

3) マウスを用いた混餌法による発がん性試験

(資料 T-21)

試験機関 Covance Laboratories (米国) [GLP 対応]

報告書作成年 1999年

被験物質:

試験動物: ICR 系マウス、投与開始時約 6 週齢 (体重 雄 22.7~30.8 g、雌 16.7~23.9 g)

	1群あたりの動物数		投与開始日～屠殺解剖日
	雄	雌	
投与 78 週時 最終屠殺対象動物	50	50	雄: 1997 年 9 月 15 日～1999 年 3 月 16～19 日 雌: 1997 年 9 月 15 日～1999 年 3 月 16～19 日

投与方法: 被験物質を 0、15、150 および 500 ppm の濃度で飼料中に混入し投与を開始した。しかし、500 ppm 群で雌雄とも体重増加抑制、摂餌量の低値ならびに重篤な症状がみられたので、高用量を投与 13 週時に 500 ppm から 400ppm に減じた。その後も低体重、体重増加抑制、摂餌量の低値および重篤な症状が継続してみられることから、投与 20 週時に再度高用量を 400ppm から 300ppm に減じた。いずれの動物にも 78 週間 (18 ヶ月間) にわたって被験物質を連続的に摂取させた。なお、被験物質を混入した飼料は週 1 回調製した。

以下、高用量を 500/400/300 ppm と表記する。

投与量の設定根拠:

検査項目および結果:

一般状態および生存率: 一般状態および生死を毎日観察した。

各群の経時的な生存率の推移を次表に示す。

性別	雄				雌			
	投与量 (ppm)	0	15	150	500/400/300	0	15	150
13 週時生存率 (%)	100	100	100	98	100	100	100	100
52 週時生存率 (%)	94	80	94	84	88	96	92	84
78 週時生存率 (%)	82	66	80	68	66	78	76	72

(National Cancer Institute、Lifetable Package Analysis で有意差なし。)

雌雄の被験物質投与群の生存率はいずれも対照群と比較して統計学的有意差は認められず、生存率に対する被験物質の影響はみられなかった。

一般状態の変化として、高用量群では最初の 12 週間 (投与量: 500 ppm) で円背位あるいは削瘦等が、同群の雌では活動性の低下、糞量減少および蒼白がみられた。投与 13~19 週 (投与量: 400 ppm)、では円背位、削瘦および活動性の低下がみられた。投与 20~22 週 (投与量: 300 ppm) では削瘦または活動性の低下が散見された。その他、耳介／尾の部分欠損が雌雄の 150 ppm 以上の群で観

察されたが、原因は不明であった。

体重：全動物の体重を投与 14 週時までは週 1 回測定した。その後、投与 18 週時ならびに 20~26 週では週 1 回、それ以降は 4 週間に 1 回測定した。各群の経時的な体重の推移を次表に示す。

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		0	15	150	500/400/300	0	15	150	500/400/300
体重 (g)	13 週時	36.7	35.0a	35.0a	29.3a	27.7	27.5	27.6	23.7a
	54 週時	41.3	40.2	37.6a	33.1a	32.1	31.8	30.7	27.1a
	78 週時	40.4	39.9	37.7a	33.5a	33.8	32.6	32.0	27.4a
体重増加量 (g) (1~78 週)		13.1	13.4	10.7a	6.7a	12.9	11.7	11.1	6.9a

a : p<0.05 (多重比較検定)

雄の 150 ppm 以上の群および雌の高用量群の体重は、投与期間を通じて対照群に比べて低値を示し、被験物質投与に起因する変化と考えられた。雄の 15 ppm 群で投与期間の初期に体重の低値がみられたが、78 週間の投与期間では雄の同群と対照群の体重増加量は同程度であった。

摂餌量および摂餌効率：摂餌量を投与 1~13 週、17 週、20~25 週は週 1 回、それ以降は 4 週間に 1 回測定した。また、摂餌効率（体重増加量÷摂餌量×100）も算出した。

雌雄の高・中用量群の摂餌量は、投与期間を通じて対照群に比べて低値を示し、被験物質投与による影響と考えられた。高用量群の最初の 12 週間 (500 ppm) では、摂餌効率は対照群と比較して雄で約 1/4、雌で約 1/2 であった。投与 13~19 週 (400 ppm) の摂餌効率は対照群と比較して雄で 14 倍、雌で 7.5 倍高かった。その他、摂餌量および摂餌効率に各被験物質投与群で統計学的有意差がみられたが、散発的であるため被験物質投与の影響ではないものと考えられた。

被験物質摂取量：被験物質投与量、摂餌量および体重から、各被験物質投与群の全投与期間における 1 日あたりの平均被験物質摂取量を算出し、その数値を次表に示す。

性別	雄			雌			
	投与量 (ppm)	15	150	500/400/300	15	150	500/400/300
被験物質摂取量 (mg/kg/day)		2.2	20.8	60.9	2.8	27.1	75.9

血液学的検査：投与 52 週時および投与終了時に全例を対象として、採血前一晩絶食後、眼窩静脈叢より採血し、以下の項目を測定した。

赤血球数、白血球数、血小板数、白血球分画、細胞形態 (52 週に全例、78 週に対照群と高用量群で実施)

対照群に比べ、統計学的有意差のみられた項目を次表（次頁）に示す。

(血液学的検査)

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		15	150	500/400/300	15	150	500/400/300
赤血球数 ¹⁾	52 週	99	101	95 a	104 a	101	103
	79 週	101	101	94	103	101	104
血小板球 ¹⁾	52 週				104	111	119 a
	79 週				98	101	116
白 血 球 分 画	分葉核	52 週			53	61	76
	好中球 ¹⁾	79 週			82	68	96 a
	単球 ²⁾	52 週			0.2	0.1	0.2
	(/ μ L)	79 週			0.1	0.1	0.2
	好酸球 ²⁾	52 週			0.1	0.1 a	0.2 a
	(/ μ L)	79 週			0.1	0.1	0.1 a

a : p<0.05 (多重比較検定) ; 1) : 表中の数値は対照群の値を 100 とした時の値、2) : 測定値。

これらの変動の程度はいずれも軽微であり、経時的な一貫性がないこと、あるいは用量依存性がないことから、被験物質投与とは無関係の偶発的な変化と考えられた。

器官重量：最終屠殺時に、各群 10 匹の動物を対象として、解剖後以下の器官重量（絶対重量）を測定した。また、相対重量として対体重比および対脳重量比を算出した。

副腎（固定後）、脳（脳幹も含む）、肝臓（胆嚢を含む）、肺、腎臓、卵巣、脾臓、精巣および精巣上体

対照群と比較して、統計学的有意差のみられた項目を次表に示す。

性別		雄			雌		
投与濃度 (ppm)		15	150	500/400/300	15	150	500/400/300
最終体重（絶食後）		98	92 a	81 a	97	93 a	80 a
脳	絶対重量	106 a	104	96	95	95	87 a
	対体重比	103	108	117 a	103	108	111
肝臓	絶対重量	105	105	101	99	93	91
	対体重比	102	108	124 a	108	109	120 a
脾臓	絶対重量	71	64 a	50 a	115	77	62 a
	対体重比	70	76 a	60 a	119	85	80
精巣／ 精巣上体	絶対重量	109	100	80 a			
	対脳重量比	102	96	83 a			
肺	絶対重量	94	94	85	87	87	73 a
腎臓	絶対重量	103	96	84 a	94	94	87
副腎	絶対重量	100	100	133	88	81	69 a
	対体重比	94	109	152 a	98	99	87
	対脳重量比	91	101	129 a	95	89	77

a : p<0.05 (多重比較検定) ; 表中の数値は対照群値を 100 とした時の値。

雌雄の 150 ppm および 500/400/300 ppm 群では、平均器官重量と平均器官重量対体重比の著しい変動がみられた。しかし、500/400/300 ppm 群ではこれらの変化と関連する組織学的变化はみられなかった。この 150 ppm および 500/400/300 ppm 群でみられた变化は、投与終了時の体重低値に起因し、被験物質投与による变化ではないと考えられた。

肉眼的病理検査：全ての動物を対象として、屠殺・解剖時に肉眼的病理検査を実施した。

被験物質投与に起因した異常はみられなかった。

病理組織学的検査：全ての対照群および高用量群の動物、全ての死亡・瀕死期殺動物を対象に以下の全臓器について病理標本を作製し、鏡検した。また、15 および 150ppm 群の全動物の肺、肝臓、腎臓および肉眼的病変部について検査した。

副腎、大動脈、骨髓（大腿骨／胸骨）、脳および脳幹（髓質／橋、小脳皮質および大脳皮質）、脊髄（頸部、腰部、胸部）、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、食道、眼（視神経も含む）、大腿骨（関節表面を含む）、心臓、腎臓、喉頭、肝臓（胆嚢を含む）、肺、乳腺（雌）、肺癌（周囲組織）、腸間膜リンパ節、卵巣、膀胱、咽頭、下垂体、前立腺、顎下腺、坐骨神経、精嚢、皮膚、脾臓、胸骨、胃、精巣および精巣上体、大腿筋、胸腺、甲状腺（上皮小体）、気管、膀胱、子宮（子宮頸部を含む）および腫瘍、肉眼的病変部

主要な非腫瘍性病変を表 I に、腫瘍性病変の発生を表 II に、腫瘍総数および腫瘍保有動物数を表 III に示す。

検査した組織には、被験物質に関連した組織学的变化はみられなかった。肺、肝臓、および造血系に一般にみられる腫瘍の発生率は、被験物質投与によって増加しなかった。

500/400/300 ppm では、雌生殖器（卵巣、子宮、子宮頸部）の萎縮がみられ、子宮内膜の囊胞状過形成の発生率／程度の低下がみられた。これらの所見は摂餌量低下および体重増加抑制の二次的作用と判断された。

以上、被験物質をマウスに 18 ヶ月間投与した結果、発癌性は雌雄ともみられなかった。また、被験物質に起因する毒性変化として一般状態の変化が雌雄の高用量群（500 または 400ppm）、体重の低値が雄 150ppm 以上の群および雌高用量群、摂餌量の低値が雌雄 150ppm 以上の群でみられた。したがって、本試験条件下における無毒性量は雌雄とも 15 ppm（雄：2.2 mg/kg/day、雌：2.8 mg/kg/day）であると判断された。

申請者注：

表 III の腫瘍総数および腫瘍保有動物数については申請者が作成・統計学的解析（Fisher の直接確率法）を実施した。雄の 500/400/300 ppm では良性腫瘍、悪性腫瘍、総原発腫瘍のいずれでも、腫瘍総数および保有動物数とも有意な減少がみられ、雌の 150 ppm 以上では悪性腫瘍の総数と保有動物数および重複腫瘍保有動物数が、15 ppm 以上では総原発腫瘍の総数と保有動物数がそれぞれ有意に減少した。以上の結果から、被験物質は腫瘍の発現頻度を増加させないものと判断した。

以下の病理組織学的検査結果表を示す。

表 I -1 : 非腫瘍性病変発生頻度- 79 週最終屠殺対象動物：死亡および瀕死期殺動物

表 I -2 : 非腫瘍性病変発生頻度- 79 週最終屠殺対象動物：計画殺動物

表 I -3 : 非腫瘍性病変発生頻度- 79 週最終屠殺対象動物：全動物（死亡・瀕死期+計画殺）

表 II -1 : 腫瘍性病変発生頻度- 79 週最終屠殺対象動物：死亡および瀕死期殺動物

表 II -2 : 腫瘍性病変発生頻度- 79 週最終屠殺対象動物：計画殺動物

表 II -3 : 腫瘍性病変発生頻度- 79 週最終屠殺対象動物：全動物（死亡・瀕死期+計画殺）

表 III : 腫瘍総数および腫瘍保有動物数- 79 週最終屠殺対象動物：全動物（死亡・瀕死期殺+計画殺）

表 I - 1 : 非腫瘍性病変発生頻度- 79週最終屠殺対象動物：死亡および瀕死期殺動物

臓器	性別 変化／投与量 (ppm)	雄				雌			
		0	15	150	500/400/300	0	15	150	500/400/300
卵巣	検査動物数					18	11	12	14
	萎縮					0	0	0	5 ^b
	卵胞囊胞					10	4	5	4
子宮	検査動物数					4	0	0	0
	萎縮					18	12	12	14
	囊胞状内膜過形成					0	0	0	6 ^b
子宮頸	検査動物数					11	6	5	3
	萎縮					18	11	9	11
	慢性炎症					0	0	1	4 ^b
肝臓	検査動物数	10	17	10	16	18	12	12	14
	慢性炎症	4	5	4	2	10	6	7	2
	肺	10	17	10	16	18	12	12	14
	肺胞マクロファージ空胞化	1	3	0	5	3	1	0	3
	気管支／血管周囲のリンパ球浸潤増加	0	0	0	0	1	0	0	0
	肺胞／気管支上皮過形成	0	0	1	1	1	2	0	0
腎臓	検査動物数	10	17	10	16	18	12	12	14
	囊胞	0	0	2	2	0	1	1	1
	血管周囲单核球浸潤	9	13	8	7	14	7	7	6
	慢性炎症	8	13	10	10	16	4	6	7
	尿細管上皮の微小結石	0	1	0	2	1	0	1	1
副腎(皮質)	検査動物数	10	17	10	16	18	12	12	14
	被膜下細胞過形成	6	9	6	2	18	11	11	9
甲状腺	検査動物数	10	16	10	16	18	12	12	14
	微小囊胞	2	5	3	1	1	3	3	0
脾臓	検査動物数	10	17	10	16	18	12	12	14
	髓外造血亢進	2	2	2	2	5	5	1	3
	被膜の炎症／線維化	0	3	0	1	0	1	0	0
腺胃	検査動物数	10	17	10	16	18	12	12	14
	胃腺拡張	0	0	0	1	1	0	1	1
	過形成	0	0	0	0	1	0	0	1
腸間膜リンパ節	検査動物数	10	16	10	12	16	9	11	14
	うつ血	1	1	0	0	1	2	0	0
胸腺	検査動物数	5	10	10	7	12	6	10	8
	微小囊胞	1	1	1	0	1	0	1	2
眼	検査動物数	10	17	10	16	18	12	12	14
	破裂	1	1	0	0	0	1	0	0
	角膜ミオキシズ	3	2	0	2	3	0	0	0
坐骨神経	検査動物数	9	17	9	16	18	12	12	14
	変性	1	0	0	0	5	2	2	0
精巢	検査動物数	10	17	10	16				
	変性	2	1	1	2				
精嚢	検査動物数	10	17	10	16				
	分泌増加(拡張)	0	2	2	0				
骨髄(胸骨)	検査動物数	10	17	10	16	18	12	12	14
	顆粒球系細胞過形成	7	9	4	6	7	4	3	1
骨髄(大腿骨)	検査動物数	10	17	10	16	18	12	12	14
	顆粒球系細胞過形成	7	9	4	6	7	4	3	1
皮膚, 他	検査動物数	6	9	3	7	4	1	4	3
	耳 潰瘍／炎症	4	3	0	4	0	0	3	1
	潰瘍	6	8	2	3	2	1	2	2

b: p<0.01 (Fisher の直接確率法) (その他 Fisher-Irwin の不均一性に関する直接確率法による検定の結果、有意差なし。)

表1-2：非腫瘍性病変発生頻度-79週最終屠殺対象動物：計画殺動物

臓器	性別	雄				雌				
		変化/投与量 (ppm)	0	15	150	500/400/300	0	15	150	500/400/300
卵巢	萎縮	検査動物数					32	31	33	36
	卵胞囊胞			0	0	0	96			
	血液囊胞			26	30	28	24			
子宮	萎縮	検査動物数					3	5	4	3
	囊胞状内膜過形成			32	33	36	36			
子宫頸	萎縮	検査動物数					31	32	35	31
				12	0	0	34			
肝臓	萎縮	検査動物数	40	33	40	34	32	38	38	36
	慢性炎症		38	28	32	26	32	35	33	35
	巢状空胞化		5	3	4	2	2	6	2	1
肺	萎縮	検査動物数	40	33	40	34	32	38	38	36
	肺胞マクロファージ空胞化		5	2	4	6	4	3	2	2
	気管支/血管周囲の リンパ球浸潤増加		0	0	3	1	7	4	8	3
	肺胞/気管支上皮過形成		5	1	4	2	1	2	1	0
腎臓	萎縮	検査動物数	40	33	40	34	32	38	38	36
	囊胞		11	8	7	4	4	1	0	0
	血管周囲单核球浸潤		39	33	40	30	32	37	36	31
	慢性炎症		37	31	39	33	30	32	34	30
	尿細管上皮の微小結石		14	7	8	4	0	0	0	0
副腎 (皮質)	尿細管上皮の過形成	検査動物数	7	6	8	1	3	2	1	2
	被膜下細胞過形成		39	0	0	34	32	0	0	36
	巣状肥大		29	0	0	16	32	0	0	30
甲状腺	微小囊胞	検査動物数	39	0	0	34	32	0	0	35
			14	0	0	12	12	0	0	12
脾臓	微小囊胞	検査動物数	40	6	2	34	32	9	5	36
	髓外造血亢進		3	0	1	2	3	6	3	2
腺胃	被膜の炎症/線維化		3	5	0	1	0	0	0	1
	過形成	検査動物数	40	0	1	34	32	3	1	36
	胃腺拡張		6	0	0	6	8	1	0	14
腸間膜 リンパ節	過形成		8	0	0	8	5	1	0	6
	うつ血	検査動物数	40	1	1	33	30	4	3	36
胸腺	うつ血		6	0	1	1	3	2	1	1
	微小囊胞	検査動物数	33	1	1	27	28	0	1	28
	細網細胞過形成		3	1	0	7	2	0	0	2
眼	微小囊胞		0	1	1	0	5	0	1	0
	破裂	検査動物数	40	9	13	34	32	5	3	36
	角膜ミオル沈着		2	2	5	4	1	0	1	0
坐骨神経	角膜ミオル沈着		7	1	3	3	7	1	1	4
	眼球後部出血/炎症		22	5	5	18	11	2	2	11
精巢	眼球後部出血/炎症	検査動物数	40	0	0	34	31	0	0	36
	変性		8	0	0	5	9	0	0	1
精囊	変性	検査動物数	40	1	2	34				
	分泌增加(拡張)		5	0	0	4				
骨髄 (胸骨)	顆粒球系細胞過形成	検査動物数	40	0	0	34	32	0	0	36
			8	0	0	4	3	0	0	2
骨髄 (大腿骨)	顆粒球系細胞過形成	検査動物数	40	0	0	34	32	0	0	36
			8	0	0	4	3	0	0	2
皮膚、他	顆粒球系細胞過形成	検査動物数	40	7	10	16	6	9	4	14
	耳、潰瘍/炎症		5	5	7	12	5	6	4	12
	潰瘍		5	3	1	3	1	0	0	3

b: p<0.01 (Fisher の直接確率法) (その他 Fisher-Irwin の不均一性に関する直接確率法による検定の結果、有意差なし。)

表1-3：非腫瘍性病変発生頻度-79週最終屠殺対象動物：全動物（死亡・瀕死期+計画殺）

臓器	性別 変化/投与量 (ppm)	雄				雌			
		0	15	150	500/400/300	0	15	150	500/400/300
卵巣	萎縮	検査動物数				50	42	45	50
	卵胞囊胞					0	0	0	14 b
	血液囊胞					36	34	33	28
子宮	萎縮	検査動物数				7	5	4	3
	囊胞状内膜過形成					50	45	48	50
子宮頸	萎縮	検査動物数				0	0	0	19 b
						42	38	40	34
肝臓	萎縮	検査動物数				50	11	9	45
	慢性炎症					0	0	1	15 b
	巢状空泡化					42	41	40	37
肺	肺胞マクロファージ空泡化	検査動物数	50	50	50	50	50	50	50
	気管支／血管周囲のリバ球浸潤増加		42	33	36	28	42	41	37
	肺胞／気管支上皮過形成		5	3	4	2	2	6	1
	肺胞マクロファージ空泡化		50	50	50	50	50	50	50
腎臓	囊胞	検査動物数	50	50	50	50	50	50	50
	血管周囲单核球浸潤		11	8	9	6	4	2	1
	慢性炎症		48	46	48	37	46	44	43
	尿細管上皮の微小結石		45	44	49	43	46	36	40
	尿細管上皮の過形成		14	8	8	6	1	0	1
副腎 (皮質)	被膜下細胞過形成	検査動物数	7	0	0	5	0	0	0
	巢状肥大		49	17	10	50	50	12	12
			35	9	6	18	50	11	11
甲状腺	微小囊胞	検査動物数	49	16	10	50	50	12	12
			16	5	3	13	13	3	12
脾臓	髓外造血亢進	検査動物数	50	23	12	50	50	21	17
	被膜の炎症／線維化		5	2	3	4	8	11	4
腺胃	過形成	検査動物数	3	8	0	2	0	1	0
	胃腺拡張		50	17	11	50	50	15	13
			6	0	0	7	9	1	1
腸間膜 リンパ節	過形成	検査動物数	8	0	0	8	6	1	0
	うつ血		50	17	11	45	46	13	14
胸腺	微小囊胞	検査動物数	7	1	1	1	4	4	1
	細網細胞過形成		38	11	11	34	40	6	11
			4	2	1	7	3	0	1
眼	破裂	検査動物数	0	1	1	0	5	0	1
	角膜ミセル沈着		50	26	23	50	50	17	15
	眼球後部出血／炎症		10	3	3	5	10	1	1
坐骨神経	眼球後部出血／炎症	検査動物数	23	6	5	20	12	3	11
	変性		49	17	9	50	49	12	12
精巢	変性	検査動物数	9	0	0	5	14	2	2
			50	18	12	50			
精囊	分泌增加(拡張)	検査動物数	7	1	1	6			
			50	27	21	50			
骨髄 (胸骨)	顆粒球系細胞過形成	検査動物数	5	12	9	0			
			50	17	10	50	50	12	12
骨髄 (大腿骨)	顆粒球系細胞過形成	検査動物数	15	9	4	10	10	4	3
			50	17	10	50	50	12	12
皮膚, 他	耳 潰瘍／炎症	検査動物数	15	9	4	10	10	4	3
	潰瘍		50	16	13	23	10	10	8
			9	8	7	16	5	6	7
			11	11	3	6	3	1	2
									5

b: p<0.01 (Fisher の直接確率法) (その他 Fisher-Irwin の不均一性に関する直接確率法による検定の結果、有意差なし。)

表 II-1 : 腫瘍性病変発生頻度- 79週最終屠殺対象動物：死亡および瀕死期殺動物

臓器	性別 変化/投与量 (ppm)	雄				雌			
		0	15	150	500/400/300	0	15	150	500/400/300
卵巢	顆粒膜／炭膜細胞腫 (B) 検査動物数	18				18	11	12	14
	0	1	0	0		0	1	0	0
子宮	内膜間質乳頭腫 (B) 検査動物数	18				18	12	12	14
	1	0	0	0		1	0	0	0
肝臓	血管腫 (B) 検査動物数	1				0	0	0	0
	0	1	1	0		1	0	0	0
肺	肝細胞癌 (M) 検査動物数	10				18	12	12	14
	1	0	1	0		0	0	1	0
脾臓	細気管支-肺胞腺腫 (B) 検査動物数	1				1	0	0	0
	0	0	0	1		2	1	0	0
乳腺	細気管支-肺胞癌 (M) 検査動物数	10				18	12	12	14
	0	0	0	0		1	0	0	0
ハダニ線	癌 (M) 検査動物数	0				15	7	10	9
	0	0	0	0		2	0	0	0
皮下織	腺腫 (B) 検査動物数	0				0	0	1	0
	0	0	0	0		0	0	1	0
造血器	線維肉腫 (M) 検査動物数	2				5	2	2	0
	0	0	0	0		0	1	0	0
リンパ腫 (B) 組織球性肉腫 (M)	リンパ腫 (B) 検査動物数	10				18	12	12	14
	1	3	1	0		3	1	3	1
	組織球性肉腫 (M)	0				2	2	2	2

(Dinse-Lagakos の傾向および不均一性に関する logistic prevalence 法による検定の結果、有意差なし。)

M : 悪性腫瘍, B : 良性腫瘍

表II-2：腫瘍性病変発生頻度-79週最終屠殺対象動物：計画殺動物

臓器	性別 変化/投与量 (ppm)	雄				雌			
		0	15	150	500/400/300	0	15	150	500/400/300
卵巢	検査動物数					32	31	33	36
	腺腫 (B)					3	1	1	0
	血管腫 (B)					0	1	0	0
	顆粒膜/莢膜細胞腫 (B)					0	0	1	1
子宮	未分化胚細胞腫 (B)					0	0	0	1
	検査動物数					32	33	36	36
	内膜間質乳頭腫 (B)					2	2	0	1
子宮頸	平滑筋腫 (B)					0	0	1	1
	血管肉腫 (M)					0	1	0	0
肝臓	検査動物数	40	33	40	34	32	38	38	36
	肝細胞腺腫 (B)	5	4	5	0	0	0	0	0
	肝細胞癌 (M)	1	3	0	0	0	0	0	0
	血管肉腫 (M)	1	1	0	0	0	0	0	0
肺	検査動物数	40	33	40	34	32	38	38	36
	細気管支-肺胞腺腫 (B)	5	7	4	4	5	3	5	4
	細気管支-肺胞癌 (M)	5	6	5	1	4	1	1	3
	腺腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0
脾臓	検査動物数	40	6	2	34	32	9	5	36
	血管肉腫 (M)	0	0	1	0	1	2	0	1
盲腸	検査動物数	40	0	0	34	32	1	0	36
	線維腫 (B)	0	0	0	0	0	1	0	0
腔	検査動物数					32	0	0	36
	平滑筋肉腫 (M)					0	0	0	1
	腺腫 (B)					0	0	0	0
	癌 (M)					0	0	0	0
皮下織	検査動物数	1	0	1	0	0	0	0	0
	血管腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0
舌	検査動物数	0	0	1	0	0	0	0	0
	扁平上皮乳頭腫 (B)	0	0	1	0	0	0	0	0
造血器	検査動物数	40	6	2	34	32	9	6	36
	リンパ腫 (B)	0	0	0	0	2	1	1	0
	組織球性肉腫 (M)	1	0	0	0	1	0	2	1
	顆粒球性白血病 (M)	0	0	0	1	0	0	0	0

(Dinse-Lagakos の傾向および不均一性に関する logistic prevalence 法による検定の結果、有意差なし。)

M : 悪性腫瘍, B : 良性腫瘍

表II-3：腫瘍性病変発生頻度-79週最終屠殺対象動物：全動物（死亡・瀕死期+計画殺）

臓器	性別 変化/投与量 (ppm)	雄				雌			
		0	15	150	500/400/300	0	15	150	500/400/300
卵巢	検査動物数					50	42	45	50
	腺腫 (B)					3	1	1	0
	血管腫 (B)					0	1	0	0
	顆粒膜/表膜細胞腫 (B)					0	1	1	1
子宮	未分化胚細胞腫 (B)					0	0	0	1
	検査動物数					50	45	48	50
	内膜間質乳頭腫 (B)					3	2	0	1
	平滑筋腫 (B)					0	0	1	1
	血管腫 (B)					1	0	0	0
子宮頸	血管肉腫 (M)					0	1	0	0
	癌 (M)					50	11	9	45
	検査動物数					0	0	0	1
肝臓	平滑筋腫 (B)					50	50	50	50
	検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50
	肝細胞腺腫 (B)	5	4	5	0	0	0	0	0
	肝細胞癌 (M)	2	3	0	0	0	0	0	0
肺	血管肉腫 (M)	2	2	1	0	1	0	0	0
	検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50
	細気管支-肺胞腺腫 (B)	6	7	5	4	5	3	6	4
副腎 (皮質)	細気管支-肺胞癌 (M)	6	6	5	2	6	2	1	3
	検査動物数	49	17	10	50	50	12	12	50
脾臓	腺腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0
	検査動物数	50	23	12	50	50	21	17	50
腎臓	血管肉腫 (M)	0	0	1	0	2	2	0	1
	検査動物数	50	17	10	49	50	13	12	49
盲腸	線維腫 (B)	0	0	0	0	0	1	0	0
	検査動物数	50	12	12	50	50	12	12	50
乳腺	平滑筋肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1
	検査動物数	50	7	10	27	50	7	10	27
ハグ一線	癌 (M)	2	0	0	0	2	0	0	0
	検査動物数	31	0	1	0	0	0	1	0
	腺腫 (B)	1	0	0	0	0	0	1	0
皮下織	癌 (M)	0	0	1	0	0	0	0	0
	検査動物数	3	0	2	2	5	2	2	0
	血管腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0
舌	線維肉腫 (M)	0	0	0	0	0	1	0	0
	検査動物数	0	0	1	0	0	0	0	0
造血器	扁平上皮乳頭腫 (B)	0	0	1	0	0	0	0	0
	検査動物数	50	23	12	50	50	21	18	50
	リッパ腫 (B)	1	3	1	0	5	2	4	1
	組織球性肉腫 (M)	1	0	1	0	3	2	4	3
	顆粒球性白血病 (M)	0	0	0	1	0	0	0	0

(Dinse-Lagakos の傾向および不均一性に関する logistic prevalence 法による検定の結果、有意差なし)、M: 悪性腫瘍、B: 良性腫瘍

表III：腫瘍総数および腫瘍保有動物数-79週最終屠殺対象動物：全動物（死亡・瀕死期殺+計画殺）

	性別 投与量 (ppm)	雄				雌			
		0	15	150	500/400/300	0	15	150	500/400/300
良性腫瘍	検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50
	腫瘍総数	16	11	11	4 b	10	9	11	9
	腫瘍保有動物数	14	10	10	4 a	7	8	9	7
悪性腫瘍	検査動物数	12	14	9	3 a	21	11	9 a	9 a
	腫瘍総数	11	12	9	3 a	16	9	9	9
総原発腫瘍	検査動物数	28	25	20	7 b	31	20 a	20 a	18 a
	腫瘍保有動物数	21	20	18	6 b	19	15	17	16
重複腫瘍保有動物数		4	1	2	0	9	4	1 a	1 a
転移腫瘍保有動物数		1	1	0	1	2	1	0	0
造血器系腫瘍保有動物数		2	3	2	1	8	4	8	4

a: p<0.05, b: p<0.01 (Fisher の直接確率法)

(8) 繁殖毒性および催奇形性

1) 繁殖毒性

①ラットを用いた2世代繁殖毒性試験

(資料T-22)

試験機関 三菱化学安全科学研究所 [G.I.P対応]

報告書作成年 1999年

被験物質：

試験動物：SD系ラット、1群雌雄各30匹（F0親動物）

F0世代投与開始時6週齢（体重 雄189～234g、雌144～179g）

投与期間：F0世代- 雌雄とも交配前（10週間、雄の解剖日まで）、交配、妊娠/分娩/哺育（雌）、
F1児の離乳（分娩後21日）まで投与。

F1世代- 雌雄とも離乳（3週齢）から交配前（10週間、雄の解剖日まで）、交配、
妊娠/分娩/哺育（雌）、F2児の離乳まで投与。

（投与期間：F0親投与開始1998年2月9日～F2児離乳開始9月30日）

投与方法：被験物質を飼料中に混入し、2世代にわたって連続的に自由摂取させた。投与量
は0、0.75、1.5、3mg/kg/dayに設定し、これらの被験物質摂取量が達成されるよ
うに混餌濃度を全投与期間にわたって適宜調整した。被験物質を混入した飼料は、
ほぼ毎週調製した。

投与量の設定根拠：

被験物質摂取量：摂餌量、体重および混餌濃度から算出された1日あたりの平均被験物質摂取量を次表に示す。

各投与群の交配前期間、妊娠期間および哺育期間の平均被験物質摂取量は、雌雄ともにいずれの世代においても設定用量の±20%以内であり、各測定日毎の変動も設定用量の±30%以内であった。

性 別		雄		
投与量(mg/kg/day)		0.75	1.5	3
F0	交配前 10 週間	0.7127	1.389	2.804
	交配後 4 週間	0.6936	1.396	2.869
F1	交配前 10 週間	0.7092	1.450	2.820
	交配後 2 週間	0.7094	1.375	2.881
性 別		雌		
投与量(mg/kg/day)		0.75	1.5	3
F0	交配前 10 週間	0.7595	1.512	3.048
	妊娠期間	0.7620	1.593	3.066
	哺育期間	0.7290	1.434	2.912
F1	交配前 10 週間	0.7810	1.585	3.052
	妊娠期間	0.6994	1.477	2.836
	哺育期間	0.6885	1.339	2.766

表中の数値の単位 : mg/kg/day

検査項目：試験の流れに沿った検査項目の概要を表 I に示す。

<親動物 (F0、F1) >

一般状態および死亡：投与期間を通じて、全動物の一般状態および死亡の有無を毎日観察した。

体重および摂餌量：雄では投与期間を通じて週1回、雌では交配前期間は週1回、交尾以降、妊娠0、7、14、20日および哺育0、4、7、14、17、21日に測定した。また、摂餌効率（体重増加量÷摂餌量×100）も算出した。

性周期：交配開始前21日間および交配期間中に毎日膣垢を採取して検査した。平均性周期日数を算出するとともに性周期が4~6日周期でないものは不整性周期とし、その発現率を算出した。

交配：雄1雌1の交配対を設け、最長8日間昼夜同居させた。膣栓または膣垢標本中に精子が観察された場合を交尾成立と判断し、その日を妊娠0日とした。なお、妊娠の判断は出産または着床痕の有無により最終的に確認した。
これらの観察結果から次の項目を算出した。

交尾所要日数

交尾成立までに逸した発情期の回数

交尾率 (%) = (交尾動物数 ÷ 同居動物数) × 100

受胎率 (%) = (妊娠動物数 ÷ 交尾動物数) × 100

精子検査：剖検時、精巣上体尾部の重量を測定した。その後、緩衝液 5 mL 中で精巣上体尾部を細切した液を精子原液として次の項目を検査した。

精子活性 = 5 段階評価

精子生存率 (%) = ベキスト 33258 の蛍光色素染色後、精子 100 個中の死滅精子数を計数し、生存率を算出した。

精子数 = 精巣上体尾部 1 gあたりの精子数

精子形態異常 = 塗抹標本をエゾン Y で染色し、頭部と尾部が分離していない精子 200 個中の形態異常精子を計数し、発現率を算出した。

また、精子 100 個中の頭部と尾部が分離している精子を計数し、Tailless Sperm の発現率を算出した。

分娩および哺育の観察：妊娠 21 日から 25 日まで最低 1 日 2 回分娩の観察を行い、哺育中は 1 日 1 回観察した。これらの観察結果から次の項目を算出した。

妊娠期間

出産率 (%) = (生存児出産雌数 ÷ 妊娠雌数) × 100

出生率 (%) = (出産生存児数 ÷ 着床数) × 100

病理学的検査：雄は交配終了後（交尾した雄は射精から 2 日以上の回復期間の後）、分娩した雌は哺育終了後（離乳後）、非分娩雌は交尾確認後 26 日、未交尾雌は交配期間終了後 14 日に剖検に供した。また、全生存動物について次の器官重量を測定するとともに、剖検時の体重をもとに体重比も算出した。雌は、剖検日の午前中に膀胱を採取し、性周期のステージを検査した。なお、死亡、瀕死動物および全出生児が死亡した雌は発見後速やかに剖検した。

脳、下垂体、胸腺、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、精巣、精巣上体（全体および尾部）、精囊（凝固腺および内容を含む）、前立腺（腹葉）、卵巣、子宮（頸部を含む）

全動物から次の器官および組織を採取し、固定保存した。また、対照群および 3 mg/kg/day 群の下記識別(*) 器官・組織に関して、染色標本を作製して鏡検した。なお、精巣上体は縦断切片を、卵巣は左右各 5 切片を検査した。

脳、下垂体*、胸腺、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、精巣*、精巣上体*、精囊*、凝固腺*、前立腺(腹葉)*、卵巣*、卵管*、子宮(頸部を含む)*、臍*、肉眼的異常部位*

なお、死亡例、瀕死期殺例および全出生児が死亡した雌については、原因究明のため上記の器官・組織以外に心臓、胸腺、脾臓、肺、肝臓、腎臓、胃、腸管、副腎および乳腺等についても病理組織学的検査を行った。

<児動物 (F1、F2) >

観察：出生日に出産児数（生存児数、死亡児数）、性別および外観異常の有無を検査した。その後は、一般状態および死亡の有無を毎日観察した。また、体重を個体ごとに出生日、生後 4、7、14、21 日に測定した。生後 4 日に同腹児数を無作為に 8 匹（可能な限り雌雄同数）に調整した。F1 児は生後 21 日に各群各腹から雌雄

各1匹を無作為に選抜し、継代用動物とした。これらの観察・検査から次の項目を算出した。

$$\text{出産時生存率} (\%) = (\text{出産時の生存児数} \div \text{出産児数}) \times 100$$

$$4\text{日生存率} (\%) = (\text{生後4日の生存児数} \div \text{出産時の生存児数}) \times 100$$

$$\text{離乳率} (\%) = (\text{離乳時の生存児数} \div \text{児数調整後の児数}) \times 100$$

生後形態分化：全児について、生後2～4日に耳介展開の発現の有無を観察し、発現率を算出した。また、眼瞼開裂、陰茎亀頭包皮分泌腺開裂（雄）および膣開口（雌）の発現日を検査した。

反射反応性：児数調整後のF1児全例について、平面正向反射、自由落下反射および瞳孔反射を検査した。

病理学的検査：継代用に選抜されなかった全てのF1児および全てのF2児は、生後21日に剖検に供した。また、各腹あたり雌雄各1匹を無作為に選抜し、次の器官重量を測定し、剖検日の体重をもとに対体重比も算出した。

脳、脾臓、胸腺

全動物から脳、脾臓、胸腺を採取し、固定した。また、対照群および3mg/kg/day群の脾臓および胸腺に関して、染色標本を作製して鏡検した。

なお、F2児において生後初期に腹腔内黒色化がみられ、生後4日に剖検した3mg/kg/day群の3例には空腸および回腸に暗緑色を呈した異常内容物がみられたので、その内2例および対照群の2例の当該器官を同様に病理組織学的検査に供した。

試験結果：親動物および児動物の検査成績をそれぞれ表II-1～4に示す。

<親動物(F0、F1)への影響>

F0およびF1動物ともに雄では3mg/kg/day群、雌では1.5mg/kg/day以上の群で体重増加抑制、摂餌量の減少がみられ、さらに、F0雌では3mg/kg/day群で妊娠末期に3例が死じまたは瀕死期殺された。器官重量、剖検および病理組織検査においては、F0およびF1動物とも被験物質に起因する変化はみられなかった。

繁殖機能への影響として、F0雌3mg/kg/day群で難産、遷延分娩の分娩異常、妊娠期間の延長、全出産児死亡、出産率および出生率の低下がみられた。これらの分娩異常は死亡、瀕死期殺および全出産児死亡例で観察され、これらの母動物には病理組織学的検査において全身状態の悪化を示唆する所見（表II-1、F0親）が認められた。このことから、これらの母動物では交配前から妊娠期間を通じた顕著な摂餌量減少による低栄養状態に加えて、娩出時の過度の出血と衰弱が原因となり、分娩異常、死亡あるいは全出産児死亡が生じたものと推察された[#]。

[#]申請者注：本試験でF0母動物の3mg/kg/day群にみられた分娩異常（難産、遷延分娩）は、本試験のF1母動物、あるいは同施設で同種の試験（繁殖予備試験、次世代免疫毒性試験（資料T-23）においても全くみられなかった。したがって、これらの分娩異常は、母動物の内分泌系や神経系あるいは子宮筋へ及ぼす被験物質の直接的な影響に起因する可能性は低いと考えられる。むしろ、上記で述べられているように、摂餌量の減少、低体重が示唆する一般毒性学的な悪影響に分娩時の出血と衰弱の負荷が加わったことにより、二次的に一部の母動物でみられた変化であると推察する。

性周期、精子検査、卵胞数、交尾率、受胎率、哺育行動においては F0 および F1 動物とも被験物質に起因する変化はみられなかった。

<児動物 (F1、F2) への影響>

F1 動物では 1.5mg/kg/day 以上の群、F2 動物では 3mg/kg/day 群で低体重、生後の体重増加抑制、耳介展開および眼瞼開裂の遅延がみられた。また、生後初期に小腸への暗緑色内容物貯留による腹腔内黒色化がみられた。さらに、F1 動物では 3 mg/kg/day 群で出産生存児数の減少、出生時および 4 日生存率の低下、平面正向反射成立日の遅延がみられた。F1 動物の離乳後の陰茎亀頭包皮分泌腺開裂には被験物質の影響はみられなかった。なお、離乳時の胸腺重量において、統計学的に有意な低値が F1 動物では 3mg/kg/day 群の雌雄、F2 動物では全被験物質投与群の雄および 1.5mg/kg/day 以上の群の雌でみられたが、病理組織変化を伴わない軽微な変化であり、F0 および F1 親動物ではみられなかった。さらに、次世代免疫毒性検討試験（資料 T-23）において F1 および F2 動物の免疫機能を検討した結果、いずれの世代およびいずれの用量（0.75 および 3 mg/kg/day）においても液性・細胞性免疫機能に異常はみられなかったことから、本試験でみられた胸腺重量の低下は毒性学的意義に乏しい変化と判断された。

以上、親動物には一般毒性学的影響が F0 および F1 動物ともに雄で 3 mg/kg/day 群、雌で 1.5 mg/kg/day 以上の群、雌の繁殖機能への影響が F0 動物の 3 mg/kg/day 群でみられた。また、F1 動物の 1.5 mg/kg/day 以上の群、F2 動物の 3 mg/kg/day 群で発育抑制がみられた。しかし、0.75 mg/kg/day 群では親動物への一般毒性学的影響および繁殖機能への影響ならびに次世代への毒性はみられなかった。したがって、無毒性量は親動物および児動物とも 0.75 mg/kg/day と考えられた。また、繁殖に対する無毒性量は 1.5mg/kg/day と考える[#]。

[#] 申請者注：原報には繁殖に対する無毒性量の記載がない。申請者は 3mg/kg/day 群でみられた F0 親動物における分娩異常などの繁殖機能への影響に基づき繁殖に対する無毒性量を 1.5 mg/kg/day と考える。

表 1. 試験の流れと検査概要

世代	期間	作業手順	主要な検査項目
F0	交配前 (10週)		<ul style="list-style-type: none"> ◆ 一般状態観察、体重・摂餌量測定 ◆ 性周期検査 (♀)
	交配 (8日)	♂♀ 1対同居	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 交尾状況の観察 ◆ 性周期検査 (♀)
	妊娠 (3週)		<妊娠♀ (♂) > <ul style="list-style-type: none"> ◆ 一般状態観察、体重・摂餌量測定 <♂> <ul style="list-style-type: none"> ◆ 精子検査、器官重量、剖検および組織検査
	哺育 (3週)	分娩	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 出産状況の観察・検査 娩出児：生存児数、死亡児数、性別、外表観察、体重 分娩しない♀：剖検、着床痕の確認
		児数調整 (生後4日)	<授乳♀> <ul style="list-style-type: none"> ◆ 一般状態観察、体重・摂餌量測定 <哺育児> <ul style="list-style-type: none"> ◆ 一般状態観察、体重測定 ◆ 生後形態分化の検査 ◆ 反射反応性の検査
		離乳(生後21日) 継代用動物の選抜	<授乳♀> <ul style="list-style-type: none"> ◆ 器官重量、剖検および組織検査 <離乳後の余剰児> <ul style="list-style-type: none"> ◆ 器官重量、剖検および組織検査 (胸腺、脾臓)
F1	交配前 (10週)	(F0世代と同様)	(F0世代と同様)
	交配 (8日)	(F0世代と同様)	(F0世代と同様)
	妊娠 (3週)	(F0世代と同様)	(F0世代と同様)
	哺育 (3週)	離乳(生後21日)	(F0世代と同様。ただし、生後形態分化の包皮分離および 脛開口、ならびに反射反応性の検査は非実施。)

統計学的解析法

- ・離乳までの出生児に関するデータ（体重、外表異常の発現率、生後形態分化、反射反応性）は、各腹ごとに算出した値を標本単位とした。
- ・統計手法および解析対象項目
 - 多重比較検定：体重、体重増加量、摂餌量、摂餌効率、器官重量、着床数、出産児数、出生児数、性周期日数、原始卵胞数、一次卵胞数、精子数
 - Kruskal-Wallis 検定と Dunnett 型の多重比較検定：交尾所要日数、交尾成立までに逸した発情期の回数、妊娠期間、出生率、出生時生存率、4日生存率、離乳率、外表異常の発現率、生後形態分化、反射反応性、精子生存率、精子形態異常の発現率
 - a × b の χ^2 検定および Armitage の χ^2 検定：精子活性、病理組織所見
 - Fisher の直接確率法：交尾率、妊娠率、出産率、性比 (雄/雌)、不整性周期動物の発現率

表II-1. F0親

投与群(mg/kg/day)		0	0.75	1.5	3	
動物数	雄／雌	30/30	30/30	30/30	30/30	
死亡数	雄	0	0	0	0	
	雌	0	0	0	3(難産死2, 懶死殺1)	
一般状態	雄／雌	—	—	—	—	
体重増加量(g)	雄 交配前(0-70日)	316.3	319.4	309.6	295.4	
	雌 交配前(0-70日)	144.0	140.6	134.1	117.1b	
	妊娠中(0-20日)	143.8	142.2	127.5a	110.6b	
	哺育中(0-21日)	-9.7	-9.3	18.6b	39.4b	
摂餌量(g)	雄 交配前(70日)	25.3	26.3	24.8	23.2b	
	雌 交配前(70日)	15.6	15.6	14.7	14.0b	
	妊娠中(20日)	23.4	23.7	23.4	19.0b	
	哺育中(21日)	83.5	82.8	81.6	73.3a	
性周期	平均性周期日数	4.50	4.37	4.37	4.14	
	不整性周期動物の頻度	5/30	1/30	1/30	4/30	
生殖能	交尾所要日数	2.3	2.2	2.1	2.2	
	交尾成立までに逸した発情期の回数	0.0	0.0	0.0	0.0	
	交尾率(%)	27/30(90.0)	28/30(93.3)	29/30(96.7)	30/30(100)	
妊娠期間(日)	受胎率(%)	24/27(88.9)	26/28(92.9)	26/29(89.7)	29/30(96.7)	
	妊娠期間(日)	22.1	22.1	22.3	22.5b	
	着床数	16.3	16.3	14.9	15.0	
分娩異常(難産または遷延分娩)の頻度		0/24	0/26	0/26	4/29	
全出産児死亡の頻度		0/24	0/26	0/26	4/29	
出生率(%)		88.38	87.71	85.93	71.51	
出産率(%)		24/24(100)	26/26(100)	26/26(100)	22/29(75.9)a	
器官重量	絶対重量(g)	雄 最終体重(g)	577.1	577.0	570.2	
		脳	2.228	2.182	2.213	
		胸腺(X10 ⁻³)	241.3	211.3	239.4	
		脾臓	0.881	0.830	0.846	
		副腎(X10 ⁻³)	58.79	58.56	60.61	
		精巣	3.462	3.420	3.561	
		精巣上体	1.262	1.254	1.278	
	雌	最終体重(g)	340.3	339.5	337.9	
		脳	1.997	2.015	1.983	
		胸腺(X10 ⁻³)	149.3	145.1	160.2	
		脾臓	0.604	0.618	0.575	
	対体重比(g/100g体重)	雄 脳	0.388	0.382	0.390	
		胸腺(X10 ⁻³)	41.96	36.87	42.12	
		脾臓	0.153	0.144	0.149	
		副腎(X10 ⁻³)	10.21	10.21	10.63	
		精巣	0.603	0.598	0.629	
		精巣上体	0.219	0.220	0.225	
	雌	脳	0.589	0.594	0.589	
		胸腺(X10 ⁻³)	43.93	42.50	47.24	
		脾臓	0.178	0.183	0.17	
精子検査		精子生存率(%)	83.2	85.2	84.6	
		精子数(X10 ⁶ /g)	813	831	840	
		形態異常(%)	0.5	0.5	0.5	
		Tailless Sperm(%)	0.8	1.4	1.0	
— : 特記すべき所見なし。 a : p<0.05, b : p<0.01						

(続く)

表II-1. F0親（続き）

＜分娩異常を示した3mg/kg/day群の母動物4例の病理所見＞

動物番号 運命	肉眼所見	組織所見 () : グレード [1:slight, 2: moderate, 3: severe]
No.50406 妊娠24日 に瀕死期 殺	腺胃のびらん／潰瘍、腎臓の暗褐色化、心 臓の褪色、胸腺の小型化、脾臓のろ胞の萎 縮、肺の退縮不全、肝臓の褪色、子宮の出 血、副腎の腫大	腺胃のびらん(1)、 胸腺の萎縮(3)、 脾臓の萎縮(2)、 副腎皮質束状帯の肥大(1)、 子宮の出血(3)、炎症性細胞浸潤(2)、壞死(2) 血栓(2)、 肝臓の壞死巣(1)、 腎臓の尿円柱(1)、遠位尿細管の拡張(1)、 近位尿細管上皮の空胞化(2)
No.50421 妊娠23日 に死亡	腺胃のびらん／潰瘍、腎臓の褪色、空腸粘 膜の出血	腺胃の潰瘍(1)、 空腸の潰瘍(1)、 子宮の出血(2)、炎症性細胞浸潤(2)、血栓(1)、 腎臓の遠位尿細管の拡張(1)、 近位尿細管上皮の空胞化(2)
No.50428 妊娠24日 に死亡	腺胃のびらん／潰瘍、腎臓の褪色	腺胃のびらん(1)、 脾臓の萎縮(1)、 子宮の出血(3)、壞死(2)、血栓(1)、 腎臓の近位尿細管上皮の空胞化(1)
No.50429 授乳0日 に全児死 亡	胸腺の小型化	胸腺の萎縮(3)、 子宮の出血(1)、炎症性細胞浸潤(1) 腎臓の近位尿細管上皮の空胞化(2)

表II-2. F1児

投与群(mg/kg/day)	0	0.75	1.5	3
出産児数	14.8	14.5	13.0	12.9
出産生存児数	14.3	14.3	12.7	10.7a
性比(雄/雌)	1.06(182/172)	1.25(210/168)	0.86(156/181)	1.06(161/152)
出産時生存率(%)	97.18	98.29	97.82	82.92
4日生存率(%)	99.22	98.31	97.99	91.08
離乳率(%)	100	99.52	100	99.43
外表異常 鎖肛・痕跡尾	—	—	—	—
一般状態 腹腔内黒色化	—	—	雄1(1腹)	雄9,雌2(5腹)
体重増加量(g) (雄/雌)	0-4日 4-7日 4-14日 4-21日	4.0/4.0 7.8/7.5 28.5/27.5 56.4/53.5	4.4/4.2 7.5/7.4 28.0/27.1 54.7/52.5	4.2/4.1 6.9a/6.7 26.6a/25.9 54.6/51.9
生後形態	耳介展開(雄/雌)(%) 2日 3日 4日	18.5/23.4 95.1/97.4 100/100	11.5/19.0 97.5/95.0 100/100	28.8/28.9 85.4/91.0 99.5/100
	眼瞼開裂(雄/雌)(%)	13.6/13.3	13.8/13.6	13.5/13.3
	陰茎亀頭包皮分泌腺開裂(雄)(日)	40.0	39.9	40.2
	瞳孔開口(雌)(日)	31.5	30.8	31.7
反射	平面正向(雄/雌)(日)	8.9/9.0	9.0/9.4	9.3/9.6
反応	自由落下(雄/雌)(日)	15.2/15.2	14.4b/14.6b	14.9/15.2
	瞳孔反射(雄/雌)(日)	14.0/13.8	14.1/13.9	13.9/13.7
器官重量	絶対重量(g) 雄 脳 胸腺(X10 ⁻³) 脾臓	67.5 1.543 293.0 0.348	65.6 1.515 285.7 0.345	66.6 1.508 277.0 0.361
	雌 最終体重(g) 脳 胸腺(X10 ⁻³) 脾臓	64.4 1.498 298.9 0.348	63.4 1.482 271.8 0.350	63.4 1.458 281.0 0.358
	対体重比(g/100g体重) 雄 脳 胸腺(X10 ⁻³) 脾臓	2.294 434.00 0.517	2.322 436.07 0.525	2.286 416.12 0.540
	雌 脳 胸腺(X10 ⁻³) 脾臓	2.338 462.96 0.540	2.354 429.79 0.552	2.320 442.92 0.564
剖検	(3週齢)	—	—	—
病理組織学的検査(離乳児の胸腺と脾臓)	—	—	—	—

— : 特記すべき所見なし, a : p<0.05, b : p<0.01

表II-3. F1親

投与群(mg/kg/day)		0	0.75	1.5	3
動物数	雄／雌	24／24	24／24	24／24	22／22
死亡数	雄	0	0	0	0
	雌	0	0	1(妊娠13日)	0
一般状態	雄／雌	—	—	—	—
体重 増加量 (g)	雄 交配前(0-70日)	459.5	469.8	464.3	435.8
	雌 交配前(0-70日)	237.3	251.8	231.2	226.0
	妊娠中(0-20日)	157.5	153.7	143.0	136.9b
	哺育中 (0-21日)	-9.8	-15.8	-2.5	16.8b
摂餌量 (g)	雄 交配前(70日)	27.7	27.0	26.7	24.8b
	雌 交配前(70日)	18.2	18.3	17.0	16.9
	妊娠中(20日)	26.4	26.7	26.4	23.9b
	哺育中 (21日)	84.1	78.7	75.6a	71.0b
性周期	平均性周期日数	4.68	4.53	4.50	4.44
	不整性周期動物の頻度	2/24	3/24	2/24	0/22
生殖能	交尾所要日数	2.8	2.7	2.4	2.6
	交尾成立までに逸した発情期の回数	0.0	0.0	0.0	0.0
	交尾率(%)	24/24(100)	22/24(91.7)	24/24(100)	21/22(95.5)
	受胎率(%)	24/24(100)	20/22(90.9)	24/24(100)	19/21(90.5)
妊娠期間(日)		22.2	22.2	22.3	22.2
着床数		17.5	17.1	15.7	16.1a
分娩異常(難産)の頻度		0/24	0/20	0/24	0/19
全出産児死亡の頻度		1/24	0/20	0/24	0/19
出生率(%)		85.62	86.52	86.28	87.46
出産率(%)		23/24(95.8)	20/20(100)	23/24(95.8)	19/19(100)
絶対重量 (g)	雄	最終体重(g)	579.0	593.8	580.2
		脳	2.246	2.231	2.211
		胸腺(X10 ⁻³)	365.0	340.1	354.5
		脾臓	0.927	0.931	0.856
		副腎(X10 ⁻³)	66.35	66.30	65.57
		精巢	3.703	3.678	3.753
		精巢上体	1.241	1.230	1.209
	雌	最終体重(g)	361.3	361.6	355.7
		脳	2.063	2.036	1.997a
		胸腺(X10 ⁻³)	208.7	176.9	202.0
		脾臓	0.661	0.638	0.644
					0.655
対体重比 (g/100g体重)	雄	脳	0.390	0.378	0.385
		胸腺(X10 ⁻³)	63.22	57.48	61.29
		脾臓	0.160	0.158	0.147
		副腎(X10 ⁻³)	11.50	11.18	11.31
		精巢	0.644	0.623	0.651
		精巢上体	0.217	0.208	0.213
	雌	脳	0.574	0.566	0.564
		胸腺(X10 ⁻³)	57.51	49.08	56.84
		脾臓	0.183	0.176	0.180
精子検査	精子生存率(%)	86.3	84.9	87.2	84.5
	精子数(X10 ⁶ /g)	742	717	756	729
	形態異常(%)	0.4	0.3	0.5	0.3
	Tailless Sperm(%)	1.0	0.8	2.5	0.9
剖検(週齢:F0雄21雌22, F1雄17雌20)		—	—	—	—
病理組織学的検査		—	—	—	—

—:特記すべき所見なし, a : p<0.05, b : p<0.01

表II-4. F2児

投与群(mg/kg/day)		0	0.75	1.5	3	
出産児数		16.1	15.7	13.9	14.3	
出産生存児数		15.5	14.8	13.4	14.1	
性比(雄/雌)		0.81(172/213)	0.92(150/163)	1.03(161/157)	0.99(135/137)	
出産時生存率(%)		92.86	94.06	95.22	98.52	
4日生存率(%)		95.18	96.82	97.69	94.99	
離乳率(%)		98.91	100	100	100	
外表異常	鎖肛・痕跡尾	1(1腹)	—	—	—	
	短尾	2(1腹)	—	—	—	
一般状態	腹腔内黒色化	—	—	—	雄3、雌6(3腹)	
体重増加量(g) (雄/雌)	0-4日	3.7/3.7	4.0/3.9	4.1/4.0	3.1/3.0a	
	4-7日	7.2/6.9	6.9/6.5	6.7/6.5	5.0b/4.9b	
	4-14日	27.0/26.2	26.9/25.5	26.1/25.5	23.0b/22.9b	
	4-21日	55.0/51.8	54.6/50.9	53.5/50.9	47.3b/45.9b	
生後形態	耳介展開(%) (雄/雌)	2日	14.7/18.7	10.0/10.6	17.6/19.8	
		3日	92.2/93.0	94.0/96.0	94.1/96.1	
		4日	98.6/100	100/98.9	94.4/92.5	
	眼瞼開裂(雄/雌)(日)	13.5/13.4	13.6/13.5	13.3/13.2	14.0a/13.8	
器官重量	絶対重量(g)	雄 最終体重(g)	65.6	66.5	66.4	
		脳	1.522	1.522	1.494	
		胸腺(X10 ⁻³)	299.3	263.0b	259.0b	
		脾臓	0.330	0.357	0.343	
	雌 最終体重(g)	62.3	60.8	61.2	55.5b	
		脳	1.483	1.462	1.443	
		胸腺(X10 ⁻³)	288.9	264.3	252.7a	
		脾臓	0.327	0.322	0.312	
	対体重比(g/100g体重)	雄 脳	2.330	2.297	2.262	
		胸腺(X10 ⁻³)	457.17	396.57b	390.32b	
		脾臓	0.501	0.538	0.518	
		雌 脳	2.400	2.417	2.371	
		胸腺(X10 ⁻³)	464.45	434.29	414.34a	
		脾臓	0.523	0.530	0.509	
剖検(3週齢)		—	—	—	—	
病理組織学的検査(離乳児の胸腺と脾臓)		—	—	—	—	

— : 特記すべき所見なし。 a : p<0.05, b : p<0.01

②ラットを用いた次世代免疫毒性検討試験

(資料T-23)

試験機関 三菱化学安全科学研究所
報告書作成年 1999年

試験目的 :

この試験は、被験物質をラットの妊娠・哺育期間からF2動物の成熟期まで経口投与し、F1およびF2動物の免疫機能に及ぼす影響に関して検討するため実施された。

被験物質 :

試験動物 : SD系ラット、1群雌15匹

F0雌の投与開始時10週齢(体重 女230~275g)

投与期間 : F0世代- 雌へ妊娠0日からF1児の離乳(分娩21日)まで(妊娠~分娩~哺育期間)投与。

F1世代- 雌雄とも離乳から交配前10週間、雄は交配後剖検まで、雌はF2児の離乳まで(妊娠~分娩~哺育期間)投与。

F2世代- 雄を離乳(3週齢)から成熟期(10週齢)まで投与。

(投与期間:F0雌投与開始1998年12月22日~F2動物屠殺開始1999年7月21日)

投与方法 : 被験物質を飼料中に混入し、3世代にわたって連続的に自由摂取させた。投与量は0、0.75、3mg/kg/dayに設定し、これらの被験物質摂取量が達成されるように混餌濃度を全投与期間にわたって適宜調整した。被験物質を混入した飼料は、ほぼ毎週調製した。

投与量の設定根拠 : 先に実施したラットの繁殖毒性試験(資料T-22)における低用量および高用量と同一とした。

被験物質摂取量 : 摂餌量、体重および混餌濃度から算出された1日あたりの平均被験物質摂取量を次表に示す。

各投与群の交配前期間、妊娠期間および哺育期間の平均被験物質摂取量は、雌雄ともにいずれの世代においても設定用量の±20%以内であり、各測定日ごとの変動も設定用量の±20%以内であった。

性別		雄		雌	
投与量(mg/kg/day)		0.75	3	0.75	3
F0	妊娠期間			0.8345	3.257
	哺育期間			0.7208	2.896
F1	交配前10週間	0.6754	2.767	0.7209	2.994
	妊娠期間			0.6776	2.826
F2	哺育期間			0.7880	3.052
	生育期間(7週間)	0.7385	3.063		

表中の数値の単位: mg/kg/day

検査項目：試験の流れに沿った検査項目の概要を表1に示す。

<親動物 (F0、F1、F2) >

一般状態および死亡：全試験期間を通じて、全動物の一般状態および死亡の有無を毎日観察した。

体重および摂餌量：F1 動物の交配前期間および F2 雄の離乳後の生育期間は週1回、F0 および F1 女の妊娠および哺育期間は頻繁に測定した。

分娩および哺育の観察：F0 女および F1 女について、妊娠 21 日から 25 日まで最低1日2回分娩の観察を行い、哺育中は1日1回観察した。これらの観察結果から次の項目を算出した。

妊娠期間

$$\text{出産率 (\%)} = (\text{生存児出産雌数} \div \text{妊娠雌数}) \times 100$$

$$\text{出生率 (\%)} = (\text{出産生存児数} \div \text{着床数}) \times 100$$

交配および妊娠の確認：F1 動物について、離乳後10週間投与後に雄1雌1の交配対を設け、7日間を限度に昼夜同居させた。陰栓または陰壺標本中に精子が観察された場合を交尾成立と判断し、その日を妊娠0日とした。なお、妊娠は出産または着床痕の有無により最終的に確認した (F0 女も同様)。

病理学的検査：F0 および F1 女は哺育終了後(離乳後)に剖検に供した。F1 動物は交配終了後(雄13種齢、雌20週齢)、F2 動物は10週齢時に各腹雄1例について次の器官重量を測定し、剖検日の体重をもとに対体重比も算出した。

脳、脾臓、胸腺

<児動物 (F1、F2) >

観察および検査：出生日に出産児数(生存児数、死亡児数)、性別および外表異常の有無を検査した。その後は、一般状態および死亡の有無を毎日観察した。また、頻繁に個体ごとに体重を測定した。生後4日に同腹児数を無作為に8匹(可能な限り雌雄同数)に調整した。F1 児は生後21日に各群各腹から雄3匹雌1匹を無作為に選抜し、継代用動物(雌雄各1匹)および免疫機能検査用動物(雄2匹)とした。F2 児は生後21日に各群10腹からそれぞれ雄3匹を無作為に選抜し、免疫機能検査用動物とした。これらの観察・検査から次の項目を算出した。

$$\text{出産時生存率 (\%)} = (\text{出産時の生存児数} \div \text{出産児数}) \times 100$$

$$4\text{日生存率 (\%)} = (\text{生後4日の生存児数} \div \text{出産時の生存児数}) \times 100$$

$$\text{離乳率 (\%)} = (\text{離乳時の生存児数} \div \text{児数調整後の児数}) \times 100$$

病理学的検査：全ての F1 児および全ての F2 児は、剖検に供した。また、F1 児では離乳時に、F2 児では生後4日と離乳時に各腹あたり雌雄各1匹を無作為に選抜し、次の器官重量を測定し、剖検日の体重をもとに対体重比も算出した。

脳、脾臓、胸腺

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

<F1 および F2 動物の免疫機能検査>

[血液学的検査]

[胸腺および脾臓リンパ球サブセット (FACS) 測定]

[KLH 遅発型過敏症反応 (DTH 応答性) の測定]

試験結果：親動物および児動物の検査成績を表II-1～8に示す。

<一般毒性・生殖毒性学的影響>

3 mg/kg/day 群で F0 母動物には体重増加抑制および摂餌量の減少、F1 動物には生存児数の減少、4 日生存率の低下、生後初期の小腸への暗緑色内容物貯留による腹腔内黒色化、体重増加抑制、F2 動物には腹腔内黒色化がみられた。これらの変化は先に実施された繁殖毒性試験（資料 T-22）でみられた変化とほぼ同様であった。

<免疫毒性学的影響>

胸腺および脾臓重量

生後 4 日において胸腺重量の低値が F1 雄で 0.75 および 3 mg/kg/day 群、雌で 3 mg/kg/day 群、F2 雄雄で 3 mg/kg/day 群において、脾臓重量の低値が F1 および F2 の雌雄とも 3 mg/kg/day 群でみられた。しかし、生後 21 日には胸腺重量の低値の程度は 3 mg/kg/day 群では有意であるものの軽減していた（例：雄 相対重量対照群比（生後 4 日⇒21 日）、F1 : 62.5%→84.2%、F2 : 66.0%→73.3%）。また、生後 21 日の脾臓、ならびに成獣（10 週）の胸腺および脾臓の重量変化はなく、いずれも対照群とほぼ同様な値を示した。生後 21 日および成獣での胸腺重量に関する知見は、繁殖毒性試験（資料 T-22）の成績とほぼ一致していた。

F2 10 週の雄の脾臓で相対重量が有意な低値を示したが、絶対重量では有意な変化がみられなかったこと、また、F1 交配後動物および繁殖毒性試験（資料 T-22）で同様の変化がみられなかったことから、偶発的な変化と考えられた。

これらのことから、胸腺および脾臓重量の低下は一過性の変化であり、生後の日数経過に伴い回復する変化であると考えられた。

末梢血の白血球数および白血球百分率

F2 10 週雄において分葉核好中球比が有意な高値を示したが、背景データの範囲内（平均値±標準偏差：7.9±3.7、最小～最大値：0～26%）の値であった。また、生後 21 日の検査では特に異常はみられなかった。さらに、ラットの亜急性毒性試験（資料 T-12）および慢性毒性発がん性併合試験（資料 T-20）においても同様な変化はみられなかった。これらのことから、本試験でみられた変化は被験物質に起因するものではないと考えられた。その他、白血球数および百分率については、いずれの検査時期においても変化はみられなかった。

胸腺および脾臓の cellularity およびリンパ球サブセット

胸腺および脾臓の cellularity およびリンパ球サブセットについて有意な変化がみられたのは、3 mg/kg/day 群のみであった。

生後 4 日および 21 日の F2 動物において、3 mg/kg/day 群で胸腺および脾臓の cellularity に有意な低値がみられた。これらの低値は概ねそれぞれの器官重量の低値を反映したものと考えられた。サブセットの百分率では、F2 生後 4 日の胸腺において CD4/CD8+細胞率の有意な高値がみられたが、他の細胞比率に変化がなく、その他の検査時期においても同様な傾向がみられなかったことから、偶発的な変化と考えられた。F2 生後 21 日

における脾臓の CD3+/CD45RA-細胞率および CD4+/CD8-細胞率の有意な低値が 3 mg/kg/day 群でみられたが、胸腺細胞が低下し、脾臓への供給が減少したことによる二次的な変化と考えられ、その結果、相対的に他の細胞比率が変化したものと考えられた。また、F2 生後 4 日の脾臓 CD3-/CD45RA+細胞率、および F2 生後 10 週の脾臓 CD3+/CD45RA-細胞率において有意な変動がみられたが、F2 生後 21 日における変動も含めてこれらの細胞比率の変動は総じて軽微なものであった。各サブセットの細胞数では、細胞比率に有意な差がみられなかったサブセットも含めて、有意な低値が各測定時点で散見されたが、いずれも cellularity の低値もしくは低値傾向によるものと考えられた。

免疫機能検査

F1 および F2 生後 10 週における SRBC に対する抗体産生（液性免疫）および KLH に対する遲発型過敏症反応（細胞性免疫）はいずれも対照群と同等であり、被験物質に起因する変化はみられなかった。

以上、被験物質を 3 世代にわたり経口投与し F1 および F2 動物の免疫機能に対する影響を検討した結果、3 mg/kg/day では胸腺および脾臓重量の低値、およびそれら器官の細胞数の低値とリンパ球サブセットの変化が、0.75 mg/kg/day では胸腺重量の低値がみられたが、これらの変化は生後の日数経過に伴い回復する傾向にあった。また、これらの変化にもかかわらず、成獣においては液性免疫および細胞性免疫機能に影響がみられなかつたことから、上記の変化の毒性学的意義が乏しく、被験物質は次世代に対する免疫毒性を有さないと考えられた。

表 I. 試験の流れと検査概要

世代	期間	作業手順	主要な検査項目
F0	妊娠（3週）		<妊娠♀> ◆一般状態観察、体重・摂餌量測定
	哺育（3週）	分娩	<分娩♀> ◆出産状況の観察・検査 娩出児：生存児数、死亡児数、性別、外表観察、体重 分娩しない♀：剖検、着床痕の確認
		児数調整 (生後4日)	<授乳♀> ◆一般状態観察、体重・摂餌量測定
		離乳(生後21日)	<哺育児> ◆一般状態観察、体重測定 <離乳後の授乳♀> ◆剖検 <離乳後の同腹児の各検査との対応（原則）> 腹内番号 性 離乳後の検査項目 1 ♂ 交配用動物：体重、摂餌量、交配後器官重量と剖検 2 ♂ 10週齢SRBC抗体産生 3 ♂ 10週齢DTH応答性 4 ♂ 3週齢器官重量、血液検査、FACS、剖検 5 ♀ 交配用動物：体重、摂餌量、剖検 6 ♀ 3週齢器官重量、剖検 7 ♀ 3週齢剖検 8 ♀ 3週齢剖検
F1	生育・交配前 (10週)		<交配用♂♀> ◆一般状態観察、体重・摂餌量測定 <10週齢♂> ◆SRBC抗体産生およびDTH応答性
	交配（7日）	♂♀1対同居	交尾状況の観察
	妊娠（3週）		<妊娠♀> ◆一般状態観察、体重・摂餌量測定 <交配終了後の♂> ◆器官重量測定、剖検
	哺育（3週）	分娩	<分娩♀> ◆出産状況の観察・検査 娩出児：生存児数、死亡児数、性別、外表観察、体重 分娩しない♀：剖検、着床痕の確認
		児数調整 (生後4日)	<授乳♀> ◆一般状態観察、体重・摂餌量測定 <哺育児> ◆一般状態観察、体重測定 <児数調整で除外された児♂♀各1例> ◆器官重量測定、FACS
		離乳(生後21日)	<授乳♀> ◆剖検 <離乳後の同腹児の各検査との対応（原則）> 腹内番号 性 離乳後の検査項目 1 ♂ 体重、摂餌量、10週齢器官重量、血液検査、FACS、剖検 2 ♂ 10週齢SRBC抗体産生 3 ♂ 10週齢DTH応答性 4 ♂ 3週齢器官重量、血液検査、FACS、剖検 5 ♀ 3週齢器官重量、剖検 6 ♀ 3週齢剖検 7 ♀ 3週齢剖検 8 ♀ 3週齢剖検
F2	生育（7週）		<生育♂> ◆一般状態観察、体重・摂餌量 ◆10週齢時に血液検査、FACS、剖検 <10週齢♂> ◆SRBC抗体産生およびDTH応答性

(次頁に続く)

表Ⅰ. 試験の流れと検査概要（続き）

統計学的解析法
・離乳までの出生児に関するデータは、各腹ごとに算出した値を標本単位とした。
・統計手法および解析対象項目
多重比較検定：体重、体重増加量、摂餌量、器官重量、血液検査、着床数、出産児数、出生児数、リンパ球サブセット陽性細胞率、DTH浮腫率、特異抗体血清希釈率
Kruskal-Wallis 検定と Dunnett 型の多重比較検定：妊娠期間、出生率、出生時生存率、4日生存率、離乳率
Fisher の直接確率法：性比（雄／雌）

表Ⅱ-1. F0母動物

投与群(mg/kg/day)	0	0.75	3	
動物数	15	15	15	
死亡動物数	0	0	0	
非妊娠雌数	0	1	0	
一般状態	-	-	-	
体重 (g)	妊娠中(20日) 哺育中(21日)	412.1 333.7	415.1 334.0	378.0b 328.9
体重増加量 (g)	妊娠中(20日) 哺育中(21日)	164.3 18.3	165.7 23.3	127.9b 44.8a
摂餌量 (g)	妊娠中(20日) 哺育中(21日)	23.1 70.0	22.9 69.6	20.3b 60.5b
妊娠期間(日)		21.9	21.9	21.9
着床数		15.8	16.1	14.1
分娩異常の頻度		0/15	0/14	0/15
哺育異常の頻度		0/15	0/14	0/15
出生率(%)		96.29	94.87	94.77
出産率(%)		15/15(100.0)	14/14(100.0)	15/15(100.0)
剖検（週齢：F0雌16）		-	-	-

—：特記すべき所見なし； a : p<0.05, b : p<0.01

表II-2. F1動物(離乳前)

投与群(mg/kg/day)		0	0.75	3
出産児数		15.3	15.3	13.4
出産生存児数		15.2	15.2	13.3
出産時性比(雄/雌)		109/120	95/119	97/104
出産時生存率(%)		99.59	99.58	99.16
4日生存率(%)		98.75	96.63	91.11
離乳率(%)		100.00	100.00	98.33
外表異常		-	-	-
一般状態	腹腔内黒色化(1~6口)	0	0	9腹
体重(g)	0日 (雄/雌)	6.3/5.9 10.3/9.9	6.5/6.1 10.4/9.9	5.9/5.6 8.8/8.3b
	4日			52.16/50.0b
	21日	60.9/58.4	61.0/58.3	43.26/41.6b
体重増加量(g)	0-4日 (雄/雌)	4.0/3.9 50.4/48.5	3.9/3.9 50.5/48.2	2.9/2.7a 43.26/41.6b
離乳前器官重量	検査対象児数(雄/雌)		12/15	11/14
	体重(g)(雄/雌)		10.5/9.9	10.1/10.0
	生後4日	絶対重量(g)	雄 脳	0.4299
			胸腺(X10 ⁻³)	27.8
			脾臓	0.0543
		雌	脳	0.4126
			胸腺(X10 ⁻³)	23.5
			脾臓	0.0422
	対体重比(g/100g体重)		雄 脳	4.12
		胸腺(X10 ⁻³)	265.0(100%)	
		脾臓	0.52(100%)	
	雌	脳	4.20	
		胸腺(X10 ⁻³)	237.0(100%)	
		脾臓	0.43(100%)	
	検査対象児数(雄/雌)		15/15	14/14
	体重(g)(雄/雌)		61.9/57.9	60.1/58.4
生後21日	絶対重量(g)	雄	脳	1.502
			胸腺(X10 ⁻³)	262.3
			脾臓	0.273
		雌	脳	1.450
			胸腺(X10 ⁻³)	258.9
			脾臓	0.278
	対体重比(g/100g体重)		雄 脳	2.431
		胸腺(X10 ⁻³)	424.18(100%)	
		脾臓	0.441(100%)	
	雌	脳	2.513	
剖検(3週齢)		全内臓逆位	0	0
- : 特記すべき所見なし ; a : p<0.05, b : p<0.01				1腹(1匹)

表II-3. F1動物(離乳後)

投与群 (mg/kg/day)		0	0.75	3	
動物数 (雄/雌)		12/12	12/12	12/12	
死亡動物数 (雄/雌)		0/1 (哺育16日)	1 (生後73日) /0	0/0	
非妊娠雌数		0	1	1	
一般状態		-	-	-	
交配前	体重 (g) (雄/雌)	28日 91日	101.8/91.8 508.9/291.3	104.5/93.9 504.8/292.2	
	体重増加量 (g) (雄/雌)	21-28日 21-91日	42.4/34.8 449.6/234.3	42.3/34.9 442.5/233.2	
	摂餌量(g) (雄/雌)	35日 91日	14.7/14.0 25.8/18.3	16.2/14.2 25.2/17.3	
				14.0/12.5a 24.0/17.0	
妊娠・哺育	体重 (g)	妊娠中(20日) 哺育中 (21日)	436.7 348.3	433.5 352.2	
	体重増加量 (g)	妊娠中(20日) 哺育中 (21日)	135.7 -4.5	135.8 21.4a	
	摂餌量 (g)	妊娠中(20日) 哺育中 (21日)	23.3 77.5	22.3 77.0	
				22.5 71.3a	
妊娠期間(日)		22.1	22.2	22.1	
着床数		14.7	15.5	15.3	
分娩異常の頻度		0/12	0/11	0/11	
哺育異常の頻度		0/12	0/11	0/11	
出生率(%)		90.43	86.26	79.50	
出産率(%)		12/12(100.0)	11/11(100.0)	11/11(100.0)	
器官重量	検査対象動物数 (雄)		12	12	
	体重(g)		533.2	528.6	
	絶対重量 (g)	雄 脳	2.113	2.133	
		胸腺(X10 ⁻³)	397.1	409.3	
		脾臓	0.955	0.921	
	対体重比 (g/100g 体重)	雄 脳	0.398	0.404	
		胸腺(X10 ⁻³)	74.18 (100%)	77.11 (103.9%)	
		脾臓	0.178 (100%)	0.174 (98.7%)	
剖検 (週齢: 雄14, 雌16)		雄: 腎盂拡張	1	1	
		雌:	-	-	

*: 特記すべき所見なし; a : p<0.05, b : p<0.01

表 II-4. F2 動物（離乳前）

投与群(mg/kg/day)		0	0.75	3
出産児数		13.3	13.7	12.5
出産生存児数		13.2	13.3	12.2
出産時性比（雄/雌）		74/85	86/65a	69/68
出産時生存率(%)		99.36	96.85	98.15
4日生存率(%)		98.91	98.14	97.90
離乳率(%)		100.00	100.00	100.00
外表異常		-	-	-
一般状態	腹腔内黒色化（1～4日）	0	0	2腹
離乳前	体重(g) (雄/雌)	0日 4日 21日	7.0/6.6 10.9/10.4 60.6/57.7	6.7/6.4 10.7/10.0 62.7/59.2
	体重増加量(g)	0-4日 4-21日	3.9/3.9 49.4/47.1	4.0/3.6 51.9/49.1
	検査対象児数(雄/雌)		8/10	10/9
	体重(g) (雄/雌)		11.0/10.4	10.4/9.9
	生後4日	絶対重量(g) 雄	脳 胸腺(X10 ⁻³) 脾臓	0.4132 26.9 0.0567
		雌	脳 胸腺(X10 ⁻³) 脾臓	0.4178 25.4 0.0556
		対体重比(g/100g体重)	雄 脳 胸腺(X10 ⁻³) 脾臓	3.78 244.7 (100%) 0.51 (100%)
		雌	脳 胸腺(X10 ⁻³) 脾臓	4.04 243.4 (100%) 0.53 (100%)
				4.04 208.5 (85.2%) 0.46 (90.2%)
				4.14 223.6 (91.9%) 0.47 (88.7%)
器官重量	検査対象児数(雄/雌)		11/11	11/11
	体重(g) (雄/雌)		60.2/58.6	62.9/59.5
	生後21日	絶対重量(g) 雄	脳 胸腺(X10 ⁻³) 脾臓	1.488 266.5 0.275
		雌	脳 胸腺(X10 ⁻³) 脾臓	1.456 262.1 0.284
		対体重比(g/100g体重)	雄 脳 胸腺(X10 ⁻³) 脾臓	2.492 443.51 (100%) 0.454 (100%)
		雌	脳 胸腺(X10 ⁻³) 脾臓	2.494 447.38 (100%) 0.482 (100%)
				2.471 418.89 (94.4%) 0.463 (102.0%)
				2.510 463.06 (103.5%) 0.531 (110.2%)
				2.756 324.568 (73.2%) 0.434 (95.6%)
				2.552 351.706 (78.5%) 0.507 (105.2%)
	剖検(3週齢)	腎孟拡張	0	0
				1腹(1匹)

- : 特記すべき所見なし； a : p<0.05, b : p<0.01

表II-5. F2動物(離乳後)

投与群 (mg/kg/day)		0	0.75	3
動物数 (雄)		10	10	10
死亡動物数 (雄)		0	0	0
一般状態		-	-	-
体重 (g)	28日	101.7	104.6	94.5
(雄)	70日	439.3	428.7	441.7
体重増加量 (g)	21~28日	42.1	42.1	37.2
(雄)	21~70日	379.7	366.2	384.4
摂餌量(g)	28日	11.8	11.2	9.86
(雄)	70日	26.4	25.8	28.0
離乳後	体重(g) (雄)	457.3	453.2	459.0
器官重量	絶対重量 (g)	雄 脳	2.060	2.117
10週		胸腺(X10 ⁻³)	612.7	628.7
		脾臓	0.910	0.818
	対体重比 (g/100g体重)	雄 脳	0.451	0.468
		胸腺(X10 ⁻³)	133.93 (100%)	138.38 (103.3%)
		脾臓	0.201 (100%)	0.181 (90.0%)
剖検	腎孟拡張 (雄10週齢)	1	0	3
	精巢腫大	1	0	-

- : 特記すべき所見なし ; a : p<0.05, b : p<0.01

表 II-6. F1 動物の免疫機能検査結果

投与群 (mg/kg/day)		0	0.75	3	
F1 免疫 機能 検査	21 日	検査動物数	8	8	
		白血球数 ($\times 10^2/\mu\text{l}$)	38.63	39.31	
		白血球系	Lymphocyte	79.9	
		百分率 (%)	Neutrophil Segment	15.9	
		生率 (%)	Band	0.1	
		細胞数	Eosinophil	0.1	
		CD3- CD3 ^{H1} CD3 ^{L1}	Basophil	0.0	
		CD4 /CD8	Monocyte	4.0	
		CD4+/CD8-			
		CD4+/CD8+			
脾細胞 (cellularity : $\times 10^7 \text{ cells}$) (cellularity : $\times 10^7 \text{ cells/g tissue}$)		85.3	75.2	63.1	
脾細胞 (cellularity : $\times 10^7 \text{ cells}$) (cellularity : $\times 10^7 \text{ cells/g tissue}$)		312	319	315	
脾細胞 (cellularity : $\times 10^7 \text{ cells}$) (cellularity : $\times 10^7 \text{ cells/g tissue}$)		16.7	14.7	14.7	
脾細胞 (cellularity : $\times 10^7 \text{ cells}$) (cellularity : $\times 10^7 \text{ cells/g tissue}$)		62	60	58	
液性免疫	10 週齢	Anti-SRBC IgM antibody (Serum titer to yield 0.5 O.D.)	1675	1557	
細胞免疫		Delayed type hypersensitivity (DTH Index)	0.72	0.75	
				0.70	

a: p<0.05, b: p<0.01

*: $\times 10^7 \text{ cells}$

表II-7. F2動物の免疫機能検査結果 - 離乳前

投与群(mg/kg/day)		0	0.75	3		
検査動物数		8	8	8		
F2 免疫 動機能 物機能 検査	リンパ球サブセット 生後4日	胸腺細胞 (cellularity : $\times 10^7$ cells) (cellularity : $\times 10^7$ cells/g tissue)	6.5 230	6.5 238	4.0a 205	
		CD3- 白分率 (%) CD4-/CD8- CD4+/CD8- CD4+/CD8+ CD4-/CD8+	27.3 11.7 60.7 5.2 8.4 82.6 3.9	28.6 11.4 59.7 4.4 8.3 83.9 3.4	27.7 13.3 58.8 5.1 8.4 81.3 5.3a	
		細胞数 *	1.684 0.697 3.734 0.309 0.494 5.047 0.231	1.716 0.666 3.659 0.269 0.487 5.090 0.201	0.613a 0.493 2.169a 0.182a 0.308a 2.973a 0.183	
		脾細胞 (cellularity : $\times 10^7$ cells) (cellularity : $\times 10^7$ cells/g tissue)	2.5 41	2.3 42	1.4b 28	
		CD3-/CD45RA- CD3+/CD45RA- CD3-/CD45RA+ CD4-/CD8- CD4+/CD8- CD4-/CD8+	78.5 4.5 15.6 93.4 3.6 2.2	79.7 4.4 15.1 93.5 4.1 1.9	72.2 5.7 20.9a 91.1 5.1 3.0	
		細胞数 *	1.393 0.074 0.276 1.667 0.062 0.037	1.342 0.069 0.253 1.546 0.063 0.029	0.568a 0.043 0.160 0.713a 0.040 0.023	
		白血球数 ($\times 10^2/\mu l$)	42.65	41.88	36.30	
		白分率 (%)	Lymphocyte Neutrophil Segment Band Eosinophil Basophil Monocyte	75.6 16.6 0.4 1.0 0.0 6.4	79.6 13.3 0.1 1.0 0.0 6.0	73.4 17.9 0.4 0.3 0.0 8.1
		胸腺細胞 (cellularity : $\times 10^7$ cells) (cellularity : $\times 10^7$ cells/g tissue)	87.4 318	80.9 309	59.2b 318	
		白分率 (%)	CD3- CD3 ^{hi} CD3 ^{lo} CD4-/CD8- CD4+/CD8- CD4+/CD8+ CD4-/CD8+	18.9 16.8 64.0 3.0 9.3 84.2 3.6	23.3 14.8 61.7 3.3 8.6 84.5 3.7	27.0 13.8 59.1 4.0 8.0 83.4 4.6
F2 免疫 動機能 物機能 検査	リンパ球サブセット 生後21日	細胞数 *	CD3- CD3 ^{hi} CD3 ^{lo} CD4-/CD8- CD4+/CD8- CD4+/CD8+ CD4-/CD8+	15.8 14.4 53.9 2.5 7.9 71.1 3.0	18.4 11.6 48.4 2.4 6.6 66.2 2.8	15.4 7.9b 33.8b 2.3 4.6b 47.6b 2.6
		脾細胞 (cellularity : $\times 10^7$ cells) (cellularity : $\times 10^7$ cells/g tissue)	22.6 78	22.8 76	16.2a 66	
		白分率 (%)	CD3-/CD45RA- CD3+/CD45RA- CD3-/CD45RA+ CD4-/CD8- CD4+/CD8- CD4-/CD8+	45.4 23.2 26.1 72.3 16.9 10.2	47.0 18.9 29.6 76.6 14.1 8.6	53.7a 16.6b 26.3 79.1b 12.3b 8.1
		細胞数 *	CD3-/CD45RA- CD3+/CD45RA- CD3-/CD45RA+ CD4-/CD8- CD4+/CD8- CD4-/CD8+	8.1 4.2 4.7 13.2 3.1 1.9	8.6 3.4 5.4 14.3 2.6 1.6	7.0 2.1b 3.5 10.4 1.6b 1.1b
		a: p<0.05, b: p<0.01				
		*: $\times 10^7$ cells				

表 II-8. F2 動物の免疫機能検査結果 - 離乳後

投与群(mg/kg/day)		0	0.75	3
F2 免疫 機能 検査 動物	10 週 齢	検査動物数	8	8
		白血球数($\times 10^7/\mu\text{l}$)	107.55	98.91
		白血球系	Lymphocyte	88.0
		百分率	Neutrophil Segment	6.1
		生後	Band	0.1
		10週齢	Eosinophil	0.8
		細胞数	Basophil	0.0
		*細胞数	Monocyte	5.0
		脾細胞 (cellularity : $\times 10^7\text{cells}$)	146.4	156.3
		(cellularity : $\times 10^7\text{cells/g tissue}$)	237	236
F2 免疫 機能 検査 動物	10 週 齢	白血球系	CD3-	19.9
		百分率	CD3 ^a	25.6
		生後	CD3 ^b	51.4
		10週齢	CD4 / CD8	3.5
		細胞数	CD4+/CD8-	10.8
		*細胞数	CD4+/CD8+	81.4
		脾細胞 (cellularity : $\times 10^7\text{cells}$)	CD4-/CD8+	4.2
		(cellularity : $\times 10^7\text{cells/g tissue}$)	CD3-	27.6
		88	CD3 ^a	35.6
		90	CD3 ^b	76.0
F2 免疫 機能 検査 動物	10 週 齢	脾細胞 (cellularity : $\times 10^7\text{cells}$)	CD4-/CD8-	4.8
		(cellularity : $\times 10^7\text{cells/g tissue}$)	CD4+/CD8-	14.9
		88	CD4+/CD8+	114.0
		90	CD4-/CD8+	5.8
		脾細胞 (cellularity : $\times 10^7\text{cells}$)	CD3-/CD45RA-	20.8
		(cellularity : $\times 10^7\text{cells/g tissue}$)	CD3+/CD45RA	46.1
		88	CD3-/CD45RA+	29.5
		90	CD4-/CD8-	56.3
		脾細胞 (cellularity : $\times 10^7\text{cells}$)	CD4+/CD8-	27.0
		(cellularity : $\times 10^7\text{cells/g tissue}$)	CD4-/CD8+	16.1
F2 免疫 機能 検査 動物	10 週 齢	脾細胞 (cellularity : $\times 10^7\text{cells}$)	CD3-/CD45RA-	14.6
		(cellularity : $\times 10^7\text{cells/g tissue}$)	CD3+/CD45RA-	31.7
		88	CD3 / CD45RA+	21.1
		90	CD4-/CD8-	38.7
		脾細胞 (cellularity : $\times 10^7\text{cells}$)	CD4+/CD8-	18.0
		(cellularity : $\times 10^7\text{cells/g tissue}$)	CD4 / CD8+	10.8
		88	CD3-	2109
		90	CD3 ^a	3034
		脾細胞 (cellularity : $\times 10^7\text{cells}$)	CD3 ^b	1892
		(cellularity : $\times 10^7\text{cells/g tissue}$)	CD4-	0.98
F2 免疫 機能 検査 動物	10 週 齢	脾細胞 (cellularity : $\times 10^7\text{cells}$)	CD4+	0.99
		(cellularity : $\times 10^7\text{cells/g tissue}$)	CD4+	0.91
		脾細胞 (cellularity : $\times 10^7\text{cells}$)	CD4-	0.98
		(cellularity : $\times 10^7\text{cells/g tissue}$)	CD4-	0.88
		脾細胞 (cellularity : $\times 10^7\text{cells}$)	CD4+	0.98
		(cellularity : $\times 10^7\text{cells/g tissue}$)	CD4+	0.88
		脾細胞 (cellularity : $\times 10^7\text{cells}$)	CD4-	0.98
		(cellularity : $\times 10^7\text{cells/g tissue}$)	CD4-	0.88
		脾細胞 (cellularity : $\times 10^7\text{cells}$)	CD4+	0.98
		(cellularity : $\times 10^7\text{cells/g tissue}$)	CD4+	0.88

a: p<0.05, b: p<0.01

*: $\times 10^7$ cells

2) 催奇形性

①ラットを用いた催奇形性試験

(資料T-24)

試験機関 三菱化学安全科学研究所 [G.L.P対応]

報告書作成年 1997年

被験物質：

試験動物：SD系妊娠ラット、1群24匹（交尾確認雌）

妊娠0日において10週齢（体重234～291g）

（投与：1996年9月24日～10月15日）

投与方法：被験物質を0.5%カルボキシメチルセルロース-Na水溶液に懸濁し、0、1、3および4.5mg/kg/dayの投与量で妊娠6日から15日までの10日間、1日1回強制経口投与した。また、対照群の動物には0.5%カルボキシメチルセルロース-Na水溶液のみを同様に投与した。帝王切開は妊娠20日に実施した。なお、交配は雄1雌2の交配対を昼夜同居させることにより行い、膀胱または膣垢中に精子が確認された日を妊娠0日とした。

投与量の設定根拠：

検査項目：

母動物：一般状態および生死を毎日観察し、体重および摂餌量を妊娠0、6、9、12、15および20日に測定した。妊娠20日にすべての母動物を剖検した。卵巢および子宮を摘出し、黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胚数等を検査した。

生存胎児：性別、体重および外表異常の有無を全胎児について検査した。

対照群および全被験物質投与群の各腹約半数の胎児について内臓異常の有無を検査した。残りの胎児は骨格標本を作製し、骨格異常の有無を検査した。

試験結果：概要を次頁の表に示す。

試験結果表：

投与量(mg/kg/day)	0	1	3	4.5	
1群あたりの交尾確認雌	24	24	24	24	
母動物	妊娠動物数	24	23	24	21
	死亡数	0	0	0	0
	一般状態	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
	体重(g)：妊娠 20 日	429.6	434.9	419.1	399.7 ^a
	体重増加量(g) 妊娠 6 ~ 15 日	51.3	51.8	38.8 ^b	27.4 ^b
	摂餌量(g/匹/day) 妊娠 12 日	27.5	28.0	24.9 ^a	19.9 ^b
	剖検所見 (発生数)	異常なし	異常なし	胎盤の腫大(1)	乳腺の結節(1) 胎盤の癰(1) 胎盤の腫大(1)
胚・胎児	黄体数	16.9	17.1	17.1	17.0
	着床数	14.6	15.8	15.5	15.2
	着床後胚死亡率(%)	5.67	5.47	5.09	7.67
	生存胎児数	13.9	14.9	14.7	14.2
	体重(g) 雄／雌	3.32/3.21	3.41/3.21	3.37/3.16	3.10 ^a /2.93 ^b
	性比 (雄／雌)	163/171	190/153	157/195	140/158
	外 表 検 査	検査胎児数 (腹数)	334(24)	343(23)	352(24)
内 臓 検 査	異常胎児数(%)	0	1(0.3)	0	1(0.4)
	異常の型(胎児数)				
	小頭および無顔症	0	0	0	1
	多指	0	1	0	0
	検査胎児数 (腹数)	172(24)	178(23)	179(24)	153(21)
	異常胎児数(%)	41(25.2)	49(27.8)	38(21.7)	30(21.9)
	奇形の型(胎児数)				
変 異 の 型 (胎 児 数)	心室中隔欠損	1	0	0	0
	房室口の異常	1	0	0	0
	全前脳症	0	0	0	1
	側脳室拡張	0	0	1	0
	胸腺頸部残留	10	21	14	14
	右鎖骨下静脈起始異常	0	0	0	1
	冠状動脈口過剰	0	1	0	1
	冠状動脈口高位	1	0	0	2
	左臍動脈	4	2	1	5
	腎孟拡張	30	29	23	10

a:p<0.05, b:p<0.01 (Dunnett の多重比較検定)

胚胎児検査の結果表において「%」は各腹ごとに算出した平均値を示す。

(次頁に続く)

試験結果表（続き）

投与量(mg/kg/day)		0	1	3	4.5	
1群あたりの交尾確認雌		24	24	24	24	
胚・胎児	骨格検査	検査胎児数(腹数)	162(24)	165(23)	173(24)	145(21)
		奇形胎児数(%)	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)
		奇形の型(胎児数)				
		中足骨過剰	0	1	0	0
		変異胎児数(%)	28(20.2)	38(21.4)	40(22.3)	40(25.9)
		変異の型(胎児数)				
		頸椎椎弓横突孔閉鎖	23	26	30	20
		胸椎椎体骨化核分離	1	6	6	7
		腰椎椎体骨化核分離	0	1	0	0
		腰椎の仙椎化	1	0	6	0
		頸肋骨	0	2	0	0
		14本肋骨	1	1	0	16a
		第13肋骨短小	2	0	0	0
		胸骨分節分離	0	3	1	0
		胸骨分節非対称	0	2	3	0
骨化進行度(骨化数)						
頸椎椎体		0.10	0.21	0.04	0.05	
胸骨		5.33	5.33	5.30	5.00	
中手骨		7.00	7.17	6.73	6.43a	
中足骨		7.98	7.97	8.00	7.96	
仙尾椎椎体		7.48	7.66	7.43	7.22	

a:p<0.05, b:p<0.01 (Dunnett の多重比較検定)

胚胎児検査の結果表において「%」は各腹ごとに算出した平均値を示す。

母動物への影響として、3 mg/kg/day 以上の群で体重の低値または増加抑制、摂餌量の低値がみられた。

胚・胎児については、生存胎児の体重および中手骨骨化数の低値が 4.5 mg/kg/day 群でみられた。また、14 本肋骨の発生率の高値が 4.5 mg/kg/day 群でみられたが、それ以外の変異または奇形の増加はなかった。14 本肋骨の発生率の高値は予備試験ではみられていないことから、本試験で観察された 14 本肋骨の発生率の高値と被験物質の投与との関係は不明であったが、催奇形性を示唆する変化ではなかった。また、腰椎数にも変化はみられなかった。その他、黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胚数、胚死亡率および性比のいずれの項目にも被験物質に起因した変化はみられなかった。

以上、被験物質の投与に起因する影響として体重の低値または増加抑制、摂餌量の低値が 3 mg/kg/day 以上の群で母動物にみられた。胚・胎児に関しては、生存胎児体重および中手骨骨化数の低値が 4.5 mg/kg/day 群でみられた。したがって、無毒性量は母動物では 1 mg/kg/day、胚・胎児では 3 mg/kg/day と判断された。また、被験物質は最高投与量である 4.5 mg/kg/day においても胎児に対して催奇形性を示さないと判断された。

<14 本肋骨に関する申請者の見解>

本試験の 4.5mg/kg/day 群の 14 本肋骨（過剰肋骨）の発現率（10.0%）は、試験機関の背景データ（平均 0.4%，範囲 0.0~1.0%）の範囲をこえていた。本試験でみられた 14 本肋骨に関して、短小過剰肋骨（第 13 本肋骨の 1/2 未満の長さ、痕跡肋骨）と完全過剰肋骨（第 13 本

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農業株式会社にある。

肋骨の I/2 以上の長さ、腰肋）に分類すると次表の通りであった。

表 14 本肋骨（過剰肋骨）の発現状況（腹単位）

投与量 (mg/kg/day)	0	1	3	4.5
母動物数	24	23	24	21
14 本肋骨 (A+B)	発現数	1	1	0
	発現率(%)	0.5	0.6	0
短小過剰肋骨 (A)	発現数	1	1	0
	発現率(%)	0.5	0.6	0.0
完全過剰肋骨 (B)	発現数	0	0	0
	発現率(%)	0.0	0.0	0.7

a: p<0.05 (多重比較検定)

ラットの 14 本肋骨は骨格変異に分類されるが、催奇形性の指標となるのは完全過剰肋骨であるという報告がある (Kinnel,C.A. and Wilson,J.G., Teratology, 8(3), 309-315, 1973)。本試験では 4.5mg/kg/day 群の 16 胎児に観察された 14 本肋骨のうち、完全過剰肋骨は 1 胎児のみに観察され、それ以外は催奇形性の指標としては意義に乏しいとされる短小過剰肋骨であった。試験機関の背景データでは、完全過剰肋骨は 8 試験中 2 試験で各 1 例に認められていることから、本試験における完全過剰肋骨の発生（1 例）は、偶発的なものと考えられる。

以上、本試験の 4.5mg/kg/day 群において、14 本肋骨の発生率の有意な高値がみられ、被験物質投与に関連する変化と考える。しかし、その大部分が奇形性の指標としては意義に乏しい短小過剰肋骨であることから、本変化は被験物質の催奇形性を示唆する変化ではないと考えられる。

②ウサギを用いた催奇形性試験

(資料T-25)

試験機関 三菱化学安全科学研究所 [GLP対応]

報告書作成年 1997年

被験物質：

試験動物：日本白色種妊娠ウサギ、1群16匹（人工授精雌）

妊娠0日において19週齢（体重3.30～4.30kg）

（投与：1996年9月30日～11月1日）

投与方法：被験物質を0.5%カルボキシメチルセルロース-Na水溶液に懸濁し、0、1、3および6mg/kg/dayの投与量で妊娠6日から18日までの13日間、1日1回強制経口投与した。また、対照群の動物には0.5%カルボキシメチルセルロース-Na水溶液のみを同様に投与した。帝王切開は妊娠28日に実施した。なお、交配は雌に排卵誘発のため局方胎盤性性腺刺激ホルモン(HCG)を静脈内投与し、良好な精液を人工授精することにより行った。人工授精日の翌日を妊娠0日とした。

投与量の設定根拠：

検査項目：

母動物：一般状態および生死を毎日観察し、体重および摂餌量を妊娠0（体重のみ）、6、9、12、15、18、21、25および28日に測定した。妊娠28日にすべての母動物を剖検した。卵巣および子宮を摘出し、黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胚数等を検査した。また、1例の死亡動物（妊娠28日に死亡）、早産動物（妊娠27日に早産）および対照群の代表例の動物について、肝臓、腎臓、肺、心臓、脾臓、その他早産動物の胃、卵巣、子宮（臍を含む）および副腎を採取し固定した。死亡動物については常法にしたがって組織標本を作製後、鏡検した。

生存胎児：性別、体重および外見異常の有無を全胎児について検査した。

全生存胎児について内臓異常の有無を検査したのち、骨格標本を作製し、骨格異常の有無を検査した。

試験結果：概要を次頁の表に示す。

試験結果表：

投与量(mg/kg/day)	0	1	3	6	
1群あたりの人工授精雌	16	16	16	16	
母動物	妊娠動物数	12	15	12	14
	死亡数	0	0	1(妊娠28日)	0
	一般状態	異常なし	異常なし	異常なし	早産(1例、妊娠27日)
	体重(kg)：妊娠28日	4.209	4.293	4.152	4.012
	体重増加量(kg)： 妊娠6～18日	0.099	0.177	0.022	-0.009
	摂餌量(g/匹/day)： 妊娠9日	178.7	193.4	172.8	110.3b
	剖検所見	異常なし	異常なし	<1死亡例> 肺のうつ血、 肝臓の黄色化、 脾臓の小型化	異常なし
	病理組織所見： 3mg/kg/day群の1死亡例の 肝臓、腎臓、肺、心臓、脾臓 についてのみ実施。	非実施	非実施	肺のうつ血、肝細胞のび慢性脂肪化、腎臓の皮髓境界部尿細管上皮の脂肪化、脾臓の萎縮	非実施
	検査動物数	12	15	11	13
	黄体数	10.1	10.2	12.3	9.9
	着床数	7.8	7.0	8.7	6.4
胚・胎児	着床後胚・胎児死亡率(%)	9.01	12.70	16.78	16.67
	生存胎児数	7.0	6.4	7.8	5.5
	体重(g) 雄／雌	44.1/43.6	46.5/43.3	40.7/41.1	46.9/46.4
	性比(雄／雌)	42/42	46/50	44/42	37/34
	外表検査	異常胎児数(%)	0	1(0.8)	0
		異常の型(胎児数)			1(1.5)
		皮下出血	0	1	0
		脊髄裂	0	0	1
	内臓検査	異常胎児数(%)	28(38.6)	26(23.7)	26(31.3)
		奇形の型(胎児数)			19(30.4)
		側脳室拡張	1	0	0
		変異の型(胎児数)			
		冠状動脈口過剰	25	24	22
		冠状動脈口高位	2	3	2
		重複後大静脈	3	0	4
		左後大静脈優位	0	1	0
					1

a: p<0.05, b: p<0.01 (Dunnettの多重比較検定)

胎児検査の結果表において「%」は各腹ごとに算出した平均値を示す。

(次頁へ続く)

試験結果表（続き）

投与量(mg/kg/day)		0	1	3	6
1群あたりの人工授精雌		16	16	16	16
骨格検査	奇形胎児数(%)	1(1.2)	0(0.0)	0(0.0)	1(1.0)
	奇形の型（胎児数）	頸椎椎弓、胸椎椎体、腰椎椎体、尾椎椎体、肋骨および胸骨の融合(1)	異常なし	異常なし	腰椎椎弓および腰椎椎体の欠損の合併(1)
	変異胎児数(%)	15(17.6)	37(43.7)a	26(31.4)	33(48.2)b
	変異の型（胎児数）				
	胸椎椎体骨化核分離	0	0	0	1
	尾椎椎体骨化核不整	0	3	0	1
	頸肋骨	0	1	0	0
	13本肋骨	13	21	15	33
	胸骨分節分離	0	0	1	0
	過剰胸骨分節	4	18	10	1
骨化進行度（骨化数）		異常なし	異常なし	異常なし	異常なし

a: p<0.05, b: p<0.01 (Dunnett の多重比較検定)

胚胎児検査の結果表において「%」は各腹ごとに算出した平均値を示す。

母動物への影響として、6 mg/kg/day 群で体重の低値ないし低値傾向および摂餌量の低値がみられ、1例が妊娠 27 日に早産した。また、3 mg/kg/day 群では体重増加の抑制傾向および摂餌量の低値傾向がみられ、妊娠 28 日に1例死亡した。死亡例の病理組織検査の結果、肺のうつ血、肝臓および腎臓の脂肪化、脾臓の萎縮などの循環障害、低栄養または衰弱による変化がみられた。これらのことから、体重減少、無摂餌あるいは摂餌抑制の状態が継続し、母体の全身状態が悪化したことにより死亡あるいは早産したと考えられた。一方、1 mg/kg/day 群ではこれらの影響はみられなかった。

胚・胎児については、6 mg/kg/day 群で全胚死亡（着床痕数：9）が、体重減少および無摂餌状態を示した母動物の1例にみられ、被験物質の投与による変化と考えられた。骨格変異を有する胎児の発生率の高値が1および6 mg/kg/day 群でみられた。その要因は1 mg/kg/day 群では13本肋骨および過剰胸骨分節、6 mg/kg/day 群では13本肋骨の発生率が対照群と比べ高値を示したためと考えられた。過剰胸骨分節については6 mg/kg/day 群で増加傾向がないことから、偶発的変化と考えられた。1および6 mg/kg/day 群での13本肋骨の発生率は試験機関の背景データ（平均：33.6%、範囲 29.7～40.5%）の範囲内である。また、本試験において腰椎数に変化はみられなかった。さらに、ウサギの胸椎数は通常12であるが、13の個体もしばしば存在する。したがって、本試験で見られた13本肋骨の発生は自然発生の範囲内の変化であり、被験物質の投与とは関連のない変化であると考えられた。その他、黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胚数、胚死亡率、生存胎児体重および性比のいずれの項目にも被験物質に起因した変化はみられなかった。

以上、被験物質の投与に起因する影響として体重の減少または増加抑制、摂餌量の減少が3 mg/kg/day 以上の群の母動物でみられた。また、早産が6 mg/kg/day 群の1例、母動物の死亡が3 mg/kg/day 群の1例にみられた。胚・胎児に関しては、全胚死亡が6 mg/kg/day 群の1例にみられた。したがって、無毒性量は母動物では1 mg/kg/day、胚・胎児では3 mg/kg/day と判断された。また、被験物質は最高投与量である6 mg/kg/day においても胎児に対して催奇形性を示さないと判断された。

＜着床後胚・胎児死亡率に関する申請者の見解＞

本試験の上記の表で示した着床後胚・胎児死亡率（腹単位）に関して、対照群に比べていずれの投与群においても有意差は認められないが、すべての投与群の値が試験機関の背景データ（平均 10.3%、範囲 6.1～12.5%）の範囲をこえていた。

腹単位で胚・胎児死亡率を算出する方法では着床数が僅少の場合、胚1個の生死により胚・胎児死亡率の平均値が大きく変動することもある。そこで、群全体の着床数と死亡胚・胎児数をそれぞれ累積して胚・胎児死亡率を算出したうえで再評価した。その結果を次表に示す。

群単位で集計した場合の着床後胚・胎児死亡率

投与量 (mg/kg/day)	0	1	3	6	背景データ ¹⁾
子宮内検査有効動物数	12	15	11	13	155
着床数の合計	94	105	96	83	-
死亡胚・胎児数の合計	10	9	10	12	-
着床後胚・胎児死亡率 ²⁾ (%)	10.64	8.57	10.42	14.46	9.89 (6.11 - 12.23)

1): 試験機関のデータ

2): 数値は群全体の値を累積して算出した値。申請者が実施した χ^2 検定の結果、有意差なし。

群単位の着床後胚・胎児死亡率については、対照群に比べて 6 mg/kg/day 群のみ若干高い値 (14.46%) となった。また、背景データと比べても 6 mg/kg/day 群のみその範囲をこえていた。一方、1 および 3 mg/kg/day 群の胚・胎児死亡率は対照群と同等で、背景データの範囲内の頻度であった。

催奇形性予備試験は、少數例を用いているため、毒性学的な解釈は限定的なものになるが、9 mg/kg/day 群にみられた着床後胚・胎児死亡率の高値は、被験物質が母体毒性を強く惹起する用量域で胚・胎児致死作用を有することを示唆しているものと考えられる。したがって、本試験において、群単位で胚・胎児死亡率を評価しても背景データから逸脱する 6 mg/kg/day 群のみは、投薬との関連性を明確に否定できないと判断した。なお、本試験において、この用量では母動物に投薬期間中の継続した体重減少あるいは増加抑制、摂餌量減少、早産といった母体毒性が認められており、着床後胚・胎児死亡率の背景データからの逸脱の程度が小さいことから、その作用はごく軽微なものであると考えられた。

以上のことから、母体毒性の発現する 6 mg/kg/day の用量ではごく軽微な胚・胎児致死作用をともなうと考えられ、被験物質のウサギ胚・胎児に対する無毒性量は 3 mg/kg/day と判断される。