卵巣)：

初代培養卵巣細胞の[14 C]テストステロンを基質にしたエストラジオールへの代謝活性を調べた。1~30 μ Mのピリダリルを添加してもエストラジオール生成量には有意な変化は認められず、ピリダリルはアロマターゼを阻害しないことが明らかとなった。

まとめ：

ピリダリルは3 μ M以上で精巣の性ホルモン合成の過程に影響を与え、その作用は非常に弱い17 β -HSD活性阻害を介したテストステロン合成阻害であることが明らかとなった。

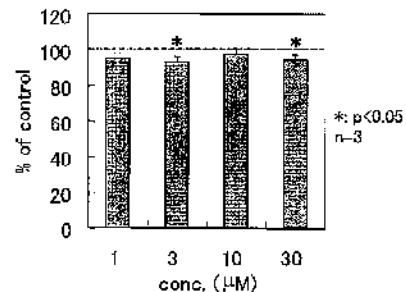


Figure 5 Effects of pyridalyl on the activity of 17 β -HSD in rat primary Leydig cells.

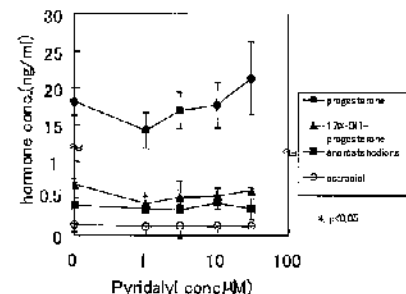


Figure 6 Hormone concentrations in rat primary ovary cell culture medium 5 hrs after addition of pyridalyl

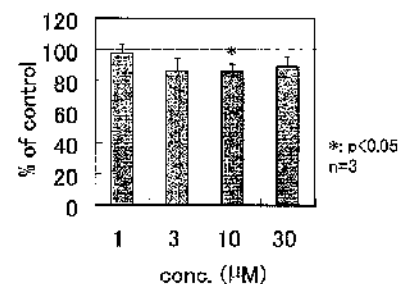


Figure 7 Effects of pyridalyl on the activity of 17 β -HSD in rat primary ovary cells.

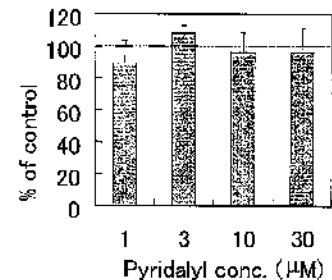


Figure 8 Effects of pyridalyl on the activity of aromatase in rat primary ovary cells.

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学工業株式会社にある。

③ピリダリル原体のラットを用いた 4 週間投与によるホルモン検討試験 (資料 9-3)

試験機関：住友化学工業株式会社

[GLP 非対応]

報告書作成年：2002 年

検 体：ピリダリル原体

試験目的：ピリダリルの 2 世代繁殖性試験 (資料 6-1) で膈開口日の高値、卵巣における重量増加および間質腺細胞の空胞化が、統計学的な有意差を伴って認められた。しかしながら、その変化の程度は軽度であり、雌雄の繁殖能にも影響は認められなかった。また、ラットにおける 90 日間反復投与毒性試験 (資料 4-1) において副腎における細胞質空胞化が認められた。さらに、本剤の開発初期に実施した高純度品を用いたラットにおける 90 日間反復投与毒性試験 (資料 4-2) において、最高用量群 (3500ppm) のみで実施した血中濃度測定において、テストステロンならびにエストラジオールの血中レベルの低下が認められ、本剤のステロイド合成系への影響が示唆された。今回、非特異的な内分泌系への影響が認められないと考えられる投与量において、ピリダリルの内分泌系への影響をより詳細に検討する目的で本試験を実施した。

純 度：

供試動物：Sprague-Dawley 系 SPF ラット [Crj: CD(SD)], 1 群雄各 8 匹, 雌 16 匹

開始時 10 週齢, 投与開始時の体重範囲 雄; 339~371 g, 雌; 222~257 g

投与期間：4 週間 (2002 年 5 月 6 日~2002 年 6 月 6 日)

投与方法：検体を 0, 100, 500, 1000 及び 2000 ppm の濃度で飼料に混入し, 4 週間にわたって随時摂食させた。検体を混入した飼料は 2 週間ごとに調製した。

用量設定根拠；

観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡；生死を含む一般状態を毎日観察した。有意差検定は Fisher の直接確率法を用いて実施した。

死亡および被験物質投与に起因すると考えられる症状は雌雄いずれの投与量においても認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学工業株式会社にある。

体重変化;投与期間中全動物の体重を毎週測定し、解剖前には全解剖動物の体重を測定した。

また、全測定週について、体重増加量を算出した。有意差検定は、Dunnett の多重比較検定あるいは Steel の多重比較検定により行った。

平均体重の変化を次図に示す。

図1 体重変化(雄)

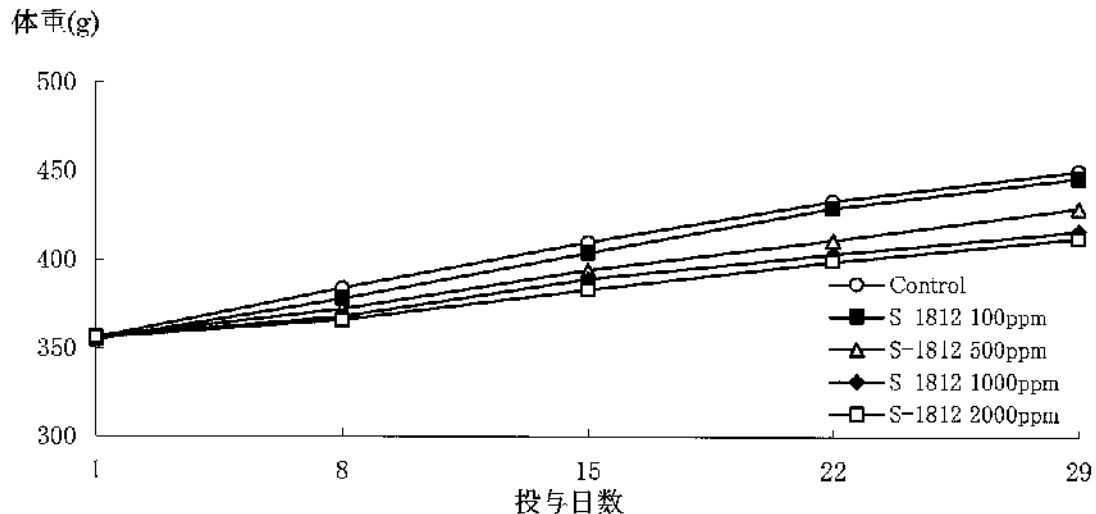
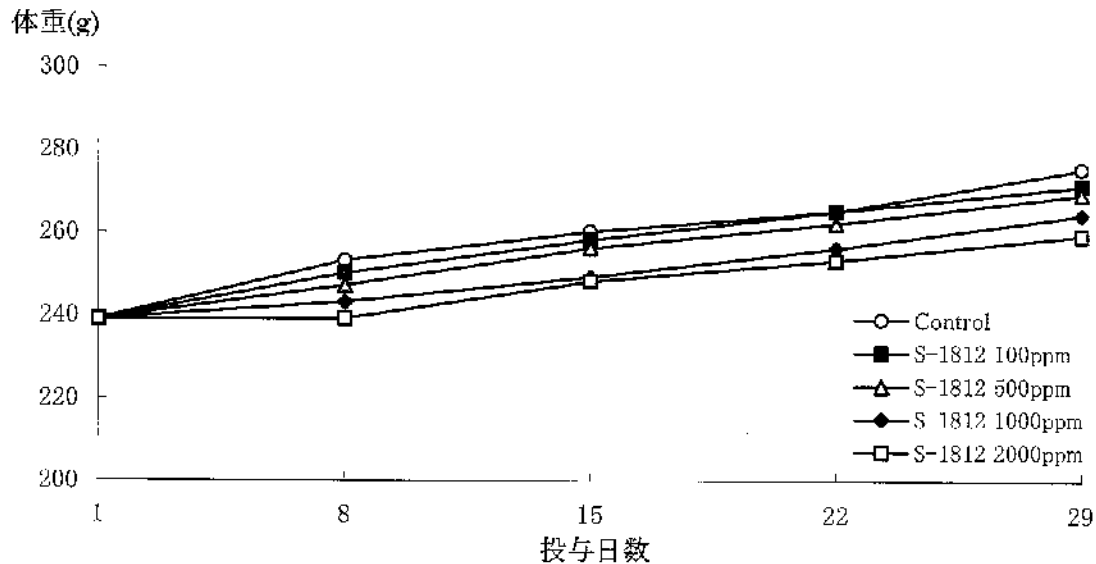


図2 体重変化(雌)



雄の 500ppm 以上の群および雌の 1000ppm 以上の群で投与 8 日目の体重増加量および総体重増加量の低値が認められた。体重においては、1000ppm 以上の群の雌雄で低値が認められた。2000ppm 群における体重増加抑制の程度は雄で 8%、雌で 6%であり、顕著な体重増加抑制が認められず、一般症状にも何等影響がなかったことから、内分泌系への影響を評価できないほどの過度な一般毒性は認められなかったと判断した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学工業株式会社にある。

摂餌量及び食餌効率；全動物の摂餌量を週1回測定し、食餌効率も算出した。

統計学的有意差が認められた時点の結果を下表に示す。

表1 摂餌量

性 別		雄				雌			
投与量 (ppm)		100	500	1000	2000	100	500	1000	2000
投 与 週	1		↓ 76	↓ 67	↓ 67			↓ 71	↓ 64
	2		↓ 91	↓ 87	↓ 83				
	3		↓ 91		↓ 87				↓ 81
	4			↓ 87	↓ 83			↓ 88	↓ 82

表2 摂餌効率

性 別		雄				雌			
投与量 (ppm)		100	500	1000	2000	100	500	1000	2000
投与週	1				↓ 55				↓ 100

有意差の検定は、Dunnett の多重比較検定あるいは Steel の多重比較検定により行った。(↓, $p \leq 0.05$; ↓↓, $p \leq 0.01$)。

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示した。

500ppm以上の群の雄および1000ppm以上の群の雌で摂餌量の低値あるいは低値傾向が認められた。摂餌効率については、2000ppm群の雌雄において、投与8日目の摂餌効率の低値が認められた。

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は以下の通りであった。

表3 平均検体摂取量

投与量(ppm)		100	500	1000	2000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	5.5	25.5	49.9	94.9
	雌	6.1	29.5	54.9	102.2

ホルモン測定；断頭によって採取した血液から血清を分取して以下の項目を測定した。

雄：コルチコステロン、テストステロン

雌：エストラジオール、プロゲステロン（各群の動物番号の前半8例、性周期を観察し、発情前期に解剖した。）

コルチコステロン（各群の動物番号の後半8例、性周期を考慮せず解剖し

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学工業株式会社にある。

た。)

有意差検定は、Dunnett の多重比較検定あるいは Steel の多重比較検定、定量
限界未満の数値を含む群については、Mann-Whitney の U 検定を行った。

雌雄いずれの群、いずれのホルモンにおいても、対照群に比べ有意な変化は認められなかった。

性周期観察；雌の動物番号の前半 8 例／群については、投与 3 週目から連日、1 日 1 回の頻度で午前中に膣垢を採取し、標本を作製して観察した。投与 5 週目以降の膣垢観察において、発情前期を示す動物を当日の解剖対象動物とした。

いずれの動物においても、本化合物に起因する性周期の異常を認めなかった。

臓器重量；投与終了時の全生存動物を対象として以下の臓器重量を測定し、相対重量も算出した。

肝臓、腎臓、副腎、卵巢、子宮、精巣、前立腺腹葉、前立腺背側葉、精囊、精巣上体
統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

表 4 臓器重量

性 別		雄				雌 (前半 8 例)			
投与量 (ppm)		100	500	1000	2000	100	500	1000	2000
体 重				↓ 93	↓ 90				↓ 93
肝臓	相対重量				↑ 107				↑ 111
前立腺 (背側葉)	絶対重量				↓ 81 *				
精囊	絶対重量			↓ 83	↓ 81				
精巣	相対重量				↑ 111				
卵巢	絶対重量					↓ 80			
	相対重量					↓ 79			

有意差の検定は、Dunnett の多重比較検定あるいは Steel の多重比較検定を行った。(↑↓, $p \leq 0.05$; ↑↓, $p \leq 0.01$)。また、前立腺(背側葉)および精囊については、最終体重の低値との相関を検討するため、共分散分析 (EPA において、体重との相関を検討する統計処理法として推奨) を行った。

* : 共分散分析によっても有意な変化を示した。

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学工業株式会社にある。

雄において、1000 ppm 以上の群の精嚢で絶対重量の、2000ppm 群の前立腺（背側葉）で絶対重量の低値が認められた。相対重量においては、これらの器官には有意な変化は認められなかった。さらに、最終体重の低値との相関性を検討する目的で、これらの器官について、最終体重を加味した共分散分析を実施したところ、前立腺（背側葉）については、体重の低値を考慮してもなお、有意な低値であった。一方、精嚢については共分散分析を行った結果、有意でなかった。*

その他、2000ppm 群の雄および雌（動物番号の前半 8 例）で肝臓の、雄で精巣の相対重量の高値が認められた。精巣の相対重量の高値については、相対重量のみの変化であること、同群で最終体重の低値が認められていることから、被験物質投与の影響とは考えなかった。

雌においては、100ppm 群の卵巣の絶対重量の低値が認められたが、投与量に対応した変化でないことから、被験物質投与の影響とは考えなかった。その他の群および器官においては、対照群に比して有意な変化は認められなかった。

肉眼的病理検査；全ての動物について剖検を行った。

観察された主要な肉眼病理検査所見を下表に示す。

* 申請者註：上記のように、2000ppm 群（94.9mg/kg）で雄の前立腺（背側葉）の絶対重量の低値が認められた。本化合物を用いた *in vitro* での試験（ピリダリルのラット性ホルモン生合成系に対する影響検討試験。資料 9-2）において、本化合物は軽微ながら、ステロイドホルモン生合成の阻害作用を有することが示されており、本所見は、本化合物のステロイドホルモン合成系への影響と関連する変化と考えられた。

しかしながら、高用量（2000ppm 群、雄で 94.9mg/kg/day、雌で 102.2mg/kg/day）においても、テストステロンおよびエストラジオールの血中濃度には何等影響が無く、1000ppm 群（雄で 49.9mg/kg/day、雌で 54.9mg/kg/day）では器官重量を含めて、内分泌系へは何等影響が認められなかった。また、前立腺（背側葉）重量は、内分泌系の検査項目の中でも比較的鋭敏な項目であることが知られている。

これらのことから、本化合物の内分泌系への影響は、高用量においてのみ鋭敏な項目に変動が認められる程度の軽微な影響であり、重篤なものではないと考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学工業株式会社にある。

表 5 肉眼的病変

性 別		雄				
投与量 (ppm)		0	100	500	1000	2000
臓器	所見/検査動物数	8	8	8	8	8
膀胱	白色物質貯留	2	1	1	1	2
腎臓	陥凹形成 (腎盂、左側)	0	0	0	1	0
肝臓	奇形様突起	0	0	0	0	1

性 別		雌 (前半 8 例)					雌 (後半 8 例)				
投与量 (ppm)		0	100	500	1000	2000	0	100	500	1000	2000
臓器	所見/検査動物数	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
肝臓	白色巣 (20mm)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
子宮	液貯留 (子宮角)	7	6	8	7	8	3	3	3	5	2
卵巢	肥大 (右側、 ϕ 15mm)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

有意差の検定は、Fisher の直接確率計算法を用いて行った
($\uparrow$, $p \leq 0.05$; $\uparrow\downarrow$, $p \leq 0.01$)。

性周期を観察し、発情前期にあわせて解剖を行った雌 (各群動物番号の前半 8 例) においては、対照群 1 例 (動物番号: 108)、100ppm 群 2 例 (動物番号: 119、124)、1000ppm 群 1 例 (動物番号: 151) を除いて、子宮の液貯留 (両側) が認められた。

雄および性周期のステージに関係なく解剖を行った雌においては、雄で膀胱内白色物質、雌で子宮の液貯留 (両側) が対照群も含めて全ての群に、雄で腎臓の陥凹巣が 1000ppm 群の 1 例に、肝臓の奇形様突起が 2000ppm 群の 1 例に、雌で卵巢 (右側) の大型化が 100ppm 群の 1 例に、肝臓の白色巣が 1000ppm 群の 1 例に認められたものの、いずれも、ラットで通常認められる所見であるか、その発生頻度において対照群に比して有意差がなく、低頻度であることから、被験物質投与に起因する変化とは考えなかった。

病理組織学的検査：卵巢の病理組織学的検査を行った。

観察された検査所見を下表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学工業株式会社にある。

表 6 病理組織学的検査

性 別		雌				
投与量 (ppm)		0	100	500	1000	2000
臓器	所見/検査動物数	16	0	0	16	16
卵巢	間質腺細胞の空胞化	0	0	0	0	10↑

有意差の検定は、Fisher の直接確率計算法を用いて行った
(↑↓, $p \leq 0.05$; ↑↓, $p \leq 0.01$)。

2000ppm 群の卵巢において、間質腺細胞の空胞化が認められた。本所見は本化合物を用いた 90 日間反復投与毒性試験において認められている所見であり、本化合物投与による影響と考えられた。

以上のように、ピリダリルを雌雄の SD ラットに 100、500、1000 および 2000ppm の投与量で 4 週間反復投与し、内分泌系への影響を検討したところ、軽度な影響が前立腺（背側葉）および卵巢に認められたものの、血中ホルモンやその他の関連器官には影響が認められず、本化合物が内分泌系へ重篤な影響を及ぼさないことが示された。

尚、本試験における無毒性量は、雄の 500ppm 以上の群および雌の 1000ppm 以上の群で摂餌量の低値を伴う体重増加抑制が認められたことから、雄で 100ppm (5.5mg/kg)、雌で 500ppm (29.5mg/kg) であった。

④ピリダリルのラット脂肪酸代謝に対する影響検討試験

(資料 9-4)

試験機関 住友化学工業株式会社

[非 GLP 対応]

報告書作成年 2003 年

試験目的: ピリダリルの 90 日間反復投与毒性試験(資料 4-2)で副腎および卵巣の空胞化ならびに肺における泡沫細胞/好酸性細胞の集簇が認められ、脂質の代謝阻害が疑われた。ピリダリルの脂肪酸代謝への影響を *in vitro* で詳細に検討する目的で本試験を実施した。

検体純度:

試験方法:

供試化合物:

ピリダリル

antimycin A

rotenone

ホモジネート調製・反応: 肝臓、腎臓、肺、副腎および卵巣を Tris-HCl 緩衝液中でホモジナイズした。被験物質存在下組織ホモジネート中で放射性脂肪酸を 37℃ で一定時間振盪した。HClO₄ を加えて遠心した後、上清の一部の放射能 (β 酸化生成物) 量を測定した。

添加濃度: 終濃度 10μM (ピリダリルまたは rotenone), 30μM (ピリダリル、肺のみ), または 60 μM (antimycin A)

結果:

ラット副腎、腎臓、肝臓、肺および卵巣ホモジネートにおける[1-¹⁴C]パルミチン酸のβ酸化生成物量を経時的に調べた。それぞれの組織における反応開始後 60 分におけるβ酸化生成物量は、それぞれ、6.3、2.6、6.2、0.6 および 2.6 μmol/g 組織/hr であり、組織の種類によって顕著に異なった。各組織における反応継続時間は 60 分以上であり、卵巣においては 180 分以上継続した。以上の結果から、以降の各被験物質の脂肪酸代謝への影響を調べる実験では、反応時間を 60 分とした。

ラット副腎、腎臓、肝臓、肺および卵巣ホモジネートにおける[1-¹⁴C]パルミチン酸のβ酸化に対するピリダリル、antimycin A および rotenone の添加効果を調べた。antimycin A および rotenone は、電子伝達系の阻害剤としてβ酸化を阻害することが知られているが、本実験系においても、60μM の antimycin A は肺以外の組織においてβ酸化を阻害した。10μM の rotenone は、副腎と腎臓のβ酸化を阻害した。

副腎ホモジネートにおいて 10μM のピリダリルを添加するとβ酸化が阻害され、β酸化生成物量が対照群の 77%に低下したが、その他の組織においては顕著な影響は認められなかった。ラットにおけるピリダリルの亜急性経口毒性試験において、副腎の空胞化が認められており、β酸化の阻害による脂肪の蓄積との関連性が示唆された。肺においてはβ酸化の阻害活性が認められず、肺における泡沫細胞/好酸性細胞の集簇との関連性は不明であった。

まとめ:

ピリダリルは 10μM で副腎ホモジネートの脂肪酸 (パルミチン酸) 代謝を阻害したが、腎臓、肝臓、肺および卵巣のホモジネートにおいてはそれぞれ 10μM、30μM および 10μM の濃度でパルミチン酸の代謝に影響を及ぼさなかった。