

試験目的

この試験は、ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を明らかにするために実施した。

材料および方法^{1, 2)}

1. 被験物質

名 称 : ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）

（英名 : 4,4'-isopropylidenediphenol ethoxylated）

CAS 番号 : 32492-61-8

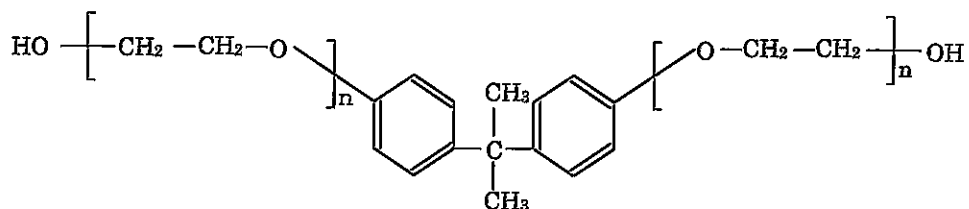
ロット番号 : L3-6S004-A

純 度 : 99%以上（水分 : 0.04%）

付加モル分布 : 1 モル : 0.0%、2 モル : 5.6%、3 モル : 16.9%、4 モル : 23.3%、
5 モル : 21.1%、6 モル : 15.8%、7 モル : 8.2%、8 モル : 4.0%
9 モル以上 : 5.1%（分析日 : 平成 18 年 10 月 19 日）

示 性 式 : $(C_2H_4O)_n(C_2H_4O)_nC_{15}H_{16}O_2$

構 造 式 :



入 手 先 : 三洋化成工業株式会社（京都府京都市東山区一橋野本町 11-1）

入手日・量 : 平成 19 年 3 月 14 日・25 g

物 性 等 :

化学名 : ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）

分子量 : 432（付加モル数 5 モルと仮定した場合）

性状(常温) : 無色透明液体

酸価 : 0.013 mgKOH/g

水酸基価 : 239 mgKOH/g

[S9 製造法]

A. 使用動物

- a) 種・系統： Sprague-Dawley 系ラット（日本エスエルシー株式会社）
- b) 性・週齢： 雄・7 週齢
- c) 体 重： 213~247 g (CAM-561)、194~235 g (CAM-578)

B. 誘導法

- a) 誘導物質： phenobarbital (PB)、5, 6-benzoflavone (BF)
- b) 投与経路： 腹腔内投与
- c) 投与法（投与開始日起算）
 - 1 日目：PB 30 mg/kg、 2 日目：PB 60 mg/kg
 - 3 日目：PB 60 mg/kg + BF 80 mg/kg、 4 日目：PB 60 mg/kg

C. 調製法

最終投与の翌日に肝臓ホモジネートを遠心分離(9000×g)し、その上清を採取

S9 mix 1 mL 当たりの組成

S9	0.3 mL
MgCl ₂	5 μmol/0.1 mL
KCl	33 μmol/0.1 mL
G-6-P	5 μmol/0.1 mL
NADP	4 μmol/0.1 mL
HEPES 緩衝液	4 μmol/0.2 mL
蒸留水	0.1 mL

8. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における被験物質の適切な用量を検討するため、46.88、93.75、187.5、375、750、1500 および 3000 μg/mL（溶媒に溶解可能な上限量）の用量を用いて、次に記載する細胞増殖抑制試験を行った。なお、試験には各用量について2枚のシャーレを使用した。

1) 被験物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質を DMSO に溶解して最高用量の供試液（原液）を調製し、次いで、原液の一部を DMSO で順次希釈して所定用量の供試液を調製した。被験物質の添加量は、各シャーレの培養液量の 0.5 vol% とした。

2) 細胞の処理

短時間処理法の場合、直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ（Becton Dickinson 社）に 4×10^3 個/mL の細胞を含む培養液 5 mL を加え、培養開始 3 日後に S9 mix 非存在下の場合は各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除

き、DMSO（陰性対照）または被験物質の供試液各 0.015 mL をシャーレに加えた。また、S9 mix 存在下の場合は各シャーレとも 2.5 mL を残して培養液を取り除き、S9 mix 0.5 mL を加えた後、DMSO または被験物質の供試液各 0.015 mL をシャーレに加えた。培養 6 時間後に培養液を取り除き、新しい培養液 5 mL を加えて 18 時間培養した。一方、連続処理法の場合は短時間処理法の場合と同様の方法で細胞を培養し、培養開始 3 日後に DMSO または被験物質の供試液各 0.025 mL をシャーレに加えて 24 時間および 48 時間培養した。なお、短時間処理法および連続処理法ともに 1500 μ g/mL 以上の用量ではその供試液を培養液に添加すると直ちに粒状の被験物質の析出が認められ、培養終了時まで残存した。

培養終了後、培養液を取り除き、生理食塩液で細胞表面を 2 回洗浄し、10 vol% ホルマリン水溶液を加えて約 10 分間固定した。固定後、水洗し、0.1 w/v% クリストルバイオレット水溶液で約 10 分間染色した。水洗後、室温で一晩自然乾燥した。

3) 細胞増殖率の測定

上述の 8-2) で固定・染色した細胞は、染色の濃淡から細胞密度を単層培養細胞密度計（モノセレーターⅡ、MI-60、オリンパス光学工業株式会社）を用いて測定し、陰性対照群の細胞増殖率を 100% とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

その結果は下表に示したとおり、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在および存在下ともに 750 μ g/mL 以上の用量で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制用量は 375~750 μ g/mL 用量域にあるものと判断された。連続処理法の場合は、24 時間処理では 375 μ g/mL 以上で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制用量は 187.5~375 μ g/mL 用量域にあるものと判断され、48 時間処理では 375 μ g/mL 以上で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められ、187.5 μ g/mL で 50%細胞増殖抑制を示した。

〔短時間処理法〕

用 量 (μ g/mL)	細胞増殖率 (%)					
	S9 mix 非存在下			S9 mix 存在下		
0 (溶媒)	100	100	[100.0]	100	100	[100.0]
46.88	96	100	[92.0]	105	95	[100.0]
93.75	87	91	[89.0]	103	93	[98.0]
187.5	87	91	[89.0]	101	92	[95.5]
375	57	58	[57.5]	69	60	[64.5]
750	15	12	[13.5]	11	12	[11.5]
1500	15	12	[13.5]	13	11	[12.0]
3000	21	13	[17.0]	17	16	[16.5]

[] : 平均値

〔連続処理法〕

用 量 (μ g/mL)	細胞増殖率 (%)					
	24 時間処理			48 時間処理		
0 (溶媒)	100	100	[100.0]	100	100	[100.0]
46.88	95	97	[96.0]	95	95	[95.0]
93.75	88	81	[84.5]	83	80	[81.5]
187.5	68	62	[65.0]	49	51	[50.0]
375	14	11	[12.5]	13	10	[11.5]
750	17	12	[14.5]	14	14	[14.0]
1500	12	10	[11.0]	11	13	[12.0]
3000	13	9	[11.0]	10	11	[10.5]

[] : 平均値

9. 染色体異常試験

1) 被験物質および陽性対照物質の用量

細胞増殖抑制試験の結果から、被験物質の用量は50%細胞増殖抑制用量の前後が含まれ、かつ、3用量以上のデータが得られることを考慮し、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在および存在下ともに800 μ g/mLを最高用量とし、以下公比2で400、200および100 μ g/mLの4用量および細胞増殖抑制試験で375~750 μ g/mL間で細胞増殖率の急激な変化が認められたことから、400 μ g/mLと800 μ g/mLの中間量の600 μ g/mLを加えた計5用量を、また、連続処理法24時間では、最高用量を400 μ g/mLとし、以下公比2で200、100および50 μ g/mLの4用量および細胞増殖抑制試験で187.5~375 μ g/mL間で細胞増殖率の急激な変化が認められたことから、200 μ g/mLと400 μ g/mLの中間量の300 μ g/mLを加えたの計5用量を設定した。陽性対照物質のMNNGは2.5 μ g/mL、B[a]Pは10 μ g/mLの用量を用いた。

2) 被験物質および陽性対照物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質を DMSO に溶解して最高用量の供試液（原液）を調製した。次いで、原液の一部を DMSO で順次希釈し、所定用量の供試液を調製した。陽性対照物質の MNNG は 0.5 mg/mL、B[a]P は 2.0 mg/mL の供試液を調製した。

3) 細胞の処理

4×10³ 個/mL の細胞を含む培養液 5 mL を直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ (Becton Dickinson 社) に加え、3 日間培養後、下記の方法で処理した。培養には 1 用量当たり 4 枚のシャーレを用い、そのうち 2 枚は染色体標本作製用に、残りの 2 枚は細胞増殖率測定用に使用した。但し、陽性対照群については細胞増殖率の測定は行わず、用いるシャーレは染色体標本作製用の 2 枚とした。

短時間処理法の S9 mix 非存在下の場合は、各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除き、DMSO、被験物質供試液および MNNG の供試液を各シャーレに 0.015 mL ずつ添加して培養した。また、S9 mix 存在下の場合は、各シャーレとも 2.5 mL を残して培養液を取り除いた後、S9 mix 0.5 mL を加え、続いて DMSO、被験物質供試液および B[a]P の供試液を各シャーレに 0.015 mL ずつ添加して培養した。S9 mix 非存在および存在下のいずれの場合も、培養 6 時間後に培養液を取り除き、新しい培養液 5 mL を加え、さらに 18 時間培養した。

連続処理法の場合は、DMSO、被験物質供試液および MNNG の供試液を各シャーレに 0.025 mL ずつ加え、24 時間培養した。

4) 試験群の構成および使用シャーレ数

[短時間処理法：S9 mix 非存在下]

用量(μ g/mL)		使用シャーレ数	
		S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
0	(陰性対照) ^a	4	4
100		4	4
200		4	4
400		4	4
600		4	4
800		4	4
2.5	(陽性対照) ^b	2	--
10	(陽性対照) ^c	--	2

a : DMSO、b : MNNG、c : B[a]P、使用シャーレ数 : 52

[連続処理法]

用量(μ g/mL)		使用シャーレ数
		24 時間処理
0	(陰性対照) ^a	4
50		4
100		4
200		4
300		4
400		4
2.5	(陽性対照) ^b	2

a : DMSO、b : MNNG、使用シャーレ数 : 26

5) 染色体標本の作製および細胞増殖率の測定

標本作製の2時間前に、培養中の各シャーレにコルセミド(Gibco Laboratories、ロット番号 1335046)を最終濃度として0.2 μ g/mLとなるように添加した。培養終了後、培養液を取り除き、0.2 w/v%トリプシン水溶液2 mLで処理して細胞をシャーレから剥離し、新鮮培養液5 mLを入れた遠沈管に移し、1000 rpm、5分間遠心分離した。上清を捨て、細胞沈渣に低張液の75 mM塩化カリウム水溶液4 mLを加えて懸濁し、37°Cで15分間低張処理した。低張処理後、用時調製した冷却メタノール・酢酸(3:1)混合液(v/v)1 mLを添加して固定した。1000 rpmで5分間遠心分離し、上清を捨て、細胞沈渣を新しい固定液4 mLで懸濁・固定した。この操作を3回繰り返した後、少量の固定液で適切な密度に細胞を懸濁し、スライドガラスの2ヶ所に1滴ずつ滴下し、室温で一晩自然乾燥した。乾燥後、S ϕ rensen 緩衝液(pH6.8、株式会社ヤトロン、ロット番号 1478)を用いて希釈した1.4 vol%ギムザ液で約15分間染色した。水洗後、室温で乾燥して

染色体標本とした。標本は、1シャーレ当たり3枚作製した。

細胞増殖率の測定は、培養終了後、培養液を取り除き、生理食塩液で細胞表面を2回洗浄し、10 vol%ホルマリン水溶液を加えて約10分間固定した。固定後水洗し、0.1 w/v%クリスタルバイオレット水溶液で約10分間染色し、水洗後乾燥した。単層培養細胞密度計（モノセレーターII、MI-60、オリンパス光学工業株式会社）を用いて陰性（溶媒）対照群の細胞増殖率を100%とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

6) 染色体の観察

染色体の観察は60倍のノーカバー対物レンズを用いて総合倍率600倍で鏡検した。観察は標本をすべてコード化し、盲検法で行った。各用量とも、染色体が明瞭に識別でき、染色体の数が 25 ± 2 本の分裂中期像について、1シャーレ当たり100個、すなわち、1用量当たり2枚のシャーレの合計200個について観察した。

7) 染色体異常の分類および集計³⁾

染色体異常の分類は、構造異常については、染色分体型の切断と交換、染色体型の切断と交換（二動原体、環状染色体など）およびその他（断片化など）とした。数的異常については、倍数性細胞（倍数体）のみを記録した。

ギャップ（染色分体型および染色体型）については、異常として記録したが、構造異常には含めなかった。ギャップは、染色分体幅よりも狭い非染色性部位とした。

染色体異常の集計については、上述に分類した異常を一つでも有する細胞は異常細胞として記録し、異常の種類別の集計を行った。構造異常および数的異常の総数は、観察した細胞200個中に認められた異常細胞数を表示した。

8) 試験結果の判定

試験結果の判定に当たり、構造異常および倍数性細胞の出現頻度は、多試料 χ^2 検定を行って、有意差（有意水準5%以下）が認められた場合は、Fisherの直接確率法を用いて陰性対照群と各用量群との間の有意差検定（有意水準は多重性を考慮して、5%または1%を処理群の数で割ったものを用いた。）を行った。その結果、陰性対照群と比較して、被験物質群における染色体異常細胞の出現頻度が2用量以上で有意に増加し、さらに用量依存性が認められた場合、染色体異

常誘発性は陽性と判定した。なお、単一用量のみで陽性値を示した場合には、それに近い用量を用いて再実験を行い、その結果、再現性が認められる場合には、染色体異常誘発性は陽性と判定した。

結 果

1. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下）

結果は表 1-1 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.0%と低値であった。被験物質群では 100、200 および 400 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 1.5、3.5 および 40.0%の出現頻度で認められ、400 $\mu\text{g/mL}$ で有意な増加が認められた。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 96.5%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

数的異常を示す倍数体は、陰性対照群および陽性対照群では認められなかった。被験物質群では、200 $\mu\text{g/mL}$ でのみ 0.5%の低い出現頻度で認められた。

なお、600 および 800 $\mu\text{g/mL}$ では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

2. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）

結果は表 1-2 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 0.5%と低値であった。100、200 および 400 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 0.5、0.5 および 12.5%の出現頻度で認められ、400 $\mu\text{g/mL}$ で有意な増加が認められた。陽性対照群の B[a]P による染色体構造異常細胞の出現頻度は 82.0%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群では 1.0%の低い出現頻度で認められた。被験物質群では、0 または 0.5%の出現頻度で認められた。陽性対照群では認められなかった。

なお、600 および 800 $\mu\text{g/mL}$ では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

3. 染色体異常試験（連続処理法：24 時間処理）

結果は表 2 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 2.0%と低値であった。被験物質群では 0~2.0%の出現頻度であり、陰性対照群

との間に有意差は認められなかった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 94.5% であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群、被験物質群および陽性対照群のいずれにも認められなかった。

なお、300 および 400 $\mu\text{g/mL}$ では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

4. 染色体異常試験：確認試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下）

400 $\mu\text{g/mL}$ でのみ染色体構造異常細胞の有意な増加が認められたことから、結果の再現性を確認するため、300、400 および 500 $\mu\text{g/mL}$ 用量を設定し、確認試験を行った。その結果は表 3-1 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.5% と低値であった。被験物質群では 300 および 400 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 16.0 および 46.0% の出現頻度で認められ、300 および 400 $\mu\text{g/mL}$ で有意な増加が認められた。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 89.0% であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群では 0.5% の低い出現頻度で認められた。被験物質群では、400 $\mu\text{g/mL}$ でのみ 0.5% の出現頻度で認められた。陽性対照群では認められなかった。

なお、500 $\mu\text{g/mL}$ では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

5. 染色体異常試験：確認試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）

400 $\mu\text{g/mL}$ でのみ染色体構造異常細胞の有意な増加が認められたことから、結果の再現性を確認するため、300、400 および 500 $\mu\text{g/mL}$ 用量を設定し、確認試験を行った。その結果は表 3-2 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 0.5% と低値であった。被験物質群では 300 および 400 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 2.0 および 19.0% の出現頻度で認められ、400 $\mu\text{g/mL}$ で有意な増加が認められた。陽性対照群の B[a]P による染色体構造異常細胞の出現頻度は 72.0% であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群では認められなかった。被験物質群および陽性対

照群では、いずれも 0.5%の低い出現頻度で認められた。

なお、500 μ g/mL では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

6. D₂₀ 値⁴⁾

短時間処理法において、陽性値を示す染色体構造異常細胞の増加が認められたため、D₂₀ 値〔分裂中期像の 20%に異常を誘発させるために必要な被験物質の推定用量 (mg/mL)〕を算出した。

その結果は下表に示すとおりであり、S9 mix 非存在および存在下の構造異常に関する D₂₀ 値は、それぞれ S 値が小さい 0.23 および 0.71 mg/mL を採用した。なお、確認試験については、被験物質群で 3 用量以上のデータが得られなかったため、D₂₀ 値は採用対象外とした。

短時間処理法	回帰曲線	D ₂₀ 値 (μ g/mL)	S 値 $\left[S = \frac{D_{20}}{r} \times \frac{1}{n^2} \right]$
S9 mix 非存在下	$y = 0.100571x - 6.10001$ ($r = 0.902534$)	259.517	17.9714
	$y = 39.5311x - 73.5122$ ($r = 0.807268$)	<u>232.024</u>	<u>17.9637</u>
S9 mix 存在下	$y = 0.0308572x - 1.9$ ($r = 0.87831$)	<u>709.722</u>	<u>50.5034</u>
	$y = 11.959x - 22.218$ ($r = 0.774597$)	3390.22	273.547

S 値：対象となった D₂₀ 値のうち、相関係数 r が大きく、陰性対照群を含む群数 n が多いものほどより妥当性が高いとする考えに基づく指標。

結 論

ビスフェノール A-EO 付加物 (平均付加モル数 5 モル) について染色体異常誘発性の有無を調べるため、CHL/IU 細胞を用いた *In vitro* における染色体異常試験を実施した。その結果、短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下において染色体構造異常細胞の増加が認められた。

したがって、本実験条件下では、ビスフェノール A-EO 付加物 (平均付加モル数 5 モル) の CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。本被験物質の染色体の構造異常誘発に関する D₂₀ 値は、S9 mix 非存在下で 0.23 mg/mL、S9 mix 存在

下で 0.71 mg/mL であった。本試験結果は、CHL/TU 細胞において染色体異常を有する細胞の出現頻度が 10%以上を陽性とする生物学的判断基準⁵⁾からみても陽性と判断されるものであった。

ビスフェノール A の変異原性については、*S. typhimurium* TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535 または *E. coli* WP2uvrA を用いた復帰突然変異試験^{6,7,8)}で陰性との報告がある。また、CHO 細胞を用いた染色体異常試験で陽性⁹⁾ および陰性¹⁰⁾、V-79 細胞を用いた細胞遺伝子突然変異試験で陰性⁶⁾との報告がある。

参考文献

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S. (1977). Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro*, a screening for chemical carcinogens. *Mutation Research*, 48, 337-354.
- 2) Matsuoka, A. Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). "Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutation Research*, 66, 277-290.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修、“化審法毒性試験法の解説改訂版”、化学工業日報社、東京、1992、pp. 51-52.
- 3) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編、“化学物質による染色体異常アトラス”、朝倉書店、東京、1988、pp. 16-37.
- 5) 石館 基 監修、“改定増補 染色体異常試験データ集”、エル・アイ・シー、東京、1987、p. 19.
- 6) Schweickl, H, et., al. The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *salmonella typhimurium* and V79 cells. *Mutation Research*, 415(1-2):119-130, 1998.
- 7) Japan chemical industry ecology- toxicology and information center, Japan; Mutagenicity test data of existing chemical substances based on the toxicity investigation of the industrial safety and health law, 1996.
- 8) Masuda, et., al. Changes in the mutagenic and estrogenic activities of bisphenol A upon treatment with nitrite. *Mutation Research*, 585(1-2):137-1146, 2005.
- 9) Hilliard, CA, et., al. Chromosome aberration *in vitro* related to cytotoxicity of

表 1-1 ビスフェノールA-EO(平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix非存在下)

検体の用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常の細胞数(%)							ギャップの細胞 出現数 (%)	細胞 増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数(%)			
	観察 細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数			観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0
0	100	0	2	0	0	0	2	1	100.0	100	0	0	0
	200	0	2	0	0	0	2	1		200	0	0	0
		(0)	(1.0)	(0)	(0)	(0)	(1.0)	(0.5)		(0)	(0)	(0)	(0)
100	100	2	0	0	0	0	2	0	99.0	100	0	0	0
	100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	200	2	1	0	0	0	3	0		200	0	0	0
		(1.0)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(1.5)	(0)		(0)	(0)	(0)	
200	100	2	3	0	0	0	5	0	92.0	100	0	0	0
	100	1	1	0	0	0	2	0		100	1	0	1
	200	3	4	0	0	0	7	0		200	1	0	1
		(1.5)	(2.0)	(0)	(0)	(0)	(3.5)	(0)		(0.5)	(0)	(0.5)	
400	100	26	29	1	0	0	35	0	58.0	100	0	0	0
	100	19	41	0	0	0	45	1		100	0	0	0
	200	45	70	1	0	0	80	1		200	0	0	0
		(22.5)	(35)	(0.5)	(0)	(0)	(40.0)**	(0.5)		(0)	(0)	(0)	
600 #	--	--	--	--	--	--	--	--	37.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)			(--)	(--)	(--)
800 #	--	--	--	--	--	--	--	--	25.0	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)			(--)	(--)	(--)
陽性対照	100	47	95	0	0	0	97	0	--	100	0	0	0
2.5	100	42	90	2	0	0	96	0	--	100	0	0	0
	200	89	185	2	0	0	193	0	--	200	0	0	0
		(44.5)	(92.5)	(1.0)	(0)	(0)	(96.5)**	(0)		(0)	(0)	(0)	

陰性対照:ジメチルスルホキシド。

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**: $p < 0.01$.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 1-2 ビスフェノールA-EO(平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix存在下)

検体 の用量 (μ g/mL)	染色体構造異常の細胞数(%)							ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
	観察 細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
0	100	0	0	0	1	0	1	0	100.0	100	1	0	1
	200	0	0	0	1	0	1	0		200	2	0	2
		(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)	(0.5)	(0)		(1.0)	(0)	(1.0)	
100	100	0	0	0	1	0	1	0	92.0	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	0	0	0	1	0	1	0		200	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)	(0.5)	(0)		(0)	(0)	(0)	
200	100	0	1	0	0	0	1	0	89.0	100	1	0	1
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	0	1	0	0	0	1	0		200	1	0	1
		(0)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)		(0.5)	(0)	(0.5)	
400	100	3	12	0	0	0	12	0	74.0	100	0	0	0
	100	6	12	0	0	0	13	0		100	1	0	1
	200	9	24	0	0	0	25	0		200	1	0	1
		(4.5)	(12.0)	(0)	(0)	(0)	(12.5)**	(0)		(0.5)	(0)	(0.5)	
600 #	--	--	--	--	--	--	--	--	18.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)			(--)	(--)	(--)
800 #	--	--	--	--	--	--	--	--	13.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)			(--)	(--)	(--)
陽性対照	100	29	79	0	1	0	80	0		100	0	0	0
10	100	15	83	1	0	0	84	0	--	100	0	0	0
	200	44	162	1	1	0	164	0		200	0	0	0
		(22.0)	(81.0)	(0.5)	(0.5)	(0)	(82.0)**	(0)		(0)	(0)	(0)	

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene.

**: $p < 0.01$.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 2 ビスフェノールA-EO(平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(連続処理法:24時間処理)

検体の用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常の細胞数(%)							ギャップの細胞 出現数 (%)	細胞 増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数(%)				
	観察 細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数			観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数	
		切断	交換	切断	交換									
陰性対照	100	1	1	0	0	0	2	0		100	0	0	0	
0	100	1	2	0	0	0	2	0	100.0	100	0	0	0	
	200	2	3	0	0	0	4	0		200	0	0	0	
		(1.0)	(1.5)	(0)	(0)	(0)	(2.0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
50	100	0	2	0	0	0	2	0	92.0	100	0	0	0	
	100	1	1	0	1	0	2	0		100	0	0	0	
	200	1	3	0	1	0	4	0		200	0	0	0	
		(0.5)	(1.5)	(0)	(0.5)	(0)	(2.0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	
100	100	0	0	0	0	0	0	0	80.5	100	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0	
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0	
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	
200	100	0	0	0	0	0	0	0	68.5	100	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0	
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0	
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	
300 #	--	--	--	--	--	--	--	--	42.0	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)
400 #	--	--	--	--	--	--	--	--	20.0	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)
陽性対照	100	37	91	1	0	0	94	0		100	0	0	0	
2.5	100	40	91	1	0	0	95	0		100	0	0	0	
	200	77	182	2	0	0	189	0		200	0	0	0	
		(38.5)	(91.0)	(1.0)	(0)	(0)	(94.5)**	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**: $p < 0.01$.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 3-1 ビスフェノールA-EO(平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix非存在下)-確認試験

検体の用量 (μ g/mL)	染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞 出現数 (%)	細胞 増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数(%)				
	観察 細胞数	染色分体		染色体		その他			総異常 細胞数	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	2	1	0	1	0	3	0		100	0	0	0
0	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	1	0	1
	200	2	1	0	1	0	3	0		200	1	0	1
		(1.0)	(0.5)	(0)	(0.5)	(0)	(1.5)	(0)			(0.5)	(0)	(0.5)
300	100	5	7	0	0	0	12	0	90.0	100	0	0	0
	100	12	13	0	0	0	20	0		100	0	0	0
	200	17	20	0	0	0	32	0		200	0	0	0
		(8.5)	(10.0)	(0)	(0)	(0)	(16.0)**	(0)			(0)	(0)	(0)
400	100	47	50	3	0	0	58	0	54.5	100	1	0	1
	100	19	29	0	0	0	34	0		100	0	0	0
	200	66	79	3	0	0	92	0		200	1	0	1
		(33.0)	(39.5)	(1.5)	(0)	(0)	(46.0)**	(0)			(0.5)	(0)	(0.5)
500 #	--	--	--	--	--	--	--	--	29.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)			(--)	(--)	(--)
陽性対照	100	51	87	3	0	0	91	0		100	0	0	0
2.5	100	45	79	1	0	0	87	0	--	100	0	0	0
	200	96	166	4	0	0	178	0		200	0	0	0
		(48.0)	(83.0)	(2.0)	(0)	(0)	(89.0)**	(0)			(0)	(0)	(0)

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**: $p < 0.01$.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 3-2 ビスフェノールA-EO(平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix存在下)-確認試験

検体の用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常の細胞数(%)							ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)				
	観察細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常細胞数	出現数(%)	増殖率(%)	観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数	
		切断	交換	切断	交換									
陰性対照	100	0	0	0	1	0	1	0		100	0	0	0	
0	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0	
	200	0	0	0	1	0	1	0		200	0	0	0	
		(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)	(0.5)	(0)			(0)	(0)	(0)	
300	100	1	0	0	0	0	1	0	94.5	100	0	0	0	
	100	1	3	0	0	0	3	0		100	0	1	1	
	200	2	3	0	0	0	4	0		200	0	1	1	
		(1.0)	(1.5)	(0)	(0)	(0)	(2.0)	(0)		(0)	(0.5)	(0.5)		
400	100	8	10	0	1	0	12	0	54.5	100	0	0	0	
	100	15	24	3	0	0	26	0		100	0	1	1	
	200	23	34	3	1	0	38	0		200	0	1	1	
		(11.5)	(17.0)	(1.5)	(0.5)	(0)	(19.0)**	(0)		(0)	(0.5)	(0.5)		
500 #	--	--	--	--	--	--	--	--	21.0	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)		(--)	(--)	(--)		
陽性対照	100	15	66	0	0	0	69	0		100	1	0	1	
10	100	11	75	2	0	0	75	0		100	0	0	0	
	200	26	141	2	0	0	144	0		200	1	0	1	
		(13.0)	(70.5)	(1.0)	(0)	(0)	(72.0)**	(0)		(0.5)	(0)	(0.5)		

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene.

**: $p < 0.01$.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

要 約

ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の 0（被験物質の媒体である局方オリブ油のみ投与）、30、120、500 および 1000 mg/kg/day を、1 群雌雄各 12 匹の SD シェラットに、交配開始 2 週間前から、雄は 42 日間、雌は分娩後哺育 4 日まで経口投与し、その反復投与毒性および生殖発生毒性を調べた。また、雄については対照群および 1000 mg/kg 群の各 12 匹からそれぞれ 5 匹を選別し、雌についてはサテライト群として別に 1 群 5 匹の対照群および 1000 mg/kg 群を設け、投与終了後 14 日間観察を継続し、毒性の回復性についても検討した。

1. 反復投与毒性

1000 mg/kg 群で雄に投与期間中の体重増加量の低値が認められた。血液学検査では、1000 mg/kg 群で雌に赤血球数、血色素量およびヘマトクリット値の低値並びに網状赤血球数の高値が認められた。血液生化学検査では、500 mg/kg 群の雄に総コレステロール濃度およびカルシウム濃度、1000 mg/kg 群の雌雄に総コレステロール濃度、雌に ALT 活性およびカルシウム濃度のいずれも高値が認められた。器官重量では、500 mg/kg 群の雌雄に肝臓相対重量、雌に肝臓絶対重量、雄に腎臓の絶対重量および相対重量、1000 mg/kg 群の雌雄に肝臓相対重量、雌に肝臓絶対重量、雄に腎臓相対重量のいずれも高値が認められた。病理組織学検査では、500 および 1000mg/kg 群の雌雄に肝臓の小葉中心性肝細胞肥大、雄に腎臓の近位尿細管の好塩基化が認められた。一般状態、詳細な臨床観察、感覚反射機能検査、握力、自発運動量、摂餌量および尿検査において、被験物質の投与による影響は認められなかった。

回復群においては、雄雌とも各検査指標に投与による影響は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

親動物の性周期（雌）、交尾成立期間、交尾率、受胎率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率、分娩率、分娩および哺育状態に変化は認められなかった。児動物に対しても、総出産児数、新生児数、性比、出生率、体重、形態および哺育 4 日生存率に、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。

以上の結果から、ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の親動物への反復投与における無影響量（NOEL）および無毒性量（NOAEL）は、雌雄とも 500 mg/kg 以上の群で肝臓に対する影響が認められたことから、いずれも 120 mg/kg/day と推定した。また、生殖発生毒性に関する NOEL および NOAEL は、最高用量群においても影響が認められなかったことから、いずれも 1000 mg/kg/day と推定した。

目 的

ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）をラットに反復経口投与し、本物質の反復投与毒性および生殖発生毒性を検討した。

材料および方法

1. 被験物質

被験物質であるビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）（CAS No. 32492-61-8）は、水に不溶な無色透明液体で、試験には、三洋化成工業株式会社（京都府京都市東山区一橋野本町 11-1）から提供されたロット番号 L3-6S004-A（純度 99%以上）のものを冷暗所（2～6℃）、密栓下で保管し、使用した。用いた被験物質は投与終了後に分析し、使用期間中安定であったことを確認した（Appendix 1）。本物質の特性は、Appendix 1 に示す。

ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）は水のほか油にも溶けにくいですが、食物油には懸濁可能であったことから、投与液はオリーブ油（局方、ロット番号 BH17、宮澤薬品株式会社）を媒体とし、所定の投与用量となる濃度の懸濁液に調製した。調製した投与液は、1 日の使用量ごとに小分けし、使用時まで冷所（2～6℃）遮光下で密栓して保管した。投与液中の被験物質は、冷所遮光下で少なくとも 7 日間は安定であることが確認された（Appendix 2）ので、調製後 7 日以内に使用した。初回に調製された投与液について分析し、所定の濃度で調製されていることを確認した（Appendix 3）。

2. 動物および飼育条件

動物は、SD 系 [CrI : CD(SD)] ラットを用いた。ラットは、日本チャールス・リバー株式会社 厚木飼育センター（神奈川県厚木市下古沢 795）から 8 週齢のものを搬入（雄 68 匹、雌 80 匹）し、12 日間試験環境に馴化させた。馴化期間中に検疫および雌については 10 日間の性周期観察も併せて行い、発育および一般健康状態が良好で、雌では性周期に異常の認められなかったものについて、投与開始前日に体重を測定し、体重分布の中央値に近い雄は 60 匹、雌は 70 匹を選び、10 週齢で試験に用いた。1 群の動物数は雌雄各 12 匹とし、雌についてはさらに対照群と最高用量群の回復群として各 5 匹からなる 2 群のサテライト群を設け、無作為抽出法により群分けを行った。なお、雌の回

回復群については交配を行わなかった。雄の回復群については、投与 42 日に対照群と最高用量群の中から無作為抽出法によりそれぞれ 5 匹を選別し、回復群とした。投与開始時の平均体重(体重範囲)は、雄 361(334~396)g、雌 235(216~260)g であった。ラットは、温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数 10 回以上/時(オールフレッシュエアー方式)、照明 12 時間/日(午前 7 時点灯、午後 7 時消灯)に設定したバリアシステム動物室(第 1 室)で、個体別にステンレス製金網ケージ [260W×380D×180 H(mm)] に収容し、これをステンレス製 5 段のラックに配置して飼育した。ただし、交尾の成立した雌は、巣作り材料(ホワイトフレック、日本チャールス・リバー株式会社)を入れたポリカーボネート製ケージ [265W×426D×200H(mm)] に収容し、分娩後は児動物と同居させた。飼料(固型飼料ラボ MR ストック、日本農産工業株式会社、ロット番号 20070470、20070678)および飲料水(孔径 $1\mu\text{m}$ のカートリッジフィルターで濾過後紫外線照射した殺菌水道水)は、それぞれ給餌器および自動給水装置または給水瓶(ポリカーボネートケージの場合)により、自由に摂取させた。

動物の個体識別は、ラックおよびケージへの標識札の貼付、並びに耳パンチ法により行った。

飼育期間中、動物室の温度は $22.1 \sim 25.0^{\circ}\text{C}$ 、湿度は 46~60% の範囲で推移(Appendix 4)し、また飼料、巣作り材料(床敷)および飲料水の汚染物質の分析結果(Appendices 5、6、7)は、いずれも当研究所で設定した許容範囲内にあることが確認された。したがって、動物の飼育期間を通じて、試験成績の信頼性に影響を及ぼすと思われる環境要因の変化はなかったものと判断した。

本試験は、動物実験を科学的観点および倫理的な配慮の下に実施するために遵守すべき事項等を定めた、「財団法人 畜産生物科学安全研究所の動物実験実施規定」に従い、本施設の動物実験委員会の承認を得て行った。

3. 投与量の設定、試験群の構成および投与方法

本物質の 500、1000 および 2000 mg/kg を雌雄各 1 匹のラットに 3 日間反復経口投与した結果、2000 mg/kg 投与の雄、500 mg/kg 以上投与の雌で体重増加抑制、さらに、2000 mg/kg 投与の雌雄で軽度な自発運動低下が認められた。そこで、1 群雌雄各 4 匹のラットに、本被験物質を 0 (局方オリブ油のみ投与)、50、100、200、500 および 1000

mg/kg/day で 14 日間反復経口投与し、一般状態の観察、体重および摂餌量の測定、血液学および血液生化学検査、剖検並びに器官重量の測定を行った。その結果、500 mg/kg 以上の群で投与直後の流涎、尿ケトン体の低値傾向、血清総コレステロールおよび肝臓重量の高値傾向、さらに、1000 mg/kg 群で血液プロトロンビン時間の低値傾向およびカルシウムの高値傾向が認められた。

したがって、本試験における投与量については、1000 mg/kg/day を最高用量とし、以下、500、120 および 30 mg/kg/day の計 4 用量を設定した。

試験群の構成は、①溶媒投与群(以下、対照群)、②被験物質の 30 mg/kg/day 投与群(30 mg/kg 群)、③同 120 mg/kg/day 投与群(120 mg/kg 群)、④同 500 mg/kg/day 投与群(500 mg/kg 群)、⑤同 1000 mg/kg/day 投与群(1000 mg/kg 群)の 5 群とした。

投与方法は、投与液量を体重 1kg 当たり 5 mL とし、テフロン製胃ゾンデを装着した注射筒を用いて、投与液を胃内に投与した。対照群には、媒体として用いた局方オリブ油を同様に投与した。各個体の投与液量は、至近日の測定体重を基に算出した。投与期間は、雌雄とも交配開始 14 日前から、雄は 42 日間、雌は交配および妊娠期間を経て分娩後の哺育 4 日まで、最短 42 日～最長 47 日間、1 日 1 回、午前中(9:00~12:35)に投与した。ただし、雌の回復群は、雄と同様に 42 日間投与した。

4. 観察および検査

1) 親動物に関する項目

親動物について、次の項目を観察あるいは検査した。なお、感覚反射機能検査、握力、自発運動量、尿検査、血液学検査、血液生化学検査、器官重量および病理組織学検査については、各群から無作為抽出法により雌雄各 5 匹を選び、検査の対象とした。

(1) 一般状態観察

投与期間中毎日、投与直後から投与後 1 時間に、動物の生死、外観、行動等について観察した。さらに、朝夕 2 回は、動物の生死や瀕死状態の有無について確認した。また、妊娠、出産、哺育の状態については、注意深く観察した。

(2) 詳細な臨床観察

投与開始前日およびその後は週 1 回、ケージサイドでの観察に加えて、動物をケージから取り出す時およびケージ外のアルミ製オープンフィールド

の性比については χ^2 検定を用いた。

結 果

1. 反復投与毒性

1) 一般状態および死亡 (Tables 1~4, Appendices 10~13)

投与期間において、500 mg/kg 群で投与 8 日以降、1000 mg/kg 群で投与 3 日以降、また、雌のサテライト群で投与 6 日以降、いずれも全例に流涎が認められた。この流涎は、投与直後に口周囲を軽度に濡らす程度の一過性のものであった。回復期間においては、いずれの群にも一般状態の変化は認められなかった。また、投与期間および回復期間を通じて、いずれの投与群にも死亡は認められなかった。

2) 詳細な臨床観察 (Tables 5, 6, Appendices 14, 15)

投与期間中および回復期間中とも、各観察項目に有意な変化は認められなかった。

3) 感覚反射機能検査 (Tables 7, 8, Appendices 16, 17)

投与期間中および回復期間中の検査において、各検査項目に変化は認められなかった。

4) 握力および自発運動量 (Tables 9, 10, Appendices 18, 19)

投与期間中の検査において、被験物質投与各群とも握力および自発運動量に有意な変化は認められなかった。回復期間中の検査においては、雌のサテライト群に後肢の握力および測定開始後 30 分間の自発運動量に有意な低値が認められた。

5) 体重 (Tables 11, 12, Appendices 20, 21)

投与期間中において、1000 mg/kg 群で雄に体重増加量の有意な低値が認められた。各測定時点での体重に有意差は認められなかった。雌では、被験物質投与各群とも交配前、妊娠期間および哺育期間を通じて体重および体重増加量に有意な変化は認められなかった。回復期間においては、1000 mg/kg 群の雄に体重増加量の有意な高値が認められ、回復傾向が確認された。また、体重増加量の有意な高値は雌のサテライト群にも認められた。

6) 摂餌量 (Tables 13, 14, Appendices 22, 23)

投与期間中および回復期間中、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。

500 mg/kg 群の雄の投与 35 日の摂餌量に有意な低値、同群の雌の哺育 0 日の摂餌量および雌のサテライト群の投与 28 日の摂餌量に有意な高値が認められたが、これらはいずれも摂餌量の前後の推移からみて投与との関連性は認められず、被験物質の投与とは無関係な偶発的変化と判断した。

7) 雄の尿検査 (Table 15, Appendix 24)

投与期間中および回復期間中の検査において、各検査項目に有意な変化は認められなかった。

8) 血液学検査 (Tables 16, 17, Appendices 25, 26, 背景データ : Appendices 42, 43)

投与期間終了時屠殺動物において、1000 mg/kg 群で雌に赤血球数、血色素量およびヘマトクリット値の有意な低値並びに網状赤血球数の有意な高値が認められた。

回復期間終了時屠殺動物においては、1000 mg/kg 群で雄に血小板数の有意な低値、雌に活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な延長が認められた。投与期間終了時屠殺動物において認められた変化は認められなかった。

9) 血液生化学検査 (Tables 18, 19, Appendices 27, 28, 背景データ : Appendices 42, 43)

投与期間終了時屠殺動物の検査において、500 mg/kg 以上の群の雄および 1000 mg/kg 群の雌に総コレステロール濃度、さらに 1000 mg/kg 群では雌に ALT 活性およびカルシウム濃度のいずれも有意な高値が認められた。カルシウム濃度の有意な高値は 500 mg/kg の雄にも認められた。なお、被験物質投与各群の雄のクレアチニン濃度は対照群と比べて全般的に低値で有意差が認められたが、用量相関性は認められなかった。

回復期間終了時屠殺動物の検査においては、1000 mg/kg 群の雄で ALT の有意な高値および血糖の有意な低値が認められた。

10) 剖検 (Tables 20, 21, Appendices 29~30)

投与期間終了時屠殺動物および回復期間終了時屠殺動物とも、被験物質の投与による変化は認められなかった。投与とは無関係な変化としては、胸腺の赤色域が投与期間終了時屠殺動物の対照群の雌の1匹に、腎臓の腎盂拡張（片側性）が回復期間終了時屠殺動物の対照群の雄の1匹に認められた。

11) 器官重量 (Tables 22, 23, Appendices 32~35)

投与期間終了時屠殺動物では、500mg/kg 以上の群で雄に肝臓および腎臓の相対重量、雌に肝臓の絶対重量および相対重量のいずれも有意な高値が認められた。また、500 mg/kg の雄の腎臓の絶対重量も有意な高値を示した。これらの変化に加えて、雌で120 mg/kg 群の副腎相対重量に有意な低値、500 mg/kg 群の脾臓の絶対重量および相対重量に有意な高値、1000 mg/kg 群の甲状腺相対重量に有意な高値が認められた。

回復期間終了時屠殺動物においては、1000 mg/kg 群で雄に脾臓絶対重量の有意な低値が認められた。投与期間終了時屠殺動物で認められた変化は認められなかった。

12) 病理組織学検査 (Tables 24~26, Appendices 29~31, Photos 1, 2)

被験物質の投与に起因すると考えられる変化が肝臓および腎臓に認められた。

肝臓では、小葉中心性肝細胞肥大が500 mg/kg 群で雄の2匹および雌の3匹、1000 mg/kg 群で雄の3匹および雌の5匹に、また、巣状壊死が1000 mg/kg 群で雄の2匹および雌の3匹に認められた。腎臓では、雄で近位尿細管の好塩基化が対照群で1匹、30 mg/kg 群で2匹、120 mg/kg 群で1匹、500 mg/kg 群で3匹および1000 mg/kg 群で5匹に認められ、500 mg/kg 以上の群では変化の重症化が認められた。これら肝臓および腎臓の変化は、回復群では、1000 mg/kg 群で腎臓の近位尿細管の好塩基化が雄の1匹に認められた以外には、認められなかった。また、雌雄の肝臓および雄の腎臓以外の器官には、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。さらに、精子形成サイクル検査においても、各検査ステージに変化は認められなかった。

その他、心臓の心筋変性・線維化、肺の泡沫細胞集簇、肝臓の微小肉芽腫、小葉周辺性肝細胞脂肪変性、腺胃の胃底腺拡張、腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴、近位尿細

管上皮の好酸性小体、硝子円柱、孤立性嚢胞および皮質リンパ球浸潤、脾臓の髄外造血および褐色色素沈着、前立腺の間質リンパ球浸潤が対照群と 1000 mg/kg 群または対照群あるいは 1000 mg/kg 群にのみ認められたが、これらはいずれもラットにおける自然発生病変として発現する変化¹⁾であり、また、1000 mg/kg 群における発現率や変化の程度に対照群との差は認められないことから、被験物質の投与とは無関係な変化と判断した。また、剖検で被験物質とは無関係に認められた胸腺の赤色域には出血が、腎盂の拡張（左側）した腎臓には水腎症が観察された。

500 および 1000 mg/kg 群で認められた妊娠不成立の各 1 ペアについて、それぞれ雄(動物番号 039 および 053)の下垂体、精巣、精巣上体、前立腺および精囊等並びに雌(動物番号 544 および 558)の下垂体、卵巣および子宮等に変化は認められず、妊娠不成立の原因となるような所見は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

1) 親動物に及ぼす影響

(1) 性周期検査 (Table 27、Appendices 37、38)

被験物質投与各群とも、対照群と比べて平均性周期に有意な変化は認められなかった。一時的に発情前期(I)像や発情後期 I(III)像が認められない、あるいは、発情休止期(V)像が 3 日以上持続するなどの性周期の乱れが生じた個体が、30 mg/kg 群で 2 匹(動物番号 523、529)、120 mg/kg 群で 1 匹(動物番号 541) および 1000 mg/kg 群で 1 匹(動物番号 556) 認められたが、その発現に用量相関性はなく、また、発現率に有意差もなかった。なお、30 mg/kg 群の 1 匹(動物番号 529) および 120 mg/kg 群の 1 匹(動物番号 541) は、性周期検査期間中に 1 性周期のみのデータとなったため、群平均性周期の算出からは除外した。性周期の乱れが生じたそれらの個体は、その後の交配で交尾が確認され、正常な妊娠、分娩および哺育が認められた。

(2) 交尾率および受胎率 (Table 27、Appendix 38)

交尾成立までに要する日数、交尾率および受胎率に有意な変化は認められなかった。いずれの投与群とも交尾不成立は認められず、500 および 1000 mg/kg 群で各 1 例の妊娠不成立が認められた。

(3) 黄体数、着床数および着床率 (Table 27、Appendix 38)

黄体数、着床数および着床率に有意な変化は認められなかった。

(4) 出産率および妊娠期間 (Table 27、Appendix 38)

出産率および妊娠期間に有意な変化は認められなかった。

(5) 分娩および哺育状態 (Table 27、Appendix 38)

分娩および哺育状態に異常は認められなかった。

2) 新生児に及ぼす影響

(1) 生存性および体重 (Table 28、Appendix 39)

一腹当たりの総出産児数、分娩率、哺育 0 日および 4 日の新生児数および体重、出生率、性比並びに哺育 4 日の生存率に有意な変化は認められず、新生児の一般状態にも異常は認められなかった。

(2) 形態 (Table 29、30、Appendices 40、41)

外表検査において、30 mg/kg 群で無尾を呈する児動物が 1 匹 (発現率 0.6%) 認められた。内臓検査では、内臓異常を有する児動物は認められなかった。内臓変異については、左臍動脈遺残を呈する児動物が 120 mg/kg 群で 1 匹 (0.6%) および 500 mg/kg 群で 2 匹 (1.2%) 認められた。これらの異常および変異の発現率はいずれも低く、また、用量相関性のない変化であることから、自然発生的範疇のものと判断した。