

4,4'-(1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロプロパン-2, 2-ジイル)
ジフェノール

ラットにおける経口（強制）反復投与毒性および生殖/発生毒性
スクリーニング併合試験（OECD422 1996 回復群を含む）

試験番号：2701/0003

和文翻訳

AUTHOR: 

試験委託者：
経済産業省
〒100-8901
東京都千代田区霞ヶ関 1 丁目 3-1

試験実施機関：
Harlan Laboratories Ltd
Shardlow Business Park
Shardlow
Derbyshire
DE72 2GD
UK

Telephone: +44 (0) 1332 792896

Facsimile: +44 (0) 1332 799018

試験モニター：
ハーランラボラトリーズジャパン株式会社
〒141-0021
東京都品川区上大崎 2-15-19
AIOS 目黒駅前 905

試験場所：
(組織標本作成)
Harlan Laboratories Ltd.
Zelgliweg 1
CH-4452 Itingen
SWITZERLAND

信頼性保証部門陳述書

本試験は、信頼性保証部門による定期的な査察下にて実施した。また、本試験固有の事項以外の一般的な施設に関する査察は、信頼性保証部門の標準操作手順書に基づいて、月1回または年1回の頻度で実施している。

本試験報告書は、信頼性保証部門による査察により、試験で得られたデータおよび実施した手順に基づいて報告していることを確認した。

特に別の指示が無ければ、信頼性保証部門の査察結果は、査察当日に試験責任者と運営管理者に報告した。資料類及び操作の査察は次のように行った。

2009年10月13日	試験計画書
2009年10月23日	被験物質調製
2009年10月23日	化学分析
2009年10月27日	投与
2009年11月3日	親動物観察
2009年11月10、11日	交配/交尾/膣垢検査
2009年11月20日	被験物質調製
2009年12月3日	児動物観察
2009年12月3日	親動物観察
2009年12月8日	動物管理
2009年12月8日	剖検
2010年3月6日	試験報告書草案
信頼性保証署名日	最終報告書

(署名)

日付:

信頼性保証部門*

*署名者

信頼性保証部門責任者: [] BSc (Hons) MRQA, [] MScT MRQA
[] ONC MRQA, [] BSc(Hons) MRQA, [] MRQA

GLP 陳述書

病理組織標本作製の過程を除き、本試験は英国の GLP 省令 1999 付則 1 (SI 1999/3106、SI 2004/0994 で改正) に基づいて行った。本 GLP 基準は、OECD の「毒性試験の適正実施に関する原則」(1997 年改訂、ENV/MC/CHEM (98) 17) として発表された GLP 基準、指令 2004/9/EC および指令 2004/10/EC の要件を満たすものである。

病理組織標本作製の過程は、スイスの GLP 政令 2005 年 5 月 18 日 [RS 813.112.1] に基づいて行った。本 GLP 政令は OECD の「毒性試験の適正実施に関する原則」(1997 年改訂、OECD 委員会の決定に従い 1997 年 11 月 26 日に施行されたものである [C(97)186/Final])。

本報告書は、用いた手順および得られたデータを完全かつ正確に反映している。

(署名)

日付:

試験責任者

(署名)

日付:

毒性部門責任者

本報告書は電子媒体(PDF ファイル)として提供する場合がある。本ファイルは、最終報告書を走査して作成し、光学的な複写物と同じ完全性と信頼性を有する。但し、いかなる場合においても、本施設の資料保管室で保管している署名した最終報告書とその原本とする。

試験担当者

本試験において下記の科学的および監督管理者が関与した。

化学分析


Harlan Laboratories Ltd. Shardlow, 英国

動物管理


Harlan Laboratories Ltd. Shardlow, 英国

病理標本作製


担当主任者
Harlan Laboratories Ltd., Itingen,. スイス

病理組織学的検査


EUROTOX 認定毒性学者
病理学者
Harlan Laboratories Ltd. Shardlow, 英国

4,4'-(1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロプロパン-2,2-ジイル)ジフェノール

ラットにおける経口（強制）反復投与毒性および生殖/発生毒性スクリーニング併合試験（OECD422 1996 回復群を含む）

要約

序論

本試験は被験物質の全身毒性と生殖発生毒性（出産児への影響を含む）を評価するため OECD 試験ガイドライン 422：“経口（強制）反復投与毒性および生殖/発生毒性スクリーニング併合試験”（1996年3月22日採択）に基づいて実施した。

方法

被験物質は、30、100 および 300mg/kg/日の用量で 55 日間（2 週間の成熟期間、交配、雌動物の妊娠および初期哺育期間を含む）にわたり雌雄各 12 匹の Sprague Dawley CrI:CD^R (SD) IGS BR ラットに強制経口投与した。対照群として、雌雄各 12 匹に溶媒（ラッカセイ油 英国局方）のみを投与した。さらに溶媒のみを投与した対照群と高用量群（300mg/mg/日）については、雌雄各 5 匹ずつを用いた回復群を設定した。これらの群にはそれぞれ 42 日間溶媒または被験物質を投与した後に、14 日間の回復期間を設定した。

本試験の期間中に、一般状態観察、行動機能検査、性周期、体重、摂餌量および摂水量を記録した。血液学的検査、血液化学的検査については、交配前と投与期間終了時に非回復群の雌雄各 5 匹を用いて評価した。さらに、14 日間の回復期間終了時においても、回復群の全ての動物について血液学的および血液化学的検査を実施した。非回復群の雄 5 匹については投与終了時に、回復群の雄全例については回復期間終了時に、それぞれ尿検査を実施した。

試験 15 日に各用量群の非回復動物の雌雄を 1 対 1 で同居させた。妊娠した雌動物は出産させ、出産児を哺育 5 日まで生存させた。

哺育期間中に、全ての生存児について、毎日一般状態観察を観察し、同腹児の総体重および各児動物の体重の評価ならびに平面正向反射検査を行った。

機能的検査は、投与最終週に非回復群の雄各 5 匹に対して、また哺育 4 日に非回復群の雌各 5 匹に対して実施した。

非回復群の雄動物は試験 43 日目に屠殺し、非回復群の雌動物と出生児は哺育 5 日に屠殺した。全ての非回復群の動物は、剖検して肉眼的観察を行い、対象器官についての病理組織学的検査を実施した。

回復群については、非回復群の雄の投与終了時点まで、それぞれ被験物質の投与を続けた。その後、14 日間の回復期間終了後、剖検して肉眼的観察を行い、対象器官についての病理組織学的検査を実施した。

結果

親動物への影響：

生存率 被験物質投与に起因すると考えられる死亡例は認められなかった。

一般状態観察 一般状態観察は、300mg/kg/日群の雌雄動物において、投与後の流涎および口周辺の汚れが認められた。これらの症状は、頻度が低いものの 100 および 30mg/kg/日群の動物においても認められた。その他、試験 6 および 7 日において、300mg/kg/日群の雌動物 1 匹において、脱水症状と肛門生殖器周囲の汚れが認められた。別の雌動物で試験 7 日から 10 日にかけて脱水症状および円背位が認められた。また、同群の別の雌動物 1 匹で、肛門生殖器周囲の汚れが認められた。これらの変化はこれ以降認められなかった。

詳細な観察 毎週のオープンフィールドでの観察において、被験物質投与に起因すると考えられる影響は認められなかった。

機能的検査 握力および自発運動量に被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

感覚反応性検査 感覚反応性検査に被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

体重 300mg/kg/日群の雄動物において、投与期間を通じて、対照群と比較して体重増加量の低下が認められた。なお、この変化は回復期間中に回復性を示した。100mg/kg/日群の雄

動物においても、投与期間の最初の 3 週間に、対照群と比較して体重増加量の軽度な低下が認められた。

300mg/kg/日群の多くの雌動物において、被験物質投与の第 1 週の間に体重の減少が認められた。また、被験物質投与の第 1 週において 100mg/kg/日群の雌動物で、対照群と比較して体重増加量の低下が認められた。妊娠期間中の体重増加量に被験物質投与によると考えられる影響は認められなかった。100 および 30mg/kg/日群の雌動物において、哺育期間中の体重は対照群と比較して低値を示した。

30mg/kg/日群の雄動物の体重には、被験物質投与に起因すると考えられる影響は認められなかった。

摂餌量と摂餌効率 投与期間の最初の 2 週間に、300 および 100mg/kg/日群の雄動物に摂餌量と摂餌効率の低下が認められた。その後、この変化は回復性を示した。

300mg/kg/日群の雌動物において、交配前期間中に摂餌量の低下が認められた。また、100mg/kg/日群の雌動物において、被験物質投与第 1 週で、対照群と比較して摂餌量の低下が認められた。100 および 30mg/kg/日群の雌動物において、妊娠期間中に摂餌量の低下が認められた。また、30mg/kg/日群の雌動物において、哺育期間中に摂餌量のわずかな低下が認められた。

30mg/kg/日群の雄動物においては、試験期間を通じて対照群と比較して差は認められなかった。

摂水量 全ての被験物質投与群の雄動物において、対照群と比較して摂水量の上昇が認められた。この変化は、回復期間中の回復高用量群の雄動物では、回復性が認められた。

300 および 100mg/kg/日群の雌動物において、交配前期間中に摂水量の上昇が認められた。100mg/kg/日群の雌動物においては、妊娠期間、初期哺育期間でも摂水量がわずかに上昇を示した。回復期間中の回復高用量群の雌動物の摂水量は、対照群と同程度であった。

30mg/kg/日群の雌動物において、被験物質投与の影響は認められなかった。

血液学的検査 300mg/kg/日群の雄動物において、ヘモグロビン量、赤血球数およびヘマトクリット値の低値が対照群と比較して認められた。この変化は、回復期間終了時に部分的な回復性を示した。

100 および 30mg/kg/日群の雄動物、ならびに全ての投与用量群の雌動物については、このような変化は認められなかった。

血液化学的検査 300mg/kg/日群の雄動物において、投与期間中の検査で、対照群と比較してアルブミン、A/G 比およびコレステロールのわずかな低値が認められ、尿素窒素の高値が認められた。100mg/kg/日群の雄動物においては、対照群と比較してアルブミンおよびコレステロールの低値がみられ、30mg/kg/日群の雄動物においても、コレステロールの低値が認められた。また、300 および 100mg/kg/日群の雄動物においては、対照群と比較してアラニンアミノトランスフェラーゼの高値が認められた。これらの変化は、14 日間の回復期間の後に回復性が認められた。

300 および 100mg/kg/日群の雌動物においては、交配前の血液化学検査において、同様の変化がみられたが、哺育 4 日では有意な差は認められなかった。

30mg/kg/日群の雌動物においては、被験物質の投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

尿検査 対照群と被験物質投与群を比較した結果、尿検査に被験物質に起因すると考えられる変化は認められなかった。

生殖に対する影響：

性周期 300mg/kg/日群の雌 1 匹で休止期が継続し、交尾が成立しなかった。また、300mg/kg/日群の別の雌 1 匹は性周期の延長が認められた。この雌動物は、交尾は成立したが妊娠しなかった。

100 および 30mg/kg/日群の雌動物においては、影響は認められなかった。

交配 対照群と被験物質投与群の交配の成績に差は認められなかった。

受胎能 300mg/kg/日群の受胎能の成績には影響がみられ、この用量を投与された雌動物は妊娠しなかった。100mg/kg/日群の雌動物 3 匹は交尾が成立したが妊娠はしなかった。30mg/kg/日群の雌動物 2 匹は妊娠しなかった。交尾成立した対照群の全ての雌動物は妊娠した。

妊娠期間 対照群と被験物質投与群の妊娠期間に差は認められなかった。

出産児に対する影響：

出産児数と生存率 出産児数、生存率および性比に有意な影響は認められなかった。黄体数、着床痕、着床前損失および着床後損失についても有意な差は認められなかった。

出産児の成長と発達 被験物質投与群における同腹児体重および平均児動物体重は、対照群と比較して、有意な差は認められなかった。平面正向反射試験についても被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

出産児の観察 対照群と比較して、被験物質投与群の児動物において、被験物質の毒性兆候を示す一般状態所見は認められなかった。

病理学的検査：

剖検 対照群と比較して、被験物質投与群の児動物における剖検所見に被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

一方、親動物については、被験物質投与に起因する剖検所見として、300mg/kg/日群の雄動物で、精囊および前立腺の小型化が認められた。また、100mg/kg/日群の雄動物1匹で精巣および精巣上体の小型化が認められた。回復期間終了時の剖検においても、高用量群の雄1匹で精巣および精巣上体の小型化が認められた。

30mg/kg/日群の雄動物ならびに 30、100 および 300/kg/日群の雌動物については、被験物質投与に起因する剖検所見は認められなかった。

器官重量 300mg/kg/日群の雄動物において、対照群と比較して精巣上体および精巣の絶対および相対重量の低値がみられ、また副腎および肝臓の器官重量も高値が認められた。副腎重量の高値は14日間の回復期間終了時にも認められた。

出産後の雌動物と、100 および 30mg/kg/日群の雄動物については、被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

病理組織学的検査 以下の被験物質投与に起因すると考えられる毒性学的に有意な変化が認められた。

乳腺：全ての被験物質投与群の雄動物において、乳腺の管状腺胞状化が認められた。この変化は、14 日間の回復期間終了時の検査において、回復高用量群の雄動物で回復性が認められなかった。

300mg/kg/日群の 4 匹の非妊娠雌動物において、軽微な乳腺組織の腺過形成が認められた。この所見は、14 日間の回復期間終了時の検査において、回復高用量群の雌動物では回復性は認められなかった。

卵巣：300mg/kg/日群の非妊娠雌動物で卵胞嚢胞が認められた。卵胞嚢胞は、回復期間終了時の 300mg/kg/日群においても認められた。

精巣：300 および 100mg/kg/日群の雄動物において、ライディッヒ細胞の委縮が認められた。回復期間終了時の検査において、この変化は、ほぼ回復性を示した。

精巣上体/凝固腺：300 および 100mg/kg/日群の雄動物において、対照群と比較して、分泌量の減少が認められた。この変化は、14 日間の回復期間終了時に回復性は認められなかった。

前立腺：300 および 100mg/kg/日群の雄動物において分泌量の減少が認められた。この変化は、14 日間の回復期間終了時に回復性は認められなかった。

投与に関連した変化は、肝臓および腎臓において認められた。

肝臓：全ての被験物質投与群の雄動物において、対照群と比較して小葉中心部の肝細胞の肥大が認められた。300 および 100mg/kg/日群の雌動物においても同様の変化が認められた。この変化は、14 日間の回復期間終了時には回復性が認められた。

腎臓：300mg/kg/日群の雄動物において、好塩基性尿細管および尿細管の拡張の程度の増強が認められた。しかしながら、その他の投与量では認められなかった。この高用量群における所見は、回復期間終了時において回復性が認められた。

さらに、投与に関連した変化は、脾臓、肺および下垂体においても認められた。

結論：4, 4'-(1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロプロパン-2, 2-ジイル)ジフェノールのラットに、最長 55 日間（雌では 2 週間の交配前期間、妊娠および哺育期間を含む）、300mg/kg/日の用

量まで強制経口投与した結果、全ての用量群の雌雄動物において、被験物質投与に起因すると考えられる影響が認められた。

雄親動物については、全ての被験物質投与群で乳腺の病理学的変化がみられ、さらに 300mg/kg/日群で雌動物が妊娠せず、100 および 30mg/kg/日群で、授胎能の低下が示唆されたことから、NOAEL は求められなかった。

雌親動物については、300mg/kg/日の投与群で妊娠が認められなかった。30mg/kg/日において、全身毒性を示す重篤な症状が認められなかったため、全身毒性の NOAEL は 30mg/kg/日と判断した。また、対照群と比較して、100 および 30mg/kg/日群で、妊娠率の低下が認められたことから、生殖発生毒性についての NOAEL は求められなかった。

出産児動物については、本試験条件下では NOEL および NOAEL は 100mg/kg/日と判断した。

4,4'-(1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロプロパン-2,2-ジイル)ジフェノール：

ラットにおける経口（強制）反復投与毒性および生殖/発生毒性 スクリーニング併合試験 (OECD422 1996 回復群を含む)

序論

本試験は、被験物質の生殖および出産児の発達に対する毒性作用を評価するために、Appendix 31 に示した試験計画書に従って Sprague Dawley CrI:CD^R (SD) IGS BR 種ラットに最長連続 55 日間 (2 週間の成熟期間、交配、雌動物の妊娠および初期哺育期間を含む)、30、100 および 300mg/kg/day を反復強制経口投与して実施した。

本試験は OECD ガイドライン 422:反復投与毒性および生殖/発生毒性スクリーニング併合試験 (1996 年 3 月 22 日採択) に準拠して実施した。

本試験は、Harlan Laboratories Ltd. (Shardlow、英国) の動物福祉方針および英国の動物 (科学的処置) 法 (1996 年) の要件に準拠し、科学的な目的を達成しつつ動物の苦痛や負担を最小限にするよう配慮した。

本試験に用いられた動物種であるラットは、長年にわたりげっ歯類を用いた安全性評価試験に使用されている。

投与用量は予試験 (Harlan Laboratories Ltd. ; プロジェクト番号 2701/0002) に基づいて選択した。被験物質の物理化学的性状に基づいて最も適切な暴露経路と考えられる経口投与を選択した。本試験の結果は、ヒトに対する被験物質の毒性作用の検索と生殖に対する潜在的毒性作用をスクリーニング評価することに有用であると考えられる。

本試験は 2009 年 10 月 23 日から 2010 年 2 月 8 日の間に実施した。本試験の実験期間は 2009 年 10 月 27 日 (投与初日) から 2009 年 12 月 22 日 (剖検最終日) であった。

2. 被験物質と実験の準備

2.1 外観、同一性、保存条件

被験物質名称：4,4'-(1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロプロパン-2,2-ジイル)ジフェノール

外観：白色粉末

化学名：2,2-ビス(4-ヒドロキシフェニル)-ヘキサフルオロプロパン

純度：99.69%

被験物質入手日：2009年9月8日

バッチ番号：090607

保存条件：暗所室温

有効期限：2011年6月26日

Harlan Laboratories Ltd.(Shardlow、英国)の分析部門にて、被験物質の組成を確認するために、試験開始前および試験の終了時点でIRスペクトルを測定した。測定結果はプロジェクト番号 2701/0002 にて保管している。また、被験物質の純度を Harlan Laboratories Ltd.(Shardlow、英国)の分析部門にて確認した。

2.2 被験物質の調製

被験物質をラッカセイ油に懸濁して所定の濃度に調製した。被験物質調製液の安定性と均一性は Harlan Laboratories Ltd. (Shardlow、英国) の分析部門にて測定した(プロジェクト番号 2701/0002)。予備試験の結果から調製液は少なくとも 21 日間安定であることを示した。被験物質溶液は 2 週毎に調製し、暗所 4℃にて保存した。

それぞれの被験物質調製液からサンプルを採取し、Harlan Laboratories Ltd. (Shardlow、英国) の分析部門にて、4,4'-(1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロプロパン-2,2-ジイル)ジフェノールの濃度を分析した。用いた分析方法とその結果を Appendix 30 に示した。被験物質調製液の濃度は設定濃度の±9%以内であった。

3. 方法

3.1 実験動物と実験動物の飼育環境

試験に用いた Sprague Dawley CrI:CD^R (SD) IGS BR 雌雄ラットはチャールズリバー株式会社 (英国) より購入した。入荷時に疾病および障害の有無について動物を観察した。動物は 9 日間の馴化期間中に健康状態を確認した。本試験においては、計 116 匹 (雄動物 58 匹、雌動物 58 匹) を使用した。投与開始時の体重は雄動物で 301 から 375g、雌動物で 200 から 262g であり、約 9 週齢であった。

まず、全ての動物を針葉樹のフレーク (Datesand Ltd., Cheshire (英国)) を床敷として入れたステンレス鋼製金網蓋付きのポリプロピレン製平底ケージ (H: 22cm、L: 52cm、W: 33cm) に、4 または 5 匹ずつのグループにわけて飼育した。交配期間中について、非回復群動物はポリプロピレン格子床に吸収紙を敷いたケージ (H: 20cm、L: 41.5cm、W: 24cm) へ、用量群ごとに雌雄 1 対 1 で移した。交尾成立後、雄動物はもとのケージに戻した。交尾成立後の雌動物は、妊娠、哺育期間を通じて、針葉樹のフレークを床敷として入れたステンレス鋼製金網蓋付きのポリプロピレン製平底ケージ (H: 20cm、L: 41.5cm、W: 24cm) で個別飼育した。回復群の動物は、針葉樹のフレークを床敷として入れたステンレス鋼製金網蓋付きのポリプロピレン製平底ケージ (H: 22cm、L: 52cm、W: 33cm) に、5 匹ずつのグループにわけて飼育した。なお、ケージは 1 週間に 1 回交換した。

動物には餌と水を自由に摂取させた。本試験を通じて、げっ歯動物用固形飼料 Teklad Global Diet 2018C (Harlan Laboratories U.K. Ltd.製(Oxon, 英国)) を動物に与えた。本試験に用いられた飼料のバッチの分析証明書は Addendum 2 に示した。飲用水はケージに取り付けられたポリカーボネート製のボトルによって動物に与えた。飼料と飲用水の分析結果から、本試験に影響を及ぼすと考えられる汚染物が含まれていないことを確認した。飼育環境を向上するために、妊娠、哺育期間中の雌動物を除いて、動物の飼育ケージ内には木のブロックや段ボールのトンネル(Datesand Ltd(Cheshire, 英国))を備えた。

動物は Harlan Laboratories Ltd. (Shadlow, 英国) のバリアー環境のげっ歯動物飼育施設内の単一空調付きの部屋で飼育した。1 時間あたり少なくとも 15 回換気し、低照度蛍光灯を用いて 1 日 12 時間連続人工照明とした。環境条件はコンピューターシステムによって継続的にモニターし、時間あたりの平均温度、湿度をプリントアウトして本記録として保管した。温度と相対湿度は $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $55 \pm 15\%$ となるように設定した。これら設定値からわずかに逸脱することがあったが、本試験の目的と完全性に影響するものではなかった。

動物は体重層別化無作為法によって各用量群に割り付け、各群の平均体重に差がみられないようにした。各動物は試験施設の通常の方法である耳パンチ法で個体識別した。

3.2 手順

本被験物質について、用量設定試験（Harlan Laboratories Ltd.、プロジェクト番号 2701/0002）を実施し、その結果の要約を Addendum 12 に示した。予備試験（Harlan Laboratories Ltd.、プロジェクト番号 2701/0002）において、1000、400 および 100mg/kg/日の用量で 14 日間動物に被験物質を投与した。その結果、投与 5 日において、1000mg/kg/日群の雄動物 1 匹に重篤な一般状態所見（下痢、脱水症状、削瘦、立毛および嗜眠）が認められたため、切迫屠殺した。投与用量は投与 5 日に 350mg/kg/日に減じた。この減じた投与用量で雌動物 1 匹が投与 6 日に死亡発見した。この動物では、一般状態所見として死亡前に円背位、立毛および嗜眠が認められた。投与 9 日に雄動物 1 匹が重篤な一般状態所見（円背位、嗜眠、脱水およびつま先歩行）が認められたため切迫屠殺した。最高用量群において、体重の減少と大幅な摂餌量の減少が認められた。さらに、対照群と比較して摂水量の増加が認められた。剖検においては消化管、脾臓、膀胱、腎臓、膵臓、精囊および子宮に変化が認められた。

400 および 100mg/kg/日群においては、死亡例は認められなかった。一般状態所見として、投与後の流涎および口周囲の汚れのみが認められた。400 および 100mg/kg/日群において、対照群と比較して体重のわずかな減少が認められ、また、摂餌量の減少も同群で認められた。400mg/kg/日群の雌雄動物および 100mg/kg/日群の雄動物において、摂水量の増加が認められた。400mg/kg/日群の雌動物 1 匹において、ガス貯留による胃の膨張が認められた。その他の 400 および 100mg/kg/日群の動物においては、肉眼観察異常は認められなかった。

この用量設定試験の結果に基づいて、30、100 および 300mg/kg/日と設定した。

動物は次のように割り付けた。

処理群	用量 (mg/kg/day)	投与液量 (mL/kg)	濃度 (mg/mL)	動物番号	
				雄動物	雌動物
Group 1: 対照群	0	4	0	12 (1 – 12)	12 (13 – 24)
Group 2: 低用量群	30	4	7.5	12 (25 – 36)	12 (37 – 48)
Group 3: 中間用量群	100	4	25	12 (49 – 60)	12 (61 – 72)
Group 4: 高用量群	300	4	75	12 (73 – 84)	12 (85 – 96)
Group 5:	0	4	0	5 (97 – 101)	5 (102 – 106)

回復対照群					
Group 6: 回復高用量群	300	4	75	5 (107 – 111)	5 (112 – 116)

括弧内 () の番号はそれぞれの群に割り付けられた個別の動物番号を示した。

被験物質はステンレススチール製カニューレを装着したディスポーザブルプラスチックシリンジ用いて毎日強制経口投与した。対照群の動物には同様の方法で 4 ml/kg/day の容量でラッカセイ油（英国局方）を投与した。

それぞれの動物に投与する被験物質の投与液量は、直近の体重測定の結果に基づいて定期的に補正した。

試験の経時的手順

第 1～4 群（非回復群）

- i) 雌雄各 12 匹のラットからなるそれぞれ群に対し、試験期間を通じて適切な用量を投与した（出産中の雌動物を除く）。投与初日を試験 1 日と定義した。
- ii) 全ての雌動物は交配前期間に毎日膣垢検査を行った。
- iii) 投与開始前とその後週に 1 回、全ての動物について詳細な観察を行った。
- iv) 交配前日（試験 14 日）に、各群から無作為に選んだ雌雄各 5 匹について採血し、血液学的検査および血液化学的検査を行った。
- v) 試験 15 日に各群の雌雄を 1 対 1 で最長 14 日間同居させた。
- vi) 交尾を確認した後（妊娠 0 日とした）、雄動物はもとのケージに戻し、雌動物は個別飼育用ケージに移した。
- vii) 投与最終週（第 6 週）に、各群から選択した雄各 5 匹について、種々の刺激に対する機能的/感覚的反応検査を実施し、また尿検査を行った。
- viii) 妊娠した雌動物は出産させ、出産児を出産後 5 日まで哺育させた。この期間中に出産児数、同腹児毎の体重、児動物の性別ごとの平均体重、一般状態の観察および発達状態の評価を行った。

- ix) 哺育 4 日に各群 5 匹の雌動物について、種々の刺激に対する機能的/感覚反応検査を評価した。
- x) 各群 5 匹の雄動物について、試験 42 日目に血液を採取し、血液学および血液化学的検査を行った。その後、各用量群の雄動物については屠殺し肉眼的観察を行った。
- xi) 各群 5 匹の雌動物について、哺育 4 日（但し、高用量群の雌動物については剖検前または剖検時）に血液を採取して、血液学的検査、血液化学的検査を行った。哺育 5 日に非回復群雌動物と生存出産児の全例を屠殺し肉眼的観察を行った。

第 5～6 群（回復群）

- i) 雌雄各 5 匹からなる回復群の動物については、非回復群の雄への投与が終了する時点までそれぞれ投与を行った。
- ii) 雌雄回復群の動物は投与後 14 日間の回復期間を設けた。
- iii) 回復群の雄全例については、回復期間の最終週に尿検査を実施した。
- iv) 試験 56 日に血液を採取して、血液学および血液化学的検査を実施した。
- v) 14 日間の回復期間の終了後雌雄動物を屠殺し、肉眼的観察を実施した。

3.3 検査

3.3.1 一般状態観察

全ての動物について、平日 1 日当たり投与直前、投与後 30 分以内、投与後 1 時間、5 時間に毒性兆候、健康状態の悪化や行動学的な変化を観察した。また、週末について 1 日あたり投与直前、投与直後、投与 1 時間後に観察を行った（但し、出産途中にある雌動物を除く）。回復期間については、1 日 2 回（但し週末は 1 日 1 回）観察記録した。全ての観察結果を記録した。

3.3.2 行動機能検査

投与開始前とその後、投与期間中は週に 1 回、全ての動物について詳細な観察を実施した。機能的検査と感覚反応検査については、非回復群の雌雄各 5 匹について投与終了時に実施

した。

3.3.2.1 詳細な観察

詳細な観察は特設のオープンアリーナ上で実施し、次のパラメーターについて観察を行った。

歩行	体温上昇/下降
振戦	皮膚着色
筋攣縮	呼吸状態
痙攣	眼瞼閉鎖
異常/常同行動	尿失禁
流涎	脱糞
立毛	アリーナに置いてから動き出すまでの時間
眼球突出	挙尾
流涙	

観察は Irwin(1968)と Moser ら (1988) の用いた方法に従い実施した。

用いられたスコアリングシステムは Addendum 1 に示した。

3.3.2.2 機能的検査

自発運動量:44 光電管自動測定装置(機器名:Benwick AM 1051 Amloggers、製造元:Linton Instrumental)を用いて、自発運動量を測定した。自発運動量検査には無作為に選択した動物を用いた。自発運動量測定は可能な限り投与後 2 時間以上経過したのちに実施した。測定時間はそれぞれの動物について 30 分とした。測定した時間とその時間の最後の 20%の時間(この時間は漸近的期間として考えられる、Reiter と Macphail, 1979)に、それぞれの動物が活発に移動する時間の割合を記録した。

前肢/後肢握力:自動測定器(機器名:Linton Dual Channel Grip Strength meter、製造元:Linton Instrumental)を用いて前肢・後肢の握力を測定した。それぞれの動物は、前肢の近位にある金属製の棒を握らせ、その握りを放すまで尻尾の根元を引いた。また、後位の金属製の棒を後肢で握らせ、その握りを放すまで尻尾を引いた。それぞれの動物が握りを放すまでの力を連続 3 回実施して記録した。評価法は、Meyer ら (1979) の方法を用いた。

3.3.2.3 感覚反応

それぞれの動物について、聴覚刺激、視覚刺激、固有受容器刺激についての感覚反応を評

価した。この評価法は、Irwin(1965)と Moster ら (1988) の方法を用いた。用いたスコアリングシステムは Addendum 1 に示した。次のパラメーターが測定した。

握り反応	接触回避
異常発声	瞳孔反射
Toe Pinch 反応	驚愕反射
Tail Pinch 反応	瞬目反射
フィンガーアプローチ	

3.3.3 体重

体重を試験 1 日 (投与前)、その後雄動物は剖検まで週 1 回、雌動物については交尾を確認するまで週 1 回記録した。その後雌動物については交尾後 0、7、14、20 日、さらに哺育 0 日、4 日に測定・記録した。交配中については交尾成立まで毎日測定した。回復動物は試験 1 日 (投与前)、その後は剖検まで週 1 回体重を測定・記録した。

妊娠および哺育期間中の雌の体重の正常範囲を Addendum 3 に示した。

3.3.4 摂餌量

交配前の期間、非回復群の親動物のそれぞれのケージ毎に摂餌量を週 1 回毎測定記録した。交配期間中は摂餌量の測定は行わなかった。雄動物については交配期間が終了した後、継続して週 1 回測定した。交尾を確認した雌動物に対しては、妊娠 0~7、7~14 および 14~20 日の期間に摂餌量を記録した。出産児を哺育中の雌動物についての摂餌量は哺育 0~4 日に記録した。回復動物の摂餌量については 1 週間毎に試験期間を通じて測定した。

また、雄動物については試験期間を通じて (但し、交配期間を除く)、雌動物については交配前期間と妊娠期間の最初の 2 週間に摂餌効率 (体重変化量/摂餌量) を計算した。胎児および出産児の成長と母乳生成を考慮したため、妊娠最終週と哺育期間の摂餌効率についての算出は行わなかった。

妊娠、哺育期間の雌動物についての背景データについては Addendum 3 に示した。

3.3.5 摂水量

摂水量は、試験期間を通じて、重量測定により測定した。

3.3.6 臨床検査

非回復群の被験物質投与群と対照群の雌雄各 5 匹について、血液学および血液化学的検

査を投与 14 日に実施し、さらに投与終了時（雄：投与 42 日、雌：哺育 4 日）にも実施した。回復群の動物については、14 日間の回復期間終了後の剖検前（投与 56 日）に血液学的および血液化学的検査を行った。血液サンプルは、試験 14 日目には外側尾静脈から、最終屠殺時に心穿刺にて採取した。採血前に動物を絶食させることはしなかった。

尿検査は、非回復群の対照群および被験物質各群の雄各 5 匹を用いて投与最終週に実施した。また、全ての雄回復動物について 14 日間の回復期間の最終週に尿検査を実施した。尿サンプルは、動物を代謝ケージに収容し、自由摂水・絶食下で一晩採尿した。

血液学的検査、血液化学的検査および尿検査の背景データおよび詳細な方法は、Addendum 5 および 7 に記載した。

3.3.6.1 血液学的検査

プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間を除く、次表に示す項目については、抗凝固剤として EDTA を含んだチューブに採取した血液を用いて測定した。プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間については、0.11mol/L のクエン酸ナトリウムを加えた血液サンプルを用いて測定した。

血液学的検査		
項目	方法	測定機器（製造者）
血色素量(Hb)	シアンメトヘモグロビン法	A ^c . T5 Diff analyzer (Beckman Coulter 製)
赤血球数(RBC)	電気抵抗法	同上
ヘマトクリット値 (Hct)	MCV と赤血球数から算出（電気抵抗法）	同上
平均赤血球血色素量(MCH)	血色素量と赤血球数から算出（電気抵抗法）	同上
平均赤血球容積(MCV)	電気抵抗法	同上
平均赤血球血色素濃度(MCHC)	血色素量、赤血球数および MCV より算出（電気抵抗法）	同上
総白血球数(WBC)	電気抵抗法	同上
型別白血球数	血液塗抹標本作成し、メイグリュンワルドギムザ染色を施した後に鏡検分類項目 好中球、リンパ球、単球、好酸球	顕微鏡

	好塩基球	
血小板数	電気抵抗法	Ac. T5 Diff analyzer (Beckman Coulter 製)
プロトロンビン時間(CT)	Quick 一段法	Option 4 coagulometer (Bio Mérieux 製)
活性化部分トロンボプラスチン時間	メカニカル方式	同上
網状赤血球数	メチレンブルーを施した標本を鏡検	顕微鏡

3.3.6.2 血液化学的検査

次表の項目について、抗凝固剤としてヘパリンリチウムを含んだチューブに採取した血液から得た血漿を用いて測定した。

血液化学的検査		
尿素窒素	GLDH 法	ILab 600 auto-analyser (ILAB 製)
グルコース (Glu)	Trinder 法	同上
総蛋白 (Tot.Prot.)	ビュレット法	同上
アルブミン (Alb)	BCG 法	同上
アルブミン/グロブリン(A/G)比	アルブミン/(総蛋白-アルブミン)により算出	計算処理
ナトリウム(Na ⁺)	イオン電極法	ILab 600 auto-analyser (ILAB 製)
カリウム(K ⁺)	イオン電極法	同上
塩素(Cl ⁻)	イオン電極法	同上
カルシウム(Ca ⁺⁺)	重クロム酸法	同上
無機リン(P)	比色法	同上
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT)	IFCC 法	同上
アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALAT)	IFCC 法	同上
アルカリホスファターゼ(AP)	Bowers and McComb 法	同上
クレアチニン(Crea)	比色法	同上
総コレステロール(Chol)	Allain らの方法	同上
総ビリルビン(Bili)	Jendrassik-Grof 法	同上

3.3.6.3 尿検査

次の項目について、採尿したサンプルを用いて測定した。

尿量	ケトン体
尿比重	ビリルビン
pH	ウロビリノーゲン
蛋白	還元物質
糖	潜血

尿比重の測定には屈折計（株式会社アタゴ製）を用いた。pH、蛋白、糖、ケトン体、ビリ

ルビン、ウロビリノーゲンおよび潜血に Combur Test strips(Cobas Roche 製)を、還元物質には Clinitest (Bayer Corporation Limited)をそれぞれ用いて検査した。

3.3.7 生殖スクリーニング

生殖関係項目の正常範囲については、Addendum 3 と 4 に示した。

3.3.7.1 交配

非回復群の雌雄について、同一用量群内で 1 対 1 で最長 14 日間同居させた。ケージライナーシートあるいは雌の膣における膣栓の有無を確認した。膣垢標本を雌動物毎に作製して性周期の確認あるいは精子の有無を記録した。膣垢標本中に精子の存在あるいは膣栓の存在により、交尾成立（妊娠 0 日）とした。交尾確認後、雄は元のケージに戻し(追加の交配が必要ない場合)、交尾が成立した雌は妊娠および哺育期を通じて個別に飼育を続けた。

3.3.7.2 妊娠および出産

妊娠した雌については、予定される出産時期の間、午前 8:30、午後 12:30 および午後 16:30 に出産の有無を観察した。但し、週末および祝祭日においては、午前 8:30 および午後 12:30 に出産の有無を観察した。各雌動物について、下記の項目を記録した。

- i) 交配期間開始日
- ii) 交尾成立日
- iii) 分娩開始日時
- iv) 分娩終了日時

3.3.7.3 同腹児動物

分娩完了日(哺育 0 日)に、生存児数および死亡児数を記録した。分娩日に母動物ごとの児動物の個体識別を入墨により行った。

母動物毎に次の項目を記録した。

- i) 出産児数
- ii) 分娩後の各日における生存児の数(報告は分娩日(哺育 0 日)および 4 日のデータのみ)。
- iii) 分娩日(哺育 0 日)、哺育 1 日および 4 日の性別
- iv) 分娩日(哺育 0 日)から 5 日までの臨床観察結果
- v) 分娩日(哺育 0 日)および 4 日における児動物毎の体重および同腹児(母動物毎)の体重

3.3.7.4 身体発育

全ての生存児について、哺育 1 日に平面正向反射試験を行った。

3.3.8 病理学的検査

非回復群の雄親動物について、43 日目にペントバルビタールナトリウムの静脈内過量投与後に放血して屠殺した。非回復群の雌については、分娩 5 日にペントバルビタールナトリウムの静脈内過量投与後に放血して屠殺した。生存した児動物については、ペントバルビタールナトリウムの心臓内過量投与によって屠殺した。妊娠および分娩が成立しなかった雌動物については、妊娠 26 日以降に屠殺した。

全ての雌の子宮について、着床痕を観察し、子宮角毎にその数を記録した。この手順には必要に応じて 0.5%ポリ硫化アンモニウム溶液による染色を施した。

回復群の動物については、14 日間の回復期間終了後(57 日目)にペントバルビタールナトリウムの静脈内過量投与後に放血して屠殺した。

試験期間中に死亡した動物も含め、全ての親動物と児動物について、全ての外表および内臓観察を行い、肉眼的異常所見を記録した。

3.3.8.1 器官重量

剖検時に全群の親動物雌雄全例について、次の器官について脂肪を取り除き、固定前にその重量を測定した。

副腎	卵巢
脳	脾臓
精巣上部	精巣
心臓	甲状腺
腎臓	胸腺
肝臓	子宮

これら器官重量の背景データについては、Addendum 6 に示した。

3.3.8.2 病理学的検査

下記に記載した器官について、特に記載のない限り、10%緩衝ホルマリンで固定した。

副腎	膵臓
大動脈（胸部）	下垂体
骨および骨髄（膝関節を含む大腿骨）	前立腺
骨および骨髄（胸骨）	食道
脳（大脳、小脳、橋を含む）	直腸
盲腸	唾液腺（顎下腺）
凝固腺	坐骨神経
結腸	精囊
十二指腸	皮膚（後肢）
精巢上位♦	脊髄（頸部、胸部中部、腰部）
眼球*	脾臓
肉眼病変部	胃
心臓	甲状腺/上皮小体
回腸	気管
空腸	精巢♦
腎臓	舌
肝臓	胸腺
肺（気管支を含む）#	膀胱
リンパ節（頸部、腸間膜）	子宮/子宮頸部
乳腺組織	膣
筋肉（骨格筋）	
卵巣	

* 眼は Davidson 液で固定。

♦ Bouins 液で固定後、48 時間以内に 70%工業用変性アルコール（IMS）に移した。

肺はほぼ通常の吸気時の体積になるまで 10%ホルマリンを注入後、固定液に浸漬した。

採取した全ての器官は、Harlan Laboratories Ltd., Zelgliweg 1, CH-4452 Itingen, Switzerland for processing（主任試験員 ██████████）に送付した。全ての組織は顕微鏡観察を行うためパラフィン包埋後 5 um の厚さに薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。さらに、全ての雄動物の精巢および精巢上位は PAS 染色を実施して染色し観察した。

作製したスライドは試験施設に返送し、対照群および高用量群動物の全ての標本、また妊娠しなかった動物、途中死亡した動物からの全ての標本について、試験病理担当者 [REDACTED] が観察した。

高用量群において、受胎能に影響がみられたため、中間用量群（100mg/kg/日）の全ての器官について観察した。肝臓、腎臓、肺、副腎、下垂体、乳腺、卵巣、精巣、精巣上体および前立腺に投与に起因すると考えられる変化がみられたことから、低用量と回復群の全ての動物について、これらの器官の病理学的検査を行った。

病理学的検査は病理学者によって行われ、全ての所見は ROELEE 84 pathology コンピューターシステムに入力して報告書を作成した。

3.4 データ評価

3.4.1 データの取り扱い

データは群平均値と標準偏差を計算した。Appendix に示したデータは四捨五入した数値で示した。群平均に用いた個別の値は四捨五入していない数値で計算したため、別表に示した個別の値から得られる平均値とは必ずしも一致しない。

妊娠期間中の体重、摂餌量および摂水量について、群平均値は出産をした雌動物から得たデータを用いて計算した。

哺育期間中の体重、摂餌量および摂水量について、群平均値は哺育 5 日に生存児がいる雌動物から得たデータを用いて計算した。

3.4.2 生殖指数

3.4.2.1 交尾能と着床

親世代の交配期間中の個別値を用いて、次のパラメーターを算出した。

i) 交尾所要日数

交配期間の開始から交尾成立までに経過した日数を算出した。

ii) 受胎能力指数

それぞれの群について次の計算式を用いて算出した。

交尾率 (%) = 交尾成立ペア数/交配ペア数 x 100

受胎率 (%) = 受胎動物数/交尾成立ペア数 x 100

3.4.2.2 妊娠と出産

親世代の妊娠、出産期間の個別値を用いて、次のパラメーターを算出した。

i) 妊娠期間

交尾成立日から出産日までの日数を算出した。

ii) 出産率

次式を用いて計算した

$$\text{出産率 (\%)} = \text{生存児出産動物数} / \text{受胎動物数} \times 100$$

3.4.2.3 出産児の観察

評価は母動物（腹）ごとを基本とするため、数値は最初に母動物（腹）ごとに計算し、そのデータを用いて群平均を計算した。群平均値には、試験終了時（5日齢）まで哺育された全ての動物の値を含む。

i) 着床胚損失率

着床前および着床後胚損失率について、次の通り算出した。

$$\text{着床前胚損失率} = \{ (\text{黄体数} - \text{着床痕数}) / \text{黄体数} \} \times 100$$

$$\text{着床後胚損失率} = \{ (\text{着床痕数} - \text{総出産児数}) / \text{着床痕数} \} \times 100$$

$$\text{着床率} = (\text{着床痕数} / \text{黄体数}) \times 100$$

ii) 出生率および生存率

それぞれの同腹児について、次の指数を算出した。

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

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

$$\text{出生率} = (\text{総出産児数} / \text{着床痕数}) \times 100$$

iii) 性比 (%雄)

性比は分娩後 0、1 および 4 日に次の式から算出した。

$$(\text{雄の生存児数} / \text{総生存児数}) \times 100$$

また、分娩 0 日には次の式を用いて算出した。

$$(\text{雄出産児数} / \text{総出産児数}) \times 100$$

3.4.3 統計学的解析

次のパラメーターについて統計解析を行った。

定量的行動機能検査

体重・体重変化量

摂餌量

摂水量

血液学的検査、血液化学的検査および尿検査

交尾所要日数

妊娠期間

出産に関するデーター出産児数、黄体数、着床痕数、同腹児総体重

性比

着床胚損失率、生存率（哺育1日）、生存率（哺育4日）、着床率および出生率

出産児動物毎の体重と体重変動量

平面正向反射試験

親の絶対および相対器官重量

上記のパラメーターについては下記の統計学的手法を用いた。

用量相関性を直線回帰分析により検定した後、分散の均一性の検定のための **Levene** の検定を組み合わせた一元配置分散分析（ANOVA）を用いて評価した。分散の均一性が認められた場合には **Dunnett** 検定を用いてペアワイズ比較を行った。回復群のデータについては、**Levene** の等分散性の検定を組み合わせた両側 **t**-検定により解析した。**Levene** の検定にて不等分散が認められた場合には、**Kruskal-Wallis ANOVA** および **Mann-Whitney** の **U** 検定からなるノンパラメトリックな方法を用いて当該パラメーターを解析した。

着床胚損失率、性比、発達指標についてはノンパラメトリック法にて計算した。

危険率 **P** 値は次のように示した。

P<0.001 ***

P<0.01**

P<0.05*

p≥0.05(有意差無し)

病理組織学的データは対照群と被験物質群について、各性別ごとに有意差を次の方法を用いて解析した。

1. χ^2 検定: 1 またはそれ以上の頻度をともなった所見の出現率の検定に使用。
2. **Kruskal-Wallis** の片側ノンパラメトリック検定: よくみられる所見の重症度についての検定に使用。

P 値は次の通り計算された。

P<0.001 +++ --- ***

P<0.01 ++ -- **

P<0.05 + - *

P<0.1 (+) (-) (*)

P≥0.1 N.S.(有意差無し)

プラス印 (+) は対照群に対して増加方向の有意差がみられた場合、マイナス印 (-) は減少方向の有意差がみられた場合を示す。アスタリスク (*) は方向性のない群間の有意差を示す。

4. 試資料の保管

試験委託者から特別な指示がない限り、試験場所（標本作製）で作製した組織標本作製に関するデータと組織標本、そして Harlan Laboratories Ltd. (英国)で作成した最終化レポートを含むデータは、Harlan Laboratories Ltd. Shardlow, (英国)にて5年間保管された後、さらに保存あるいは廃棄の指示を仰ぐ。組織ブロックと標本化していない湿組織については、Harlan Laboratories Ltd., Fullinsdorf, Switzerland の資料保管施設にて少なくとも10年間保管する。

5. 結果

5.1 親動物

5.1.1 死亡率

被験物質の毒性に起因すると考えられる死亡例は認められなかった。

300mg/kg/日群の雌動物1匹が試験6日に重篤な一般状態の異常を示したため屠殺したが、これは被験物質調製液の誤投与によるもので、被験物質投与に起因しないものと考えられた。その他、死亡例は認められなかった。

5.1.2 一般的観察

一般状態観察の結果を Table 2 および 3 に要約して示した。個別値は Appendix 1 および Appendix 2 に示した。

試験6および7日に脱水症状と肛門生殖器周囲の汚れが300mg/kg/日群の雌動物1匹でみられ、試験7日に他の雌動物1匹で脱水症状が認められた。この雌動物は試験8~10日にかけて円背位が認められた。また、同群の別の雌動物で、肛門生殖器周囲の汚れが試験7日に認められた。これらの変化はこれ以降認められなかった。

300mg/kg/日群のその他の一般状態の変化として、試験期間を通じて、雌雄の動物で被験物質投与直後から1時間後までに流涎の増加が認められた。それに伴う変化として口周囲の汚れが認められた。また、同群の雄5匹と同用量回復群の雌1匹で呼吸音異常が認められた。これら高用量群の雌雄でみられた一般状態の変化については、被験物質投与終了後の

回復期間では軽減した。

100mg/kg/日群の雌雄動物において、投与第 3 週から投与直後に流涎の増加が認められた。口周囲の赤/茶色の汚れもみられたが、この出現頻度は 300mg/kg/日群に比較して少なかった。雄動物では、投与後 1 時間においても、流涎の増加が認められた。また、これらの変化は、試験期間を通じて 30mg/kg/日群の雌雄動物にも認められた。

300mg/kg/日群の雌 1 匹において、円背位、嗜眠、努力性呼吸、あえぎ呼吸およびつま先歩行がみられ、試験 6 日に屠殺した。病理検査の結果、この動物は、投与に起因した死亡ではないと判断した。

その他の一般状態の所見として、試験期間を通じて 30 および 300mg/kg/日群の雌動物で単発的に全身性の脱毛が認められた。100mg/kg/日群の雄動物 1 匹で、投与期間の最終週にて前肢下部に腫瘤（約 2 x 2cm）が認められた。これは単発性の所見であり、実験動物において時折みられる偶発的なものであると考えられ、全身毒性を示すものではないと判断した。

5.1.3 行動機能検査

詳細な観察の結果については Table 4 および 5 に要約して示した。機能的検査の群平均および標準偏差を Table 6 および 7 に示し、個別値を Appendix 3 に示した。感覚反応検査については、Table 8 および 9 に要約して示した。個別値を Appendix 4 に示した。

5.1.3.1 詳細な観察

投与第 5 週において 300mg/kg/日群の雌 1 匹で呼吸音異常が観察されたが、この症状は毎日の一般状態観察の中でも認められているものであった。

排便やトランスファー・アローザル・スコアにおける群内および群間の差は、試験で用いられた系統および週齢のラットにおいて通常みられる変動範囲の結果と考えられ、毒性所見によるものではないと判断した。

5.1.3.2 機能的検査

投与終了時における被験物質投与群の自発運動量および握力のスコアは、対照群と同程度であり、統計学的解析において群間に有意差は認められなかった。

5.1.3.3 感覚反応検査

感覚反応検査に、被験物質の投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。300mg/kg/日群の雄 1 匹において右目の瞳孔反射の低下が認められたが、この所見は単発的なものであり、被験物質投与には起因しないものと判断した。

残りの感覚反応検査のスコアにおける群内および群間の差は、試験で用いられた系統および週齢のラットにおいて通常みられる変動範囲の結果と考えられ、毒性所見によるものではないと判断した。

5.1.4 体重

雄動物の体重および体重変動量について、その群平均および標準偏差を Table 10 に示した。雌動物の交配前、妊娠期間、哺育期間における体重および体重変動量について、その群平均および標準偏差を Table 11 に示した。累積した体重変動量を Figure 1 および 2 にグラフ化して示した。個別値は Appendix 5 および 6 に示した。

雄動物

300mg/kg/日群の雄動物において、試験期間を通じて、対照群と比較して累積体重増加量の低下が認められた ($P<0.05$ – $P<0.001$)。また、被験物質投与期間中の回復高用量群の雄動物においても、回復対照群と比較して、試験第 1 週 ($P<0.001$)、第 2、3、6 週 ($P<0.01$) に体重増加量の低下を示した。回復高用量群におけるこの変化は、回復期間中に回復性を示し、回復対照群よりも体重増加量が高く、回復期間最終週においては統計学的に有意な上昇を示した ($P<0.05$)。この体重増加量の低下により、試験期間を通じて、累積体重増加量も低値を示した ($P<0.01$ – $P<0.001$)。このことにより、回復高用量群における体重は、回復対照群と比較して投与 15 日から低値を示した ($P<0.05$)。

100mg/kg/日群の雄動物において、投与期間の最初の 3 週間において、累積体重増加量の低下が認められた ($P<0.05$)。

30mg/kg/日群の雄動物の体重増加量については、試験期間を通じて、対照群の値と同程度であった。

雌動物

300mg/kg/日群の雌動物 1 匹において、被験物質投与第 1 週の間には顕著な体重の減少 (28g)

がみられ、同群の 4 匹の雌動物においてもわずかな体重の減少が認められた。その結果として、同群の投与 1 週の平均体重増加量は、対照群と比較して統計学的に有意な低下を示した ($P<0.01$)。

100mg/kg/日群においても、被験物質投与第 1 週に対照群と比較して、体重増加量の低下を示した ($P<0.01$)。100mg/kg/日群の妊娠期間の体重増加量は、対照群と同程度であったが、哺育 0 日および 4 日の平均体重は、対照群と比較して有意な低下を示した ($P<0.05$)。30mg/kg/日群においても、対照群と比較して、哺育 0 日および 4 日の体重に統計学的に有意な低下を示したが、哺育 4 日の体重には明らかな用量相関性はなかった。

300mg/kg/日群にて妊娠動物がいなかったことから、この群の雌動物の妊娠期間および哺育期間の体重についてのデータは評価に用いなかった。300mg/kg/日を投与した回復高用量群では、被験物質投与第 1 週の間には体重の減少がみられ、投与 1 週の体重増加量の統計学的に有意な低下を示した ($P<0.05$)。

5.1.5 摂餌量

雄動物の摂餌量の群平均を Table 12 に、雌動物の交配前、妊娠および哺育期間を通じた摂餌量の群平均を Table 13 にそれぞれ示した。また、これらを Figure 3 および Figure 4 にグラフ化して示した。摂餌効率を Table 14 および 15 に示した。試験期間における雄動物および成熟期間における雌動物の個別ケージの数値、各ケージの個別値は Appendix 7 および 8 に示した。

雄動物

300mg/kg/日群の雄動物において、被験物質投与第 1 週に摂餌量および摂餌効率（体重増加量と摂餌量の比）が低下を示した。非回復高用量群の雄動物の摂餌量は、対照群と比較して 22%の低下を示し ($P<0.001$)、また、回復高用量群の雄動物では 28%の低下を示した。摂餌量と摂餌効率の低下は、非回復および回復高用量群の雄動物で、被験物質投与第 2 週の間にも認められた。非回復用量群の雄動物の摂餌量については、交配期間中は測定しなかった。但し、この期間中、回復高用量群の雄動物では、回復対照群と比較してわずかな低下が継続して認められた。この低下は、回復高用量群の雄動物では、残りの被験物質投与期間中も継続してみられたが、非回復高用量群の雄動物については、被験物質投与の最後の 2 週間では摂餌量の低下は認められなかった。回復期間において、回復高用量群の雄動物の摂餌量は回復性を示し、回復対照群の値よりも高値を示した。回復高用量群雄動物における摂餌効率は、被験物質投与期間を通じて、回復対照群よりも低値を示したが、回復期間中では回復対照群の値よりもわずかに高値を示した。

100mg/kg/日群の雄動物では、交配前期間中に、対照群と比較して摂餌量および摂餌効率の低下がみられ、被験物質投与第1週では統計学的に有意であった ($P<0.01$)。この用量群の摂餌量の変化は、交配期間終了後に回復性を示した。

30mg/kg/日群の雄動物の摂餌量および摂餌効率には影響は認められなかった。

雌動物

300mg/kg/日群の雌動物において、被験物質投与第1週に、対照群と比較して25%の摂餌量の低下が認められた ($P<0.01$)。また、回復高用量群において、摂餌量および摂餌効率の顕著な低下がみられ、対照群と比較した場合に、被験物質投与第1週では31%、投与第2週では19%の低下がそれぞれみられ、さらに投与第5週までわずかに低値を示した。この変化は、投与終了後、回復性を示し、回復期間中においては対照群と同程度であった。300mg/kg/日群にて妊娠動物がいなかったことから、この群の雌動物の妊娠期間および哺育期間の摂餌量のデータは評価に用いなかった

100mg/kg/日群の雌動物において、被験物質投与第1週に対照群と比較して、19%の摂餌量の低下が認められた ($P<0.05$)。この摂餌量の低下は、妊娠期間中にも認められ、妊娠第2週および3週に統計学的に有意であった ($P<0.01$)。なお、この用量群の哺育期間中の摂餌量は対照群と同程度であった。

30mg/kg/日群の雌動物において、統計学的有意差は認められなかったが、交配前期間の摂餌量は、対照群と比較してわずかに低値を示した。また、妊娠期間においても、対照群と比較して摂餌量の低下がみられ、妊娠期間の第2週においては統計学的に有意であった ($P<0.01$)。哺育期間中においても摂餌量のわずかな低下がみられたが、統計学的に有意な差は認められなかった。

5.1.6 摂水量

非回復群および回復群雌雄動物の週毎の摂水量の群平均を Table16 および 17 に示した。雄の試験期間および雌の交配前の個別ケージ毎のデータ、雌の交配後および哺育期間中の個別値を Appendix 9 および 10 に示した。

雄動物

非回復群の 300mg/kg/日群において、被験物質投与の最初の2週間に、対照群と比較して摂水量に有意な上昇が認められた ($P<0.001$)。この摂水量の上昇は、交配期間終了後の

被験物質投与の最後の 2 週においても認められた ($P<0.001-P<0.01$)。回復高用量群においても、同様の摂水量の上昇が投与期間中に認められたが、統計学的有意差は、被験物質投与第 2 週のみに認められた ($P<0.01$)。回復高用量群の雄動物での値は、回復期間中、対照群と同等であった。

100mg/kg/日群の雄動物においても、対照群と比較して、被験物質投与第 1 週 ($P<0.05$) および第 2 週 ($P<0.01$) で摂水量の統計学的に有意な上昇を示した。交配期間終了後にも、摂水量の上昇はみられたが、統計学的有意差は、試験第 5 週のみに認められた ($P<0.001$)。また、30mg/kg/日群において、交配前および交配後の期間に、対照群と比較して、同様の統計学的に有意な摂水量の上昇が認められた ($P<0.05-P<0.001$)。

雌動物

非回復群の 300mg/kg/日群の雌動物において、被験物質投与第 1 週および第 2 週に、対照群と比較して摂水量の統計学的に有意な上昇が認められた ($P<0.01-P<0.001$)。回復高用量群においても、被験物質投与の最初の 3 週間に、対照群と比較して統計学的有意差を伴う ($P<0.05-P<0.001$) 同様の摂水量の上昇が認められた。この回復高用量群の変化は、回復期間において回復性を示し、回復対照群と同程度となった。300mg/kg/日群にて妊娠動物がいなかったことから、この群の雌動物の妊娠期間および哺育期間の摂水量のデータは評価に用いなかった。

100mg/kg/日群の雌動物において、交配前期間に摂水量の上昇がみられ、投与第 1 週の上昇は対照群と比較して統計学的有意差を示した ($P<0.01$)。統計学的有意差は認められなかったが、妊娠期間および哺育期間においては対照群と比較して摂水量はわずかに上昇を示した。

30mg/kg/日群の雌動物においては、摂水量に対する顕著な影響は認められなかった。対照群と比較して、被験物質投与第 2 週、妊娠期間および哺育期間においてわずかに低下を示した (-11%)。これらのわずかな低下には統計学的な有意差はみられず、被験物質投与に起因すると考えられる顕著な影響は認められなかった。

5.1.7 臨床検査

5.1.7.1 血液学的検査

対照群と被験物質群のそれぞれの群平均値および標準偏差を Table 18 および 19 に示し、

統計学的有意差も示した。個別値は Appendix 11 および 12 に示した。

交配前の投与 14 日の検査において、300mg/kg/日群の雄動物で、統計学的有意差はなかったが、対照群と比較してヘモグロビン量および赤血球数にわずかな低値が認められた。また、同群で、対照群と比較して網状赤血球数に統計学的に有意なわずかな低値が認められた ($P<0.05$)。剖検前の投与 42 日の検査において、300mg/kg/日群の雄動物で、対照群と比較してヘモグロビン量および赤血球数に統計学的に有意な低値が認められた ($P<0.01$)。同群において、統計学的有意差は認められなかったが、対照群と比較してヘマトクリット値も低値を示した。回復期間終了時の検査において、300mg/kg/日群の雄動物で、赤血球数は低値を示したままであったものの、その他の項目の変化には回復性が認められた。なお、回復期間終了時の検査において、対照群と比較して、300mg/kg/日群の雄動物で、平均赤血球容積 ($P<0.05$) および平均赤血球血色素量 ($P<0.01$) の統計学的に有意な高値が認められた。

100 および 30mg/kg/日群の雄動物においては、被験物質投与に起因する血液学的検査への影響は認められなかった。

一方、雌動物では、交配前および哺育 4 日の検査における全ての被験物質投与群、ならびに回復期間の検査における 300mg/kg/日群で、対照群と比較して被験物質投与に起因する変化は認められなかった。300mg/kg/日群にて妊娠動物がいなかったことから、この群の雌動物の哺育 4 日の血液学的検査データは評価に用いなかった。なお、投与 14 日において、100mg/kg/日群の雌動物で、対照群と比較して平均赤血球血色素量に統計学的に有意な低値を示したが ($P<0.05$)、この変動は小さく、用量相関性がみられず、他の血液学的項目に変化がなかったことから、この結果は偶発的なものと考えられた。

5.1.7.2 血液化学的検査

対照群と被験物質群のそれぞれの群平均値および標準偏差を Table 20 および 21 に示した (統計学的有意差を示した)。個別値は Appendix 13 および 14 に示した。

交配前の投与 14 日の検査において、300mg/kg/日群の雌雄動物では、対照群と比較して、アルブミンに統計学的に有意な低値を示した ($P<0.01$)。これに伴い、統計学的有意差は 300 mg/kg/日群の雌動物においてのみであったが、A/G 比の低値もそれぞれ認められた ($P<0.001$)。100mg/kg/日群の雌雄動物においても、対照群と比較してアルブミンの低値がみられ ($P<0.05$)、同群の雌動物では、対照群と比較して、わずかではあるが統計学的に有意な A/G 比の低値が認められた ($P<0.05$)。

交配前検査において、統計学的有意差は雌のみであったが ($P<0.001$)、高用量群でアラニンアミノトランスフェラーゼの高値が認められた。さらに、300mg/kg/日群の雄動物では、対照群と比較して、わずかではあるが統計学的に有意な尿素窒素の高値がみられ ($P<0.05$)、同用量群の雌動物では、対照群と比較して、統計学的に有意なクロールの低値が認められた ($P<0.01$)。また、全ての被験物質投与群の雌雄動物において、対照群と比較して、コレステロールの低値が認められた ($P<0.05$ – $P<0.01$) が、雌動物では明確な用量相関性はなかった。

剖検前の投与 42 日の検査において、300mg/kg/日群の雄動物では、対照群と比較して、交配前検査と同様の尿素窒素の統計学的に有意な高値が認められた ($P<0.01$)。さらに、同群では、対照群と比較してアルブミンの有意な低値がみられ ($P<0.01$)、100mg/kg/日群の雄動物においても、同様のアルブミンの有意な低値が認められた ($P<0.05$)。また、300 および 100mg/kg/日群の雄動物では、対照群と比較して、コレステロールの有意な低値が交配前検査と同様に認められた ($P<0.05$ – $P<0.01$)。300mg/kg/日群の雄動物では、アラニンアミノトランスフェラーゼの高値も交配前検査と同様にみられ ($P<0.01$)、この変化は 100mg/kg/日群の雄動物でも認められた。30mg/kg/日群の雄動物には影響は認められなかった。

哺育 4 日の検査におこなわれた雌動物の検査において、全ての被験物質投与群で統計学的に有意な群間差は認められなかった。300mg/kg/日群にて妊娠動物がいなかったことから、この群の血液化学検査データは評価に用いなかった。

回復期間終了時の検査において、投与期間中に高用量群でみられた変化については、回復性が認められた。なお、回復高用量群の雄動物において、対照群と比較して、ビリルビンのわずかな低値がみられ ($P<0.05$)、A/G 比のわずかな高値 ($P<0.05$) およびクロールの高値が認められた ($P<0.01$)。回復高用量群雌動物では対照群と比べ、クロールにわずかな低値が認められた ($P<0.05$)。

5.1.7.3 尿検査

尿検査データを Table 22 に要約して示し、個別値は Appendix 15 に示した。

投与期間終了時および回復期間終了時において、全ての被験物質投与群の雄で、対照群と比較して、被験物質投与に起因する影響は認められなかった。

定量データについて、統計学的に有意な群間差は認められなかった。

5.2 生殖に関するデータ

5.2.1 性周期

被験物質投与群、対照群の性周期についての群平均値は Table 23 に示した。個別値は Appendix 16 に示した。

300mg/kg/日群の雌 1 匹で休止期が継続し、交尾が成立しなかった。また、300mg/kg/日群の別の雌 1 匹は性周期の延長が認められた。この雌動物は、交尾は成立したが妊娠しなかった。これらの変化は通常認められる変化ではない。

その他の被験物質投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

対照群、30 および 100mg/kg/日群の全ての雌動物の性周期は正常であった。

5.2.2 交配

結果の要約を Table1 に示した。交配能についての群平均値を Table24 に示した。個別値は Appendix 17 に示した。

対照群と被験物質投与群の交配の成績に差は認められなかった。30mg/kg/日群において、全てのペアは交配開始後 4 日以内に交尾成立した。100mg/kg/日群において、交尾確認ができなかった 1 ペアおよび交尾不成立の 1 ペアを除き、残りの全てのペアは交配開始後 5 日以内に交尾成立した。300mg/kg/日群においては、1 ペアは交尾が成立しなかった。また、300mg/kg/日群では、交配開始後 14 日に交尾成立した 1 ペアを除き、残りの全てのペアは、交配開始後 6 日以内に交尾成立した。なお、対照群の 1 ペアは交配開始 14 日に交尾成立した。交尾の確認ができなかった 1 ペアを除き、残りの対照群のペアは、交配開始後 4 日以内に交尾成立した。

交配までの同居日数の統計解析で、対照群と被験物質投与群の間に統計学的有意差は認められなかった。

5.2.3 受胎能

成熟個体の結果の要約を Table1 に示した。受胎能、出産児データおよび胚損失率などの群

平均値を Table 24、25 および 26 に示した。個別値は Appendix 17 から 19 に示した。

300mg/kg/日群の雌動物は 1 匹も妊娠しなかった。100mg/kg/日群の雌動物では、7 匹が妊娠し、別の 3 匹では交尾成立したが妊娠しなかった。また、100mg/kg/日群の残りの 1 匹では交尾の兆候を示し、剖検で黄体と着床痕の存在を確認したが、この雌動物は生存児を出産しなかった。30mg/kg/日群では、全ての雌動物で交尾成立したが、2 匹が妊娠しなかった。また、別の 1 匹では生存児を出産しなかったが、剖検時に子宮内に 2 匹の死亡胎児を確認した。対照群では、交尾成立した 11 匹が妊娠した。

5.2.4 妊娠期間

妊娠期間についての群平均値を Table 24 に示した。個別値は Appendix 17 に示した。

対照群と比較して、被験物質投与群の妊娠期間に、被験物質投与による影響は認められなかった。

対照群および被験物質群の妊娠期間は、22 から 24 日であった。なお、100mg/kg/日群の雌動物 1 匹で交尾までの同居日数が確認できなかったために、妊娠期間が算出できなかった。

統計学的解析の結果、妊娠期間について、有意な群間差は認められなかった。

5.3 出産児のデータ

対照群の雌動物 11 匹、30mg/kg/日群の雌動物 9 匹、100mg/kg/日群の雌動物 7 匹が生存児を出産し、哺育 5 日まで哺育した。300mg/kg/日群では妊娠が全く認められなかった。また、100mg/kg/日群の雌動物 3 匹は妊娠せず、この用量群の雌 1 匹では妊娠したが、病理学的検査において、子宮に壊死の痕跡が残っていたため、胎児死亡後の吸収が示唆された。30mg/kg/日群の雌動物では、2 匹が妊娠しなかった。また、この用量群の雌 1 匹において、妊娠は認められたが、解剖時に各子宮角で胎児の存在が確認されたことから、胎児死亡後の吸収が示唆された。

哺育 5 日の剖検時まで哺育した全ての児動物について、次のように評価した。

5.3.1 産児数と生存率

黄体数、着床痕、産児数、胚損失率と生存率および性比の群平均値を Table 25～27 に示した（統計学的有意差を含めて）。個別値は Appendix 18～20 に示した。

被験物質群の産児数、生存率および性比について、対照群と比較して投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。100 および 30mg/kg/日群の雌動物の黄体数、着床痕数、着床前損失率および着床後損失率について、対照群と比較して被験物質投与に起因する影響は認められなかった。300mg/kg/日群の雌動物については、妊娠しなかったため、黄体および着床痕が確認されなかった。

100、30mg/kg/日群において、産児数がわずかに少なかったが、用量相関性はみられず、検査されたパラメーターに統計学的な群間差は認められなかった。

5.3.2 児動物の成長と発達

児動物の体重、体重変化、平面正向反射試験および一般状態所見の群平均値を Table 25, 28 および 29 に示した（統計学的有意差を含めて）。個別値は Appendix 18、21 および 22 に示した。

被験物質群の母動物（腹）毎の体重および児動物毎の体重については、対照群と比較して統計学的に有意な変化は認められなかった。哺育 1 日の平面正向反射の評価においても、対照群と比較して統計学的に有意な群間差は認められなかった。

児動物の一般状態観察において、被験物質投与に起因すると考えられる所見は認められなかった。観察された一般状態所見は、この種の生殖発生毒性試験での児動物に一般的にみられるものであり、被験物質投与による重篤な影響を示すものではない。

哺育 4 日において、30mg/kg/日群の児動物の母動物（腹）毎の体重は、対照群と比較して統計的に有意なわずかな低下が認められた ($P<0.05$)。その差はごくわずかであり、用量相関性は認められなかったことから、この変化は偶発的なものであり、毒性学的に重要ではないと考えられた。

5.4 病理学的検査

5.4.1 剖検

剖検結果の要約を、児動物は Table 30 に、親動物は Table 31 および 32 にそれぞれ示した。個別値は Appendix 23～25 に示した。

出産児のデータ

被験物質群の児動物の剖検所見において、対照群と比較して被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

途中死亡の児動物において、30mg/kg/日群の喰殺が原因で死亡した児動物 3 匹を除いて、剖検所見は自己融解が認められた。この所見は、生殖発生毒性試験の児動物の途中死亡例で時折みられるものであり、被験物質投与の影響によるものではないと考えられた。

定期剖検時における被験物質群の児動物にみられた剖検所見として、100mg/kg/日群の雌児動物 2 匹と 30mg/kg/日群の雌児動物 1 匹の小型化が認められた。一方、対照群では、雌児動物 1 匹に尾欠損、別の雌児動物に腹部に痂皮形成が認められた。これらの剖検所見はこの種の試験で時折みられる所見であり、毒性学的に重要ではないと考えられた。

親動物のデータ

被験物質投与に起因する剖検所見として、投与期間終了時に 300mg/kg/日群の雄動物 4 匹で精囊および前立腺の小型化が認められた。また、100mg/kg/日群の雄動物 1 匹で精巢および精巢上体の小型化がそれぞれ認められた。14 日間の回復期間終了時の剖検においても、高用量群の雄 1 匹で精巢および精巢上体の小型化が認められた。

30mg/kg/日群の妊娠しなかったと疑われた雌動物において、副腎の退色および腺胃の脆弱化が認められた。また両方の子宮角に一匹ずつ死亡胎児が認められたため、この動物が妊娠していたことが確認された。子宮内で胎児が確認されたことにより、全胎児死亡後の吸収が生じたと考えられる。

試験 6 日に切迫屠殺した 300mg/kg/日群の雌 1 匹については、副腎の肥大および暗色化、腺胃の脆弱化、肝臓の暗色化、腸管部のガス膨張、肺の赤色化および胸腔の被験物質調製液様液体の貯留がみられ、また腫瘍が左前肢下部に認められた。病理学的検査において、死亡の原因は被験物質調製液の誤投与が原因であることが示唆されたことから、被験物質の毒性によるものではないと考えられた。

その他の剖検所見として、100mg/kg/日群の雄動物 1 匹で右腎臓の水腎症がみられ、同群の他の雄動物 1 匹で左肺葉に斑点と黄緑色の粘性のある物質を含んだ約 2 x 2cm の腫瘍が認められた。また、300mg/kg/日群の雌動物 1 匹で、約 1.5 x 1.5 cm の腫瘍が認められた。

30mg/kg/日群の雄動物ならびに 30、100 および 300/kg/日群の雌動物については、被験物質投与に起因すると考えられる剖検所見は認められなかった。

上記以外に認められた剖検所見については、偶発的なものであると考えられた。

5.4.2 器官重量

絶対および相対器官重量のデータについての群平均値を Table 33~36 に示し（統計学的有意差を含め）。個別値は Appendix 26 および 27 に示した。

雄動物

投与期間終了時の検査において、300mg/kg/日群の雄動物で、精巣上体の絶対重量に統計学的に有意な低値がみられ（ $P<0.001$ ）、相対重量にも統計学的に有意な低値（ $P<0.01$ ）が、対照群と比較してそれぞれ認められた。さらに、同群において、精巣の絶対重量および相対重量に低値がみられ、絶対重量については対照群と比較して統計学的に有意な変化であった（ $P<0.05$ ）。また、300mg/kg/日群の雄動物では、副腎の絶対重量および相対重量に高値がみられ、相対重量については対照群と比較して統計学的に有意な変化であった（ $P<0.01$ ）。さらに、同群の雄動物で、肝臓相対重量も対照群と比較して有意な高値を示した（ $P<0.05$ ）。回復期間終了時の検査において、回復高用量群の雄動物で、副腎の相対重量が依然として高値を示した（ $P<0.01$ ）。また、脾臓および胸腺の相対重量も対照群と比較して高値であった（ $P<0.05$ ）。

雄動物については、上記の他に被験物質投与に起因するまたは毒性影響と考えられる器官重量の変化は認められなかった。なお、回復期間終了時の検査において、回復高用量群の雄動物で、対照群と比較して、肝臓の絶対重量が統計学的に有意なわずかな低値を示したが、肝臓の相対重量に変化はみられず、この所見は全身毒性に関連しない所見であると考えられた。また、同用量群で、脳の相対重量が対照群と比較して、統計学的に有意な高値を示した（ $P<0.05$ ）が、病理学的検査で関連する所見が認められなかったことから、これらは遅発性の全身毒性を示すものではないと考えられた。

100 および 30mg/kg/日群の雄動物には、上記の変化は認められなかった。

雌動物

哺育 5 日の検査において、被験物質投与群の雌動物に、対照群と比較して毒性学的に有意な変化は認められなかった。

100 および 30mg/kg/日群の雌動物において、わずかではあるが、次の統計学的に有意な変化が認められた。100 および 30mg/kg/日群の雌動物で、心臓の絶対重量で対照群と比較して統計学的に有意な低値が認められた。同群においては、脳の相対重量の高値が認められ

た ($P<0.05$)。用量相関性が明らかでなく、病理学的変化がこれらの器官で認められなかったことから、これらの所見は被験物質投与の影響とは考えられなかった。

300mg/kg/日群の雌動物については、妊娠が認められなかったため、出産後の器官重量データは評価に用いなかった。なお、14 日間の回復期間終了時の検査において、300mg/kg/日群の雌動物で対照群と比較して器官重量に有意差は認められなかった。

5.4.3 病理組織学的検査

病理組織学的検査についての結果を Table 37 および 38 に要約して示した (統計学的有意差を含め)。個別値を Appendix 28 および 29 に示した。

病理学的検査において、次の毒性学的に有意な変化が認められた。

乳腺：300、100 および 30mg/kg/日群の雄動物において、乳腺組織の管状腺胞状化が認められた。これらのうちその発生頻度について、中間および低用量群で統計学的有意差は認められなかったが、300mg/kg/日群においては対照群と比較して統計学的有意差が認められた。この変化は、時折通常の分化プロセスの一部として雄動物の乳腺組織で見られることがあるが、本試験における被験物質投与群の発生頻度の増加と程度の増強は、被験物質投与の影響を示していると考えられた。回復期間終了時の検査において、300mg/kg/日群の雄回復動物でも、対照群と比較して、乳腺組織の管状腺胞状化の発生頻度の増加と程度の増強がみられたため、その回復性は認められなかった。

300mg/kg/日群の 4 匹の非妊娠雌動物において、軽微な乳腺組織の腺過形成が認められた。この所見は、被験物質投与の影響による所見の可能性がある。この過形成は、14 日間の回復期間終了時の検査において、回復対照群および 300mg/kg/日群の雌動物では認められなかった。

卵巣：300mg/kg/日群の非妊娠雌動物の少数例で卵胞嚢胞が認められた。本試験では、直接比較することが可能な対照群がないことを考慮しても、この所見は被験物質投与に起因した変化の可能性はある。回復期間終了時の検査で、300mg/kg/日群の雌動物の卵巣においても卵胞嚢胞がみられ、回復対照群の雌動物には認められなかったことから、被験物質投与による影響に回復性は認められなかった。

精巣：300 および 100mg/kg/日群の雄動物において、被験物質投与に起因する変化として、ライディッヒ細胞の委縮が認められた。これらのうち、300mg/kg/日群の変化は対照群と比較して統計学的有意差がみられたが、100mg/kg/日群では統計学的に有意ではなかった。

14 日間の回復期間終了時の検査において、300mg/kg/日群の回復雄動物ではライディッシュ細胞の委縮が認められた動物は 1 匹のみであったことから、この変化は回復性を示した。なお、300mg/kg/日群の回復雄動物の 2 匹で中程度あるいは重度の精巣の委縮がみられたが、この所見は実験動物ラットでは偶発的に発生するものであり、被験物質投与の遅発性の影響を示唆するものではないと考えられた。

精囊/凝固腺：300 および 100mg/kg/日群の雄動物において、分泌量の減少による臓器の小型化が認められた。この変化は対照群と比較して、統計学的に有意であった（300mg/kg/日：P<0.001, 100mg/kg/日：P<0.05）。30mg/kg/日群では、この所見は認められなかった。これらの変化は、14 日間の回復期間終了時の検査において、300mg/kg/日群においても認められたことから、この被験物質投与による変化に回復性は認められなかった。

前立腺：300 および 100mg/kg/日群の雄動物において、分泌量の減少による臓器の小型化が観察された。この変化は対照群と比較して、統計学的に有意であった（300mg/kg/日：P<0.001, 100mg/kg/日：P<0.05）。30mg/kg/日群では、この所見は認められなかった。これらの変化は、14 日間の回復期間終了時の検査において、300mg/kg/日群においても認められたことから、被験物質投与による影響に回復性は認められなかった。

また、被験物質投与に起因すると考えられる以下の病理組織学的所見が認められた。

肝臓：300 および 100mg/kg/日群の雄動物において、被験物質の投与に関連する変化として、小葉中心部の肝細胞の肥大が認められ、この変化は対照群と比較して有意な変化であった（P<0.001）。この所見は 30mg/kg/日群においてもみられ、対照群と比較して有意な変化であった（P<0.05）。雌動物においても、300 および 100mg/kg/日群で同様の変化が認められた。これらのうち、300mg/kg/日群については統計学的解析を行わなかったが、100mg/kg/日群では対照群と比較して統計学的有意差が認められた（P<0.01）。この所見は、300mg/kg/日の雌雄動物において、回復期間終了時に回復性が認められた。

腎臓：300mg/kg/日群の雄動物において、被験物質の投与に関連する変化として、好塩基性尿細管と尿細管の拡張の程度の増強が認められ、対照群と比較して有意な変化を示した（P<0.01）。他の用量群ではこの変化は認められなかった。また、雌動物では高用量群あるいはその他の用量群においても同様の変化は認められなかった。

両所見とも回復高用量群において、回復期間終了時に回復性が認められた。

副腎：皮質の空胞形成は、実験動物ラットにおいて通常観察される。特に雄において観察されるが、一方、雌では稀な頻度で観察される。本試験において、この空胞化は 300 (P<0.001) および 100 (P<0.05) mg/kg/日群の雄動物で発生頻度が有意に低かった。発生頻度および病変の程度の群間のばらつきがみられたが、被験物質投与による影響は排除できるものではなかった。同様な変化は雌動物では認められなかった。

この群間差は回復動物の検査でも認められ、14 日間の回復期間終了時にも完全に回復性が認められなかった。

肺：対照群の雌雄動物において、肺泡マクロファージ集簇が、微少程度から中程度に認められた。このマクロファージの反応は、この週齢の対照群に通常みられるものよりも、その程度が高かった。肺泡マクロファージ集簇の発生頻度および程度は、300mg/kg/日群の雌雄動物および 100mg/kg/日群の雌動物で低かった。これらのうち、300mg/kg/日群の雌動物については統計学的解析を行っていないが、300mg/kg/日群の雄動物では、対照群と比較して統計学的に有意な変化であり (P<0.05)、また 100mg/kg/日群の雌動物の変化も対照群と比較して有意であった (P<0.01)。なお、その他の投与群ではこのような変化は認められなかった。これらの肺実質のマクロファージ浸潤の発生頻度と程度の軽減化は、偶発性所見の可能性もあるが、被験物質投与の影響の可能性を排除するものではない。

14 日間の回復期間終了時の検査において、肺泡マクロファージ集簇の発生頻度および程度に群間差は認められず、被験物質投与の影響に回復性が示唆された。

下垂体：前葉細胞の空胞化は雄動物において一般的にみられるが、この週齢の雌動物にはまれにみられる程度である。今回の試験において、対照群の雄動物での空胞化の発生頻度および程度は、通常もしくは通常より若干高かったことを考慮したとしても、300mg/kg/日群の雄動物では低かった (P<0.001)。これは、被験物質投与の影響が示唆された。この変化は、雌動物あるいは他の用量群の雄動物では認められなかった。14 日間の回復期間終了時の検査においては、300mg/kg/日群でみられた所見に回復性は認められなかった。

その他、生殖器官に認められた上記以外の病理学的変化については、自然発生的なものであり、被験物質投与に関連しないものと考えられた。以下にその所見を示す。

子宮／頸部：30mg/kg/日群および 100 mg/kg/日群の子宮内で全胎児の消失を示した雌動物各 1 匹、さらに 30mg/kg/日群の非妊娠動物 1 匹、ならびに 100 および 300mg/kg/日群の非妊娠動物各 2 匹で、子宮頸部の角化を伴うあるいは伴わない子宮角の拡大が認められた。但し、これは雌ラットにおける正常な周期的変化である。

さらに、100mg/kg/日群の雌動物 1 匹の子宮に壊死の痕跡が認められた。この雌動物は剖検時に黄体および着床痕がみられ、このことから胎児の吸収があったことが示唆された。

膈：高用量群の非妊娠雌動物 4 匹において、膈上皮の過形成が認められたが、性周期による変化であり、被験物質投与の影響を示唆するものとは考えられなかった。同様に、中間用量群の雌動物において、粘液性から非粘液性への正常変遷にみられる分娩後の膈上皮の空胞変性が、対照群と比較して、その程度の増強を示したが、被験物質投与に起因した変化とは考えられなかった。膈上皮の角化亢進は、雌動物における正常な周期的変化である。

なお、300mg/日群の切迫屠殺した雌動物において、誤投与を示唆する病理学的変化が示された。従って、この死亡は被験物質の毒性に起因したものではないと考えられた。

上述した変化以外のその他の全ての形態学的変化は、試験施設で飼育されるラットのこの系統・週齢に通常みられるものであり、対照群と被験物質投与群の間に頻度あるいは程度の差がなかったことから、全て毒性学的に重要なものではないと考えられた。

6. 考察

4,4'-(1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロプロパン-2, 2-ジイル)ジフェノールを30、100および300mg/kg雌雄ラットに最長55日間（雌ラットにおいては2週間の交配前期間、妊娠期間および初期哺育期間を含む）、強制経口投与した場合、全ての投与群において被験物質に起因すると考えられる変化が認められた。

雌動物の場合、300mg/kg/日投与群の 2 匹において、被験物質投与の第 1 週の最後に、脱水症状および肛門生殖器周囲の汚れが認められた。しかし、この変化はその後認められなかった。それ以外の全ての被験物質投与群の雌雄動物にみられた一般状態所見としては、主に被験物質調製液の投与後にみられた流涎の増加および口周囲の汚れであり、さらに、高用量群では上記の症状とともに呼吸音異常が認められた。これらの所見は被験物質の投与の終了後に軽減された。これらは、一般には、被験物質の不快感あるいはわずかな刺激性の物質を経口投与した場合によくみられる。このことは、被験物質投与群において、対照群と比較して投与期間中に摂水量が増加したことからも裏付けられる。さらに、被験物質投与群では、対照群と比較して体重増加量の低下および体重の減少がみられ、また摂餌量および摂餌効率の低下も認められた。また、回復期間においては、回復高用量群で摂餌量および摂餌効率の変化に回復性が認められた。

血液化学的検査では、300mg/kg/日群の雄動物において、血中アルブミン、A/G 比およびコレステロールの低値が認められた。一方、300mg/kg/日群の雌動物において、交配前の血液検査の結果、アルブミン、A/G 比およびコレステロールの低値が認められた。被験物質投与期間中にみられた血液化学的変化は、回復期間終了時に回復性を示した。また、100mg/kg/日群の雌雄動物において、アルブミンおよびコレステロールの低値が認められた。30mg/kg/日群の雄動物で、試験 14 日にコレステロールの低値が認められたが、定期剖検前の検査ではこの変化は認められなかった。血液化学検査において、300mg/kg/日の雌雄および 100mg/kg/日群の雄動物で、アラニンアミノトランスフェラーゼの高値が認められた。また、高用量群の雄動物において、肝重量の高値がみられ、さらに、全ての投与用量群の雄動物、300 および 100mg/kg/日群の雌動物において、対照群と比較して、肝臓の病理学的検査により肝小葉中心部の肝細胞の肥大が認められた。しかし、14 日間の回復期間終了時の検査では、300mg/kg/日の回復群で回復性を示した。一般に、肝細胞の肥大は生体異物の投与の後にげっ歯動物の肝臓で見られるものであり、関連する炎症あるいは変性の所見がみられなかったことから、自然状態での適応反応と考えられた。ミクロゾーム酵素の誘導、肝重量の増加及び肝細胞肥大には相関性がある (Armacher ら 1998)。また、腎臓に病理学的所見もみられ、すなわち、好塩基性尿細管と尿細管拡張の程度の増強を示したが、回復高用量群の雄動物では、この変化は回復性を示した。

雄動物においてみられたもっとも顕著な変化は、生殖器官において認められた。すなわち、器官重量については、300mg/kg/日群で対照群と比較して、精巣上体と精巣重量が低値を示した。剖検では、300mg/kg/日群の非回復雄動物において、精囊と前立腺の小型化が認められた。300mg/kg/日群の雄動物の 1 匹において、14 日間の回復期間終了時の検査で、精巣および精巣上体の小型化が認められた。病理学的検査では、300 および 100mg/kg/日群の雄動物で、精囊の分泌量の減少が認められた。また、同用量群の雄動物で、前立腺の分泌量の減少がみられたが、回復期間終了時の検査においても、回復群 300mg/kg/日の雄動物では、この所見に回復性は認められなかった。さらに、雄動物の 300mg/kg/日群では、1 匹を除いてその他全ての雄動物に、精巣ライディッヒ細胞の萎縮が認められた (精細管の異常は伴わない)。14 日間の回復期間終了時の検査では、回復群 300mg/kg/日群の雄動物では、1 匹を除き、回復性が認められた。また、100mg/kg/日群の動物においてもライディッヒ細胞の萎縮が認められた。なお、30mg/kg/日群の雄動物においては、精巣、精囊および前立腺に被験物質の投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

300mg/kg/日群の雄動物では、わずかな血液学的な変化が認められた。すなわち、被験物質投与期間において、ヘモグロビン量、赤血球数、ヘマトクリット値および網状赤血球数の低値が認められた。また、回復群の 300mg/kg/日の雄動物において、回復期間終了時にほぼ回復性が認められた。さらに、回復群の雄動物においては、脾臓の相対重量が高値を示

した。病理学的検査においては、顕著な変化は認められなかったものの、必ずしも被験物質投与の影響の可能性を排除することはできなかった。

300mg/kg/日群の雌動物 1 匹で休止期が継続し、交尾が成立しなかった。また、300mg/kg/日群の別の雌動物 1 匹では、性周期の延長が認められた。この動物は、交尾成立はしたものの妊娠はしなかった。同用量群の残りの雌動物 9 匹については、交尾成立はしたものの妊娠しなかった。さらに、100mg/kg/日群の雌動物 3 匹は交尾成立を示したが、妊娠しなかった。なお、同用量群の雌 1 匹では、黄体および着床痕がみられたが生存児を出産しなかった。この動物について病理学的検査をしたところ、子宮に壊死の痕跡が認められたことから、子宮内での胎児死亡後の吸収が示唆された。30mg/kg/日群の雌動物 2 匹は妊娠せず、さらに同用量群の雌動物 1 匹は妊娠しなかったことが疑われたが、剖検の結果、死亡胎児が認められたことから、子宮内での胎児死亡後の吸収が示唆された。これら高用量投与群の妊娠に対する影響、同用量群での雄動物の乳腺の変化、300mg/kg/日群の 4 匹の非妊娠動物の軽微な乳腺組織の腺過形成、ならびに低および中間用量群の雌動物に数例で不妊動物がみられたことは、毒性学的に重要な影響であると考えられた。本試験の結果からは被験物質の毒性発現機序は明らかではないが、雌雄動物の生殖器官で認められた所見から、被験物質はエストロゲン様作用を有することが疑われる。

要約すると、受胎能については、300 および 100mg/kg/日群の動物において、顕著な影響が認められ、300mg/kg/日群ではまったく妊娠せず、100 および 30mg/日群では妊娠動物が少ないという結果であった。

100 および 30mg/kg/日群の動物が出産した児動物については、対照群と比較して被験物質に起因すると思われる影響は認められなかった。すなわち、被験物質投与群の出産児数および母動物（腹）毎の体重に対照群と差は認められず、これらの投与用量において児動物の発達に被験物質投与に起因する影響は認められなかった。

被験物質 4, 4'-(1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロプロパン-2,2-ジイル)ジフェノールは、ビスフェノール A の誘導体である。ビスフェノール AF として知られる本被験物質の化学的プロファイルとして、ビスフェノール AF の類似体および誘導体（ビスフェノール A を含む）は、エストロゲン作動性とアンドロゲン拮抗性の両方の作用を有していることが報告されている（The National Toxicology Program 2008）。これに関連して、Hashimoto ら（2001）および Kitamura ら（2005）は、この物質が *in vitro* でエストロゲン様作用を、*in vivo* で内分泌かく乱作用を示したことを報告している。

本試験で用いられた被験物質とビスフェノール A の作用が類似していることは明らかであり、ビスフェノール A は *in vivo*、*in vitro* の双方で高プロラクチン血症を引き起こすこと

が示されている(Steinmetz ら 1997)。

ビスフェノール A の三世代繁殖試験において、500mg/kg/日の用量で着床数の減少および産児数の減少がみられ、この変化は三世代すべてにおいて認められている (Tyl et al 2002)。病理組織学的検査では、有意な変化は確認されなかった。この試験は Sprague –Dawley ラットを用いて混餌投与条件下で行われたものであるが、本試験の被験物質は生殖器官に対してビスフェノール A よりも強い活性を有していることが示唆された。

7. 結論

4,4'-(1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロプロパン-2,2-ジイル)ジフェノールのラットに、最長 55 日間 (2 週間の交配前期間、雌動物の妊娠および初期哺育期間を含む)、300mg/kg/日の用量まで強制経口投与した結果、全ての用量群の雌雄動物において、被験物質投与による影響が認められた。

雄親動物については、全ての被験物質投与群で乳腺の病理学的変化がみられ、さらに 300mg/kg/日群で雌動物が妊娠せず、100 および 30mg/kg/日群で、授胎能の低下が示唆されたことから、NOAEL は求められなかった。

雌親動物については、300mg/kg/日の投与群で妊娠が認められなかった。30mg/kg/日において、全身毒性を示す重篤な症状が認められなかったため、全身毒性の NOAEL は 30mg/kg/日と判断した。また、対照群と比較して、100 および 30mg/kg/日群で、妊娠率の低下が認められたことから、生殖発生毒性についての NOAEL は求められなかった。

出産児動物については、本試験条件下では NOEL および NOAEL は 100mg/kg/日と判断した。

和文翻訳責任者：

ハーランラボラトリーズジャパン株式会社

クライアントサービス部

TEL: 03-5791-3771

