

平成 21 年度

内分泌かく乱化学物質
スクリーニング試験

Dibenzoylmethane の卵巣摘出マウスにおける
皮下投与子宮肥大試験

機 関 名 株式会社 化合物安全性研究所

研究責任者名
(契約者)

代表取締役社長



信 頼 性 保 証 書

表題：Dibenzoylmethane の卵巣摘出マウスにおける皮下投与子宮肥大試験

試験番号：SR09134

本試験は、株式会社 化合物安全性研究所 QAUによって、下記のとおり査察された。

査 察 段 階	査 察 日	試 験 責 任 者 への 報 告 日	運 営 管 理 者 への 報 告 日
試験計画書	2010 年 2 月 3 日	2010 年 2 月 3 日	2010 年 2 月 3 日
試験計画書変更書(No. 1)	2010 年 3 月 23 日	2010 年 3 月 23 日	2010 年 3 月 23 日
被験物質の受入・表示・保存	2010 年 2 月 3 日	2010 年 2 月 3 日	2010 年 2 月 3 日
投与液の調製	2010 年 2 月 18 日	2010 年 2 月 18 日	2010 年 2 月 18 日
動物受入・検疫・馴化	2010 年 2 月 10 日	2010 年 2 月 10 日	2010 年 2 月 10 日
群分け	2010 年 2 月 17 日	2010 年 2 月 17 日	2010 年 2 月 17 日
投与	2010 年 2 月 18 日	2010 年 2 月 18 日	2010 年 2 月 18 日
一般状態観察	2010 年 2 月 18 日	2010 年 2 月 18 日	2010 年 2 月 18 日
体重測定	2010 年 2 月 18 日	2010 年 2 月 18 日	2010 年 2 月 18 日
剖検・器官重量測定	2010 年 2 月 25 日	2010 年 2 月 25 日	2010 年 2 月 25 日
病理組織学的検査(標本作製)	2010 年 3 月 26 日	2010 年 3 月 26 日	2010 年 3 月 26 日
病理組織学的検査(鏡検)	2010 年 4 月 1 日	2010 年 4 月 1 日	2010 年 4 月 1 日
生データ	2010 年 4 月 20 日	2010 年 4 月 20 日	2010 年 4 月 20 日
最終報告書(草案)：図表	2010 年 4 月 20 日	2010 年 4 月 20 日	2010 年 4 月 20 日
最終報告書(草案)：本文	2010 年 4 月 20 日	2010 年 4 月 20 日	2010 年 4 月 20 日
最終報告書	2010 年 4 月 28 日	2010 年 4 月 28 日	2010 年 4 月 28 日

1. 本試験は、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」（平成15年11月21日薬食発第1121003号・平成15・11・17製局第3号・環保企発第031121004号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知）、『「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」の一部改正について』（平成20年7月4日薬食発第0704001号・平成20・06・30製局第2号・環保企発第080704001号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知）および経済協力開発機構の「OECD Guideline for the testing of chemicals; Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties (440), Adopted 16 October 2007」および「Protocol for the conduct of the OECD rodent uterotrophic assay ; Second stage of the OECD work of the validation of the rodent uterotrophic assay, Protocol C, Mature ovariectomised rats with sub-cutaneous administration (Contains both multi-chemical and dose-response studies, Draft of 21 April 2000)」に記載されている Protocol C'（ただし被験物質の分析を除く）に従い実施された。

SR09134

2. 本試験は、試験計画書に従って実施され、また、本報告書には当該試験に使用した方法および手順が正確に記載されており、試験成績には当該試験の実施過程において得られた生データが正確に反映していることを確認した。

株式会社 化合物安全性研究所

QAU

2010年 4月 28日

目 次

	頁
表題、試験番号、試験目的、試験実施基準および試験法ガイドライン、動物愛護 -----	1
試験委託者、試験施設、試験責任者、試験従事者およびその業務分担 -----	2
試験期間 -----	3
要約 -----	4
緒言 -----	5
材料および方法 -----	5
成績 -----	13
考察 -----	15
結論 -----	16
参考資料 -----	16
試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因 -----	17
資料の保存 -----	17
試験責任者の記名なつ印 -----	17
Figures and Tables -----	添付

- Figure 1 Body weight of ovariectomized female mice for detection of estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Dibenzoylmethane (SR09134)
- Figure 2 Body weight of ovariectomized female mice for detection of anti-estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Dibenzoylmethane (SR09134)
- Table 1 General appearance of ovariectomized female mice for detection of estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Dibenzoylmethane (SR09134)
- Table 2 General appearance of ovariectomized female mice for detection of anti-estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Dibenzoylmethane (SR09134)
- Table 3 Body weight of ovariectomized female mice for detection of estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Dibenzoylmethane (SR09134)
- Table 4 Body weight of ovariectomized female mice for detection of anti-estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Dibenzoylmethane (SR09134)
- Table 5 Autopsy findings of ovariectomized female mice for detection of estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Dibenzoylmethane (SR09134)
- Table 6 Autopsy findings of ovariectomized female mice for detection of anti-estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Dibenzoylmethane (SR09134)

- Table 7 Absolute and relative organ weights of ovariectomized female mice for detection of estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Dibenzoylmethane (SR09134)
- Table 8 Absolute and relative organ weights of ovariectomized female mice for detection of anti-estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Dibenzoylmethane (SR09134)
- Table 9 Histopathological findings of ovariectomized female mice for detection of anti-estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Dibenzoylmethane (SR09134)

Individual data ----- 添付

Symbols and process for statistical analysis in INDIVIDUAL DATA

- 1-1-1~1-2-5 General appearance
- 2-1-1~2-2-5 Body weight
- 3-1-1~3-2-5 Autopsy findings
- 4-1-1~4-2-5 Absolute and relative organ weights
- 5-1-1~5-1-5 Histopathological findings

Appendix ----- 添付

1 試験成績書

表題：Dibenzoylmethane の卵巣摘出マウスにおける皮下投与子宮肥大試験

試験番号：S R 0 9 1 3 4

試験目的：Dibenzoylmethane を卵巣摘出マウスに 7 日間反復皮下投与し、子宮重量の変化からエストロゲン作用および抗エストロゲン作用の有無を評価した。

試験実施基準および試験法ガイドライン

試験実施基準(GLP)：「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121003 号・平成 15・11・17 製局第 3 号・環保企発第 031121004 号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)および『「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」の一部改正について』(平成 20 年 7 月 4 日 薬食発第 0704001 号・平成 20・06・30 製局第 2 号・環保企発第 080704001 号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)ただし、被験物質の分析を除く。

試験法ガイドライン：経済協力開発機構の「OECD Guideline for the testing of chemicals; Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties (440), Adopted 16 October 2007」および「Protocol for the conduct of the OECD rodent uterotrophic assay; Second stage of the OECD work of the validation of the rodent uterotrophic assay, Protocol C, Mature ovariectomised rats with sub-cutaneous administration (Contains both multi-chemical and dose-response studies, Draft of 21 April 2000)」に記載されている Protocol C'

動物愛護

本試験は、以下の法規および基準等を参考とし、試験施設の標準操作手順書(SOP/APW/001：動物実験倫理規定)に準拠して実施した。

法規および基準等：「動物愛護及び管理に関する法律」(昭和 48 年 10 月 1 日 法律第 105 号、平成 11 年 12 月 22 日 改正 法律第 221 号、平成 17 年 6 月 22 日改正 法律第 68 号)
「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18

年 4 月 28 日 環境省告示第 88 号)

「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する
基本指針」(平成 18 年 6 月 1 日 科発第 0601005 号)

試験委託者

名称 : 国立医薬品食品衛生研究所

所在地 : 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)

試験施設

名称 : 株式会社 化合物安全性研究所

所在地 : 札幌市清田区真栄 363 番 24 (〒004-0839)

運営管理者 :

試験責任者

氏名

所属 : 株式会社 化合物安全性研究所 安全性研究部

試験従事者およびその業務分担

被験物質管理 :

動物管理 :

検疫・馴化 :

投与・観察・測定 :

病理検査 :

試験期間

試験開始日	: 2010 年 2 月 3 日
被験物質受入	: 2009 年 10 月 6 日
動物受入	: 2010 年 2 月 10 日
実験開始日	: 2010 年 2 月 18 日
投与開始	: 2010 年 2 月 18 日
投与終了	: 2010 年 2 月 24 日
剖検(生存例)	: 2010 年 2 月 25 日
実験終了日	: 2010 年 4 月 12 日
試験終了日	: 2010 年 4 月 28 日

要 約

Dibenzoylmethane の 30、100、300 および 1000 mg/kg を 1 群につき 6 匹の卵巢摘出雌性マウスに 7 日間反復皮下投与し、子宮重量の変化からエストロゲン作用の有無について検討した。さらに、Ethinyl Estradiol を併用投与した際の子宮重量の変化から、抗エストロゲン作用の有無についても検討し、以下の成績を得た。

1. 一般状態では、いずれの投与群にも異常所見は認められなかった。
2. 体重推移では、いずれの投与群にも被験物質投与と関連した変化は認められなかった。
3. 剖検では、エストロゲン作用検出群および抗エストロゲン作用検出群のいずれにも 1000 mg/kg 群で肝臓の肥大が認められた。
4. 器官重量では、エストロゲン作用検出群には被験物質投与と関連した変化は認められなかったが、抗エストロゲン作用検出群では 30 mg/kg 以上の群で抗エストロゲン作用が認められた。
5. 病理組織学的所見では、30 および 1000 mg/kg 群で子宮角部の内膜上皮の肥大のグレード低下、筋層の肥大の発現例数の低下、ならびに子宮頸部の扁平上皮の肥厚のグレード低下が認められた。

したがって、本試験条件下では、Dibenzoylmethane のエストロゲン作用は陰性、抗エストロゲン作用は 30 mg/kg 以上で陽性と結論された。

緒 言

Dibenzoylmethane の 30、100、300 および 1000 mg/kg を 1 群につき 6 匹の卵巢摘出雌性マウスに 7 日間反復皮下投与し、子宮重量の変化からエストロゲン作用の有無について検討した。さらに、Ethinyl Estradiol を併用投与した際の子宮重量の変化から、抗エストロゲン作用の有無についても検討した。

材料および方法

1. 被験物質

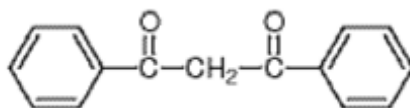
名称 : Dibenzoylmethane ; ジベンゾイルメタン
 別名 ^{1、2)} : 1,1'-(メチレンビスカルボニル)ビスベンゼン
 1,3-ジフェニルプロパン-1,3-ジオン
 1,3-ジフェニル-1,3-プロパンジオン
 ; 1,3-Diphenyl-1,3-propanedione
 α -ベンゾイルアセトフェノン ; α -Benzoylacetophenone
 フェナシルフェニルケトン ; Phenacyl phenyl ketone
 ω -ベンゾイルアセトフェノン ; ω -Benzoylacetophenone
 γ -ヒドロキシカルコン ; γ -Hydroxychalcone

CAS 番号 : 120-46-7

官報公示整理番号 : 化審法 ; (4)-1332

分子式 : $C_{15}H_{12}O_2$ ^{1、2)}

構造式



分子量 : 224.25 ¹⁾、224.259 ²⁾

物理化学的性質 : 外観 ; 固体、結晶、うすい黄色 ¹⁾
 沸点/沸騰範囲 ; 221°C ¹⁾
 融点 ; 78.4°C (Appendix 1)、78°C ¹⁾
 熱メタノール溶状 ; 澄明 (Appendix 1)

ロット番号 :



純度	: 99.9%(GC、Appendix 1)、 99.5%(中和滴定、Appendix 1)
製造者	: 
入手量	: 25 g×2 本 (関連試験と共用)
安定性	: 通常の取扱い条件においては安定 ¹⁾ 。
保存条件	: 容器を密栓した後、冷暗所に保管する ¹⁾ 。 火気や熱源などの着火源から遠ざける ¹⁾ 。
保存場所	: 試験施設の検体保存室 (実測範囲 2～9℃、受入から投与終了日まで)
取り扱い上の注意	: 取扱いは換気のよい場所で行う ¹⁾ 。適切な保護具を着用する ¹⁾ 。粉じんが飛散しないように取扱う ¹⁾ 。取扱い後は手や顔などをよく洗う ¹⁾ 。
毒性情報	: ラット 経口投与 LD: >500 mg/kg ¹⁾
サンプリング	: 適用しなかった。
残余被験物質	: 全ての試験操作が終了後、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

2. 比較対照物質

名称	: Ethynyl Estradiol
CAS 番号	: 57-63-6
分子量	: 296.4
製造業者	: Cayman Chemical Co.
販売業者	: 和光純薬工業株式会社
ロット番号	: 0407671
純度	: 99.3%(HPLC)
保存条件	: 冷凍
保存場所	: 試験施設の検体保存室の冷凍庫 (実測範囲-28～-22℃、受入から投与終了日まで)
使用期限	: 2010 年 11 月 3 日

3. 媒体

名称	: 日本薬局方オリブ油
製造業者	: 株式会社 フデミ製薬所

ロット番号 : 85706
 保存条件 : 室温
 使用期限 : 2012 年 6 月

4. 投与液の調製

(1) 被験物質

調製方法 : 被験物質を精秤し、日本薬局方オリーブ油に所定の濃度になるように懸濁し、スターラーにて均一化した。

調製頻度 : 用時調製。

調製上の注意 : クリーンベンチを使用し、マスク、保護手袋および保護眼鏡等を着用した。

残余投与液の処置 : 焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

(2) 比較対照物質

調製方法 : 比較対照物質を精秤し、99.5%エタノールに溶解後、日本薬局方オリーブ油を加えてメスアップした。エタノールの量は全調製量の5%以内とした。

調製頻度 : 投与開始日までに1回調製した。

投与液の保存条件 : 遮光気密容器に入れ、室温保存した。

投与液の保存場所 : 試験施設の検体保存室

投与液の使用期限 : 2週間
 (実測範囲 23~25℃、調製日から投与終了日まで)

調製上の注意 : クリーンベンチを使用し、マスク、保護手袋および保護眼鏡を着用した。

残余投与液の処置 : 焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

5. 試験方法

(1) 試験系

種・系統 : マウス、C57BL/6JJmsSlc

微生物統御 : SPF

生産業者 : 日本エスエルシー株式会社

微生物モニタリング : 動物生産業者よりデータを入手した。

動物選択理由 : マウスは毒性試験等で通常用いられている動物種であり、すでに実施された試験において使用されていることからこの系統を選定した。

発注動物数 : 卵巣摘出雌 72 匹
 卵巣摘出時週齢 : 6 週齢
 受入時週齢 : 7 週齢
 出荷時体重基準 : 15～20 g
 受入時体重範囲 : 13.3～16.6 g
 投与開始時週齢 : 8 週齢
 群数 : 11 群
 各群動物数 : 6 匹

(2) 検疫および馴化

検疫方法 : 一般状態観察を 1 日 1 回観察し、体重を受入時および群分け時
 (投与開始前日) に測定した。

期間 : 馴化 8 日までの 7 日間

検疫および馴化期間中に、1 例で小眼球が認められたが、他の動物に異常は認められ
 なかった。

(3) 群分け

検疫および馴化期間中に実施した一般状態観察および体重測定の結果を参考にし
 て、動物の使用の適否を決定した。すなわち、小眼球の 1 例を群分け前に除外し、残
 りの 71 匹から、検疫および馴化期間終了日の体重に基づいて、投与開始前日に層化無
 作為抽出法により各群の平均体重が均一になるように群分けを行い、試験に使用する
 66 匹を選抜した。選抜された動物の体重範囲は、16.9～20.3 g であり、平均体重
 (18.65 g) の±20%以内であることを確認した。除外例の 1 例および選抜から外れた動
 物 5 匹は試験から除外し、標準操作手順書に従って取扱った。

(4) 動物およびケージの識別

動物 : 油性フェルトペンで尾部に印を付け、個体識別を行った。
 飼育ケージ : 群分け前はラベルに試験番号および動物番号を明記し、各ケー
 ジの前面に標示した。
 群分け後はラベルに試験番号、試験群および動物番号を明記
 し、各ケージの前面に標示した。

(5) 動物飼育

1) 飼育環境

飼育室番号 : 202 号室
 温度・湿度 : 22±3℃(実測範囲 21～24℃)、50±20%(実測範囲 46～55%)
 換気回数 : 10～18 回/時間
 照明時間 : 人工照明 12 時間(8:00～20:00)

2) 飼育器材および飼育方法

ケージの種類 : ブラケット式金属製金網床ケージ(260W×380D×180H, mm)

1 ケージあたりの収容動物数

: 検疫および馴化期間中は3～5匹、群分け後は群毎に6匹収容した。

ケージ交換 : 群分け時に1回実施した。

受皿交換 : 週2回以上実施した。

給餌器交換 : 群分け時に1回実施した。

自動給水装置の水抜き

: 週1回実施した。

室内の清掃 : 1日1回実施した。

室内の消毒 : 塩素系消毒薬およびヨウ素系消毒薬を1週間単位で交互に使用する清拭消毒を1日1回実施した。

3) 飼料

種類・名称 : 固型飼料、CRF-1

ロット番号 : 091203

製造業者 : オリエンタル酵母工業株式会社

給餌方法 : 金属製給餌器を用いて自由に摂取させた。

汚染物質および微生物検査

: 試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質あるいは微生物の有無を、使用したロットの飼料について分析した。汚染物質の分析はEurofins Analytics 社(分析報告書: AR-09-JP-001534-02)が、微生物検査は飼料製造業者(分析試験報告書: No. 09G03-070)がそれぞれ行った。分析データを飼料製造業者から入手した。分析項目と許容値は株式会社 化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容値を超える値は認められなかった。

4) 飲料水

種類 : 札幌市水道水

給水方法 : 自動給水装置を用いて自由に摂取させた。

汚染物質検査 : 試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質の有無を、2010年1月4日および2010年4月1日に当該飼育室と同系統配管の最末端(205号室)から試料を採取して分析した。分析は日本衛生株式会社(水質検査結果表: No. A214124、A220008)が行い、分

析項目と許容値は株式会社 化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容値を超える値は認められなかった。

(6) 被験物質の投与

1) 投与量の設定

投与量 : 0 (対照群)、30、100、300 および 1000 mg/kg とした。

設定理由 : Dibenzoylmethane の 100、300 および 1000 mg/kg を雌性マウスに 7 日間反復皮下投与した予備試験 (試験番号 : S R O 9 1 3 4 P) では、各投与群とも被験物質投与と関連する変化は認められなかった。したがって、エストロゲン作用検出群としては、被験物質投与による毒性の発現がみられなかった 1000 mg/kg を高用量群とし、公比約 3 で除した 300、100 および 30 mg/kg をそれぞれ中高用量群、中低用量群および低用量群とし、媒体のみを皮下投与する陰性対照群および Ethynyl Estradiol 0.2 µg/kg を皮下投与する陽性対照群を加えた計 6 群を設けた。

抗エストロゲン作用検出群としては、1000、300、100 および 30 mg/kg の被験物質 (皮下投与) に加えて Ethynyl Estradiol 0.6 µg/kg (皮下投与) を同時に投与する 4 群を設定し、媒体 (皮下投与) に加えて Ethynyl Estradiol 0.6 µg/kg (皮下投与) を同時に投与する陰性対照群 (EE 群) を加えた計 5 群を設けた。

試験群の構成

試験群	Ethynyl Estradiol		被験物質		動物数 (動物番号) 雌
	投与量 (μg/kg)	濃度 (μg/mL)	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	
＜エストロゲン作用検出群＞					
陰性対照群*1	－	－	0	0	6 (151～156)
低用量群	－	－	30	6	6 (251～256)
中低用量群	－	－	100	20	6 (351～356)
中高用量群	－	－	300	60	6 (451～456)
高用量群	－	－	1000	200	6 (551～556)
陽性対照群*2	0.2	0.4	－	－	6 (651～656)
＜抗エストロゲン作用検出群＞					
EE 群 *3	0.6	1.2	0	0	6 (161～166)
低用量+EE 群*4	0.6	1.2	30	6	6 (261～266)
中低用量+EE 群*4	0.6	1.2	100	20	6 (361～366)
中高用量+EE 群*4	0.6	1.2	300	60	6 (461～466)
高用量+EE 群*4	0.6	1.2	1000	200	6 (561～566)

*1 : 日本薬局方オリブ油を皮下投与した。

*2 : Ethynyl Estradiol (EE) を皮下投与した。

*3：日本薬局方オリブ油を皮下投与後、Ethinyl Estradiol (EE) を皮下投与した。

*4：被験物質投与液を皮下投与後、Ethinyl Estradiol (EE) を皮下投与した。

2) 投与

① 被験物質および媒体

投与方法および投与経路

：背部肩甲骨の間を 70%エタノールで消毒後、25G×5/8 の注射針の付いた注射筒を用いて皮下投与した。

投与回数：1 日 1 回、7 日間連続投与した。

投与方法、投与経路および投与回数の選定理由

：「試験法ガイドライン」を参考とした。

投与時刻：13：00～14：30。

投与容量：5 mL/kg とした。各個体の投与液量は投与日の体重に基づいて算出した。

② 比較対照物質

投与方法および投与経路

エストロゲン作用検出群

：背部肩甲骨の間を 70%エタノールで消毒後、マイクロシリンジを用いて皮下投与した。

抗エストロゲン作用検出群

；媒体あるいは被験物質を皮下投与した後に、背部肩甲骨の間を 70%エタノールで消毒し、マイクロシリンジを用いて皮下投与した。

投与回数：1 日 1 回、7 日間連続投与した。

投与方法、投与経路および投与回数の選定理由

：「試験法ガイドライン」を参考とした。

投与時刻：13：30～15：00。

投与容量：0.5 mL/kg とした。各個体の投与液量は投与日の体重に基づいて算出した。

(7) 観察、測定および検査項目

以下の項目について実施した。投与日数は投与開始日を投与 1 日として起算した。

1) 一般状態観察

例数：全例

期間：投与 1 日から投与 7 日の翌日の剖検日まで。

頻度：毎日の投与前、投与後（午後）の計 2 回。ただし、剖検日は午前中に 1 回。

観察方法 : 個々の動物の生死、外観、行動等について観察した。

2) 体重測定

例数 : 全例

測定日 : 投与 1 日から投与 7 日までの毎日の投与前ならびに剖検日の午前中に測定した。

測定方法 : 電子式上皿天秤を用いて測定し、0.1 g 単位で記録した。

3) 剖検

例数 : 全例

検査時期 : 最終投与の 22～25 時間後に実施した。

検査方法 : 体外表を観察し、エーテル麻酔下で放血により安楽死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。子宮については実体顕微鏡下で余分な脂肪を除去した。子宮および膈を 10% 中性緩衝ホルマリン液に固定・保存した。

4) 器官重量測定

例数 : 全例

検査時期 : 剖検時

測定方法 : 電子式上皿天秤を用いて子宮重量を 0.1 mg 単位で測定した。
子宮重量は子宮内液を含んだ重量(wet weight)および子宮壁の一部を切開して子宮内液を除いた重量(blotted weight)について測定した。

相対重量の算出 : 以下の式から相対重量を算出した。

$$\text{相対重量 (10}^{-3}\%) = \frac{\text{絶対重量 (mg)}}{\text{剖検日体重 (g)}} \times 100$$

5) 病理組織学的検査

抗エストロゲン作用検出群の器官重量に被験物質投与に関連した変化が認められたため、抗エストロゲン作用検出群について全例の子宮角部、頸部および膈をパラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して鏡検した。

なお、エストロゲン作用検出群については、被験物質投与に関連した変化が認められなかったため病理組織学的検査は実施しなかった。

6. 統計学的方法

体重および器官重量の成績について平均値および標準偏差を算出し、Bartlett の検定法を行い、等分散性を解析した。等分散 ($p > 0.05$) の場合は一元配置分散分析法で解析し、不等分散 ($p \leq 0.05$) の場合は Kruskal-Wallis の検定法で解析した。一元配置分散分析の結果、有意差がみられた場合 ($p \leq 0.10$) は Dunnett の検定法を用いて陰性対照群ある

いは EE 群との比較を行った。Kruskal-Wallis 法の解析の結果、有意差がみられた場合 ($p \leq 0.10$) は Mann-Whitney の U-検定法を用い陰性対照群あるいは EE 群との比較を行った。

抗エストロゲン作用検出群の子宮および膣の病理組織学的所見のうち 1 段階のグレードが認められた所見については、多試料カイ二乗検定を行い、その結果、有意差が認められた場合には 2 試料カイ二乗検定で EE 群との比較を行った。ただし、2 試料カイ二乗検定に不適合の場合には Fisher の直接確率検定法を用いた。2 段階以上のグレードが認められた所見については、Kruskal-Wallis 法で解析し、有意差がみられた場合 ($p \leq 0.10$) は Mann-Whitney の U-検定法を用いて EE 群との比較を行った。

陰性対照群あるいは EE 群との比較検定については、有意水準を 5% とした。なお、統計学的方法に関する表示方法を INDIVIDUAL DATA の冒頭に示す。

成 績

1. 一般状態

一般状態の成績を Table 1 および 2、INDIVIDUAL DATA 1-1-1～1-2-5 に示す。

(1) エストロゲン作用検出群

いずれの投与群でも異常は認められなかった。

(2) 抗エストロゲン作用検出群

いずれの投与群でも異常は認められなかった。

2. 体重

体重の成績を Figure 1 および 2、Table 3 および 4、INDIVIDUAL DATA 2-1-1～2-2-5 に示す。

(1) エストロゲン作用検出群

いずれの投与群でも陰性対照群と比較して有意な差は認められなかった。

(2) 抗エストロゲン作用検出群

30 mg/kg 群では、投与 4、5 および 7 日ならびに剖検日に EE 群と比較して有意な低値が認められたが、用量依存性のない変化であり、毒性学的な意義はないと判断した。

100 mg/kg 以上の群では、有意な差は認められなかった。

3. 剖検

剖検所見を Table 5 および 6、INDIVIDUAL DATA 3-1-1～3-2-5 に示す。

(1) エストロゲン作用検出群

30、100 および 300 mg/kg 群では、異常所見は認められなかった。

1000 mg/kg 群では、全例で肝臓の肥大が認められた。

陰性対照群および陽性対照群には異常所見は認められなかった。

(2) 抗エストロゲン作用検出群

EE 群ならびに 30、100 および 300 mg/kg 群では、異常所見は認められなかった。

1000 mg/kg 群では、全例で肝臓の肥大が認められた。

4. 器官重量

器官の絶対および相対重量を Table 7 および 8、INDIVIDUAL DATA 4-1-1～4-2-5 に示す。

(1) エストロゲン作用検出群

各被験物質投与群ともに陰性対照群と比較して有意な差は認められなかった。

陽性対照群では、wet weight および blotted weight の絶対および相対重量に有意な高値が認められた。

(2) 抗エストロゲン作用検出群

100 および 300 mg/kg 群では、wet weight および blotted weight の絶対および相対重量で EE 群と比較して有意な差は認められなかったものの低値傾向が認められた。

30 および 1000 mg/kg 群では、wet weight および blotted weight の絶対および相対重量に有意な低値が認められた。

5. 病理組織学的検査

抗エストロゲン作用検出群について実施した病理組織学的所見を Table 9、INDIVIDUAL DATA 5-1-1～5-1-5 に示す。

各群に Ethynyl Estradiol に対する反応として、子宮角部では内膜の肥大、内膜上皮の肥大や空胞化、筋層の肥大等、子宮頸部や膣では扁平上皮の肥厚や角化が認められ、これらの所見の内、1000 mg/kg 群で子宮角部の内膜上皮の肥大に EE 群と比較してグレードの有意な低下、筋層の肥大に発現例数の有意な低下、ならびに子宮頸部の扁平上皮の肥厚にグレードの有意な低下が認められた。また、子宮角部の筋層の肥大については、30 mg/kg 群でも発現例数の有意な低下が認められた。100 および 300 mg/kg 群では、子宮角部の筋層の肥大が認められない例が認められた。この変化は有意差の有無に関わらず Ethynyl Estradiol に対する反応の低下と判断された。

他に、1000 mg/kg 群では子宮角部の内膜の肥大および内膜の好中球浸潤に発現例数の低下傾向、また、子宮頸部の扁平上皮の角化にグレードの低下傾向が認められた。

考 察

Dibenzoylmethane の 30、100、300 および 1000 mg/kg を 1 群につき 6 匹の卵巢摘出雌性マウスに 7 日間反復皮下投与し、子宮重量の変化からエストロゲン作用の有無について検討した。さらに、Ethinyl Estradiol を併用投与した際の子宮重量の変化から、抗エストロゲン作用の有無についても検討した。

各群ともに一般状態および体重には、エストロゲン作用検出群および抗エストロゲン作用検出群ともに被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

剖検所見では、エストロゲン作用検出群および抗エストロゲン作用検出群のいずれにも 1000 mg/kg 群の全例で肝臓の肥大が認められた。この変化は予備試験では認められなかったが、全例で発現していることから被験物質の影響と考えられ、予備試験よりも毒性発現が強く認められたものと推察された。

一方、子宮重量については、エストロゲン作用検出群には被験物質投与に関連した変化は認められなかったが、抗エストロゲン作用検出群の 30 mg/kg 以上の群で wet weight および blotted weight の絶対および相対重量に低値傾向が認められた。30 mg/kg 群では、体重が他群と比較して若干低値であるものの子宮重量の数値は有意差を伴う 1000 mg/kg 群と同等の数値であり、30 mg/kg 群の変化は被験物質投与に関連する変化と推察された。

病理組織学的所見では、30 mg/kg 以上の群で子宮角部の筋層の肥大に発現例数の有意な低下あるいは低下傾向、1000 mg/kg 群で子宮角部の内膜の肥大および内膜の好中球浸潤に発現例数の低下傾向、また、子宮頸部の扁平上皮の角化にグレードの低下傾向が認められた。これらの変化は、いずれも Ethinyl Estradiol に対する生体反応の阻害を示すものと考えられた。

本試験では、子宮重量および病理組織学的所見のいずれにおいても、100 および 300 mg/kg 群と比較して 30 mg/kg 群で子宮肥大反応の抑制がより強く認められた。このことに関しては、30 mg/kg 群の投与液はほぼ溶液状態に近い状態であったが、100 mg/kg 以上の群では懸濁の割合が多くなっていたことから、被験物質を懸濁液により投与したため溶解状態に違いが生じ、結果として被験物質の吸収に差が生じた可能性が考えられた。

結 論

Dibenzoylmethane の 30、100、300 および 1000 mg/kg を 1 群につき 6 匹の卵巢摘出雌性マウスに 7 日間反復皮下投与し、子宮重量の変化からエストロゲン作用の有無について検討した。さらに、Ethynyl Estradiol を併用投与した際の子宮重量の変化から、抗エストロゲン作用の有無についても検討した。その結果、エストロゲン作用検出群では被験物質投与と関連した変化は認められなかったが、抗エストロゲン作用検出群では 30 mg/kg 以上の群で抗エストロゲン作用が認められ、子宮重量の低下傾向あるいは有意な低下ならびに病理組織学的所見における子宮角部の筋層の肥大に発現例数の低下あるいは低下傾向が認められ、1000 mg/kg 群では子宮角部の内膜の肥大および内膜の好中球浸潤に発現例数の低下傾向、また、子宮頸部の扁平上皮の角化にグレードの低下傾向が認められた。

したがって、本試験条件下では、Dibenzoylmethane のエストロゲン作用は陰性、抗エストロゲン作用は 30 mg/kg 以上で陽性と結論された。

参考資料

- 1) XXXXXXXXXX オンラインカタログおよび製品安全データシート
- 2) 日化辞 Web : JST の有機化合物辞書 DB 「日本化学物質辞書」 検索サービス。

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因はなかった。

資料の保存

下記の資料を試験終了後 10 年間、株式会社 化合物安全性研究所の資料保存室に保存する。

その後の保存については試験委託者との協議により決定する。

- ① 試験計画書および試験計画書変更書
- ② 生データその他の記録文書
- ③ 最終報告書
- ④ 標本 : 固定器官・組織
 : 病理組織標本(パラフィン包埋ブロックおよび光顕標本)

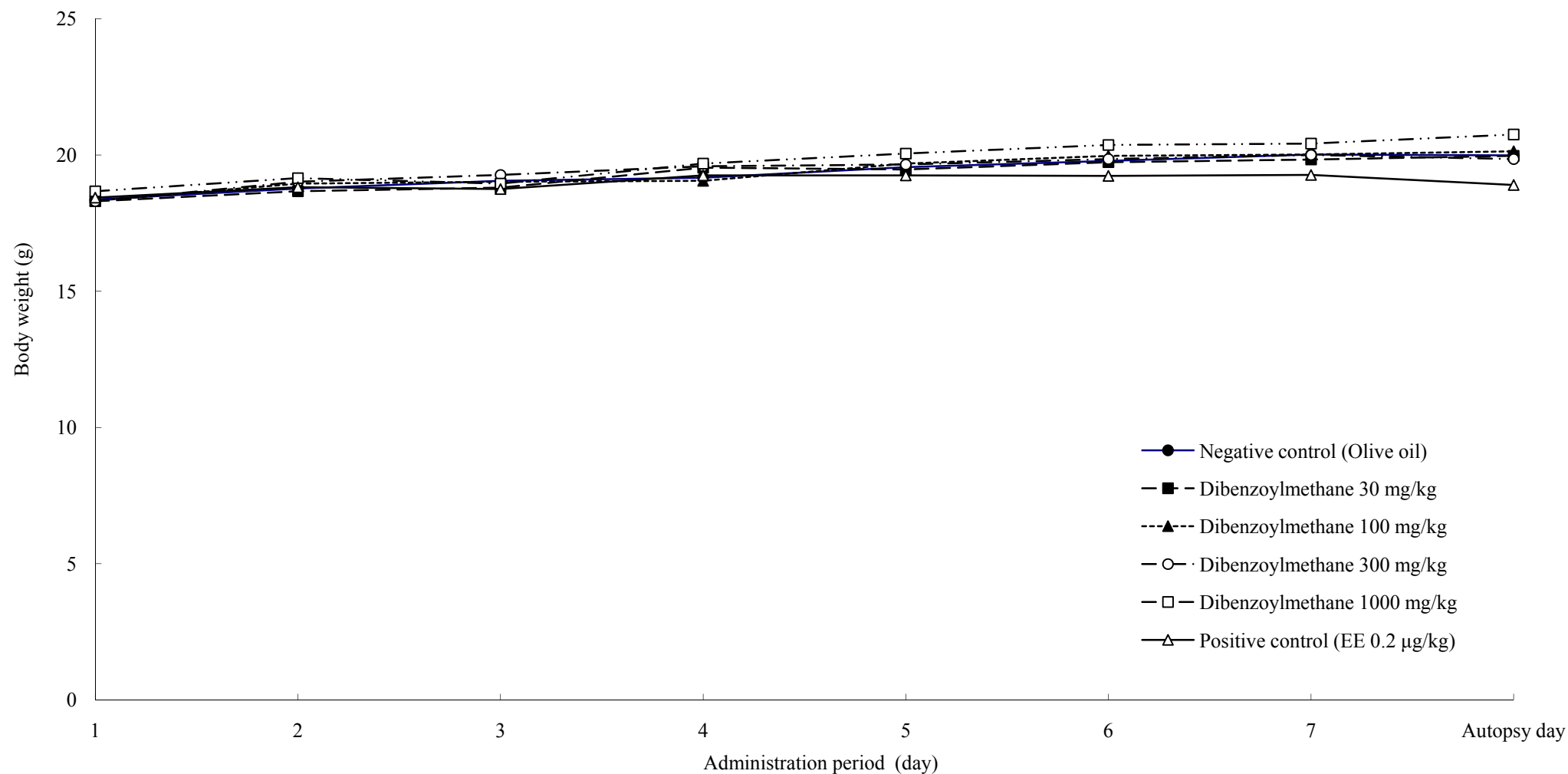
試験責任者の記名なつ印

試験施設：株式会社 化合物安全性研究所

試験責任者



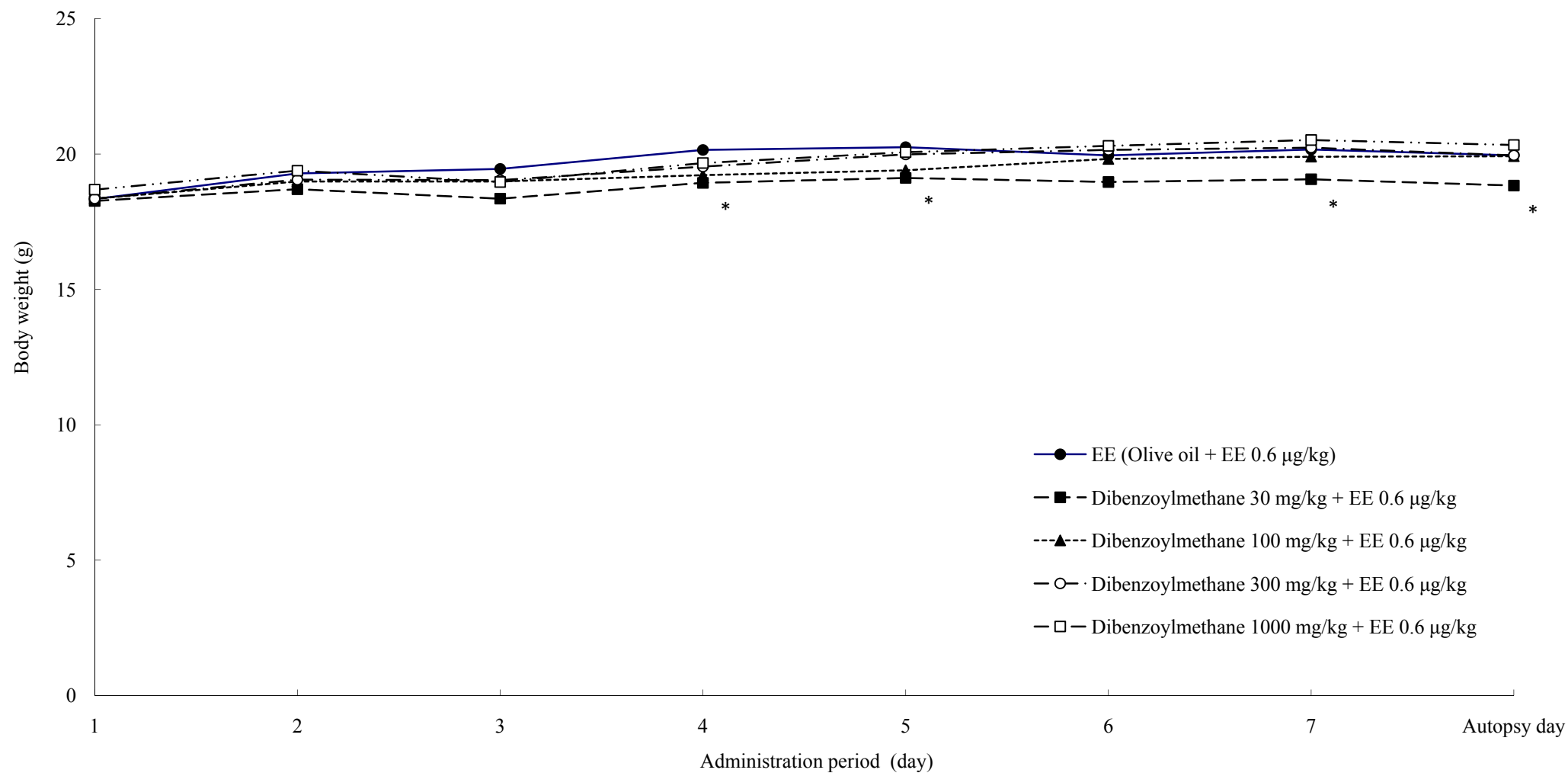
2010 年 4 月 28 日



EE: Ethynyl Estradiol.

Figure 1

Body weight of ovariectomized female mice for detection of estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Dibenzoylemethane (SR09134)



EE: Ethynyl Estradiol.

Figure 2

Body weight of ovariectomized female mice for detection of anti-estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Dibenzoylemethane (SR09134)

*: Significantly different from the EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg) group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

Table 1

General appearance of ovariectomized female mice for detection of estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Dibenzoylmethane (SR09134)

Group	Findings	Administration period (day)	Autopsy
		1-7	day
Negative control (Olive oil)	Number of animals examined	6	6
	No abnormal findings	6	6
Dibenzoylmethane 30 mg/kg	Number of animals examined	6	6
	No abnormal findings	6	6
Dibenzoylmethane 100 mg/kg	Number of animals examined	6	6
	No abnormal findings	6	6
Dibenzoylmethane 300 mg/kg	Number of animals examined	6	6
	No abnormal findings	6	6
Dibenzoylmethane 1000 mg/kg	Number of animals examined	6	6
	No abnormal findings	6	6
Positive control (EE 0.2 µg/kg)	Number of animals examined	6	6
	No abnormal findings	6	6

Values are number of animals with findings.

EE: Ethynyl Estradiol.

Table 2

General appearance of ovariectomized female mice for detection of anti-estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Dibenzoylmethane (SR09134)

Group	Findings	Administration period (day)	Autopsy day
		1-7	
EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg)	Number of animals examined	6	6
	No abnormal findings	6	6
Dibenzoylmethane 30 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	Number of animals examined	6	6
	No abnormal findings	6	6
Dibenzoylmethane 100 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	Number of animals examined	6	6
	No abnormal findings	6	6
Dibenzoylmethane 300 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	Number of animals examined	6	6
	No abnormal findings	6	6
Dibenzoylmethane 1000 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	Number of animals examined	6	6
	No abnormal findings	6	6

Values are number of animals with findings.

EE: Ethynyl Estradiol.

Table 3

Body weight of ovariectomized female mice for detection of estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Dibenzoylmethane (SR09134)

Group	Number of animals		Body weight (g) on administration period (day)							Autopsy day
			1	2	3	4	5	6	7	
Negative control (Olive oil)	6	MEAN	18.37	18.77	19.05	19.17	19.55	19.78	20.02	19.98
		S.D.	0.58	0.67	0.73	0.63	0.57	0.55	0.48	0.53
Dibenzoylmethane 30 mg/kg	6	MEAN	18.30	18.67	18.80	19.53	19.47	19.73	19.83	19.97
		S.D.	0.40	0.58	0.50	0.58	0.67	0.82	0.90	0.93
Dibenzoylmethane 100 mg/kg	6	MEAN	18.32	18.95	19.02	19.05	19.68	19.97	20.02	20.13
		S.D.	0.72	0.96	0.73	0.71	0.92	0.97	1.05	1.03
Dibenzoylmethane 300 mg/kg	6	MEAN	18.30	19.02	19.27	19.58	19.65	19.85	20.00	19.85
		S.D.	0.64	0.88	0.88	0.92	0.98	0.89	0.93	0.87
Dibenzoylmethane 1000 mg/kg	6	MEAN	18.67	19.15	18.95	19.68	20.05	20.37	20.42	20.75
		S.D.	0.69	0.82	1.02	0.93	0.93	0.85	0.77	0.80
Positive control (EE 0.2 µg/kg)	6	MEAN	18.43	18.82	18.75	19.25	19.25	19.23	19.27	18.90
		S.D.	0.83	0.96	1.10	1.10	1.13	1.23	1.19	1.24

EE: Ethynyl Estradiol.

Table 4

Body weight of ovariectomized female mice for detection of anti-estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Dibenzoylmethane (SR09134)

Group	Number of animals		Body weight (g) on administration period (day)							Autopsy day
			1	2	3	4	5	6	7	
EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg)	6	MEAN	18.33	19.28	19.45	20.15	20.25	19.95	20.17	19.95
		S.D.	0.65	0.71	0.74	0.74	0.75	0.89	0.87	1.07
Dibenzoylmethane 30 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	6	MEAN	18.27	18.70	18.35	18.93 *	19.12 *	18.97	19.07 *	18.83 *
		S.D.	0.48	0.49	0.64	0.62	0.74	0.65	0.48	0.55
Dibenzoylmethane 100 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	6	MEAN	18.35	18.98	18.98	19.22	19.40	19.82	19.90	19.92
		S.D.	0.87	0.86	0.71	0.74	0.67	0.70	0.57	0.61
Dibenzoylmethane 300 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	6	MEAN	18.35	19.05	19.03	19.53	19.98	20.15	20.23	19.95
		S.D.	0.59	0.46	0.57	0.55	0.67	0.73	0.64	0.54
Dibenzoylmethane 1000 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	6	MEAN	18.68	19.38	18.97	19.67	20.07	20.30	20.52	20.33
		S.D.	0.70	0.66	0.62	0.74	0.69	0.83	0.79	0.72

EE: Ethynyl Estradiol.

*: Significantly different from the EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg) group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

Table 5

Autopsy findings of ovariectomized female mice for detection of estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Dibenzoylmethane (SR09134)

Item	Group	Negative control (Olive oil)	Dibenzoylmethane				Positive control (EE 0.2 µg/kg)
			30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	
Number of animals examined		6	6	6	6	6	6
Organ : Findings							
Liver : Hypertrophy		0	0	0	0	6	0

Values are number of animals with findings.

EE: Ethynyl Estradiol.

Table 6

Autopsy findings of ovariectomized female mice for detection of anti-estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Dibenzoylmethane (SR09134)

Item	Group	EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg)	Dibenzoylmethane			
			30 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	100 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	300 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	1000 mg/kg + EE 0.6 µg/kg
Number of animals examined		6	6	6	6	6
Organ : Findings						
Liver : Hypertrophy		0	0	0	0	6

Values are number of animals with findings.

EE: Ethynyl Estradiol.

Table 7

Absolute and relative organ weights of ovariectomized female mice for detection of estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Dibenzoylmethane (SR09134)

Group	Number of animals		Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)	
				mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
Negative control (Olive oil)	6	MEAN	19.98	13.23	66.483	11.07	55.575
		S.D.	0.53	2.36	13.507	1.73	10.050
Dibenzoylmethane 30 mg/kg	6	MEAN	19.97	13.12	65.707	10.83	54.287
		S.D.	0.93	1.60	7.496	1.50	7.367
Dibenzoylmethane 100 mg/kg	6	MEAN	20.13	12.63	62.775	10.57	52.600
		S.D.	1.03	1.11	5.048	1.00	5.736
Dibenzoylmethane 300 mg/kg	6	MEAN	19.85	13.12	66.103	11.10	55.965
		S.D.	0.87	1.45	6.960	1.24	6.269
Dibenzoylmethane 1000 mg/kg	6	MEAN	20.75	12.92	62.320	11.08	53.475
		S.D.	0.80	1.73	8.617	1.18	6.040
Positive control (EE 0.2 µg/kg)	6	MEAN	18.90	25.48 **	134.985 ++	22.48 ++	119.003 ++
		S.D.	1.24	3.82	20.103	4.19	21.571

EE: Ethynyl Estradiol.

** : Significantly different from the negative control (Olive oil) group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

++ : Significantly different from the negative control (Olive oil) group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney's U-test).

Table 8

Absolute and relative organ weights of ovariectomized female mice for detection of anti-estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Dibenzoylmethane (SR09134)

Group	Number of animals		Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)	
				mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg)	6	MEAN	19.95	92.57	464.212	73.28	367.188
		S.D.	1.07	19.83	99.068	8.05	34.489
Dibenzoylmethane 30 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	6	MEAN	18.83 *	53.20 **	281.765 **	46.87 **	248.228 **
		S.D.	0.55	12.40	61.170	10.25	50.148
Dibenzoylmethane 100 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	6	MEAN	19.92	77.38	389.198	66.93	336.450
		S.D.	0.61	11.88	63.882	9.89	51.875
Dibenzoylmethane 300 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	6	MEAN	19.95	73.95	371.067	63.33	317.698
		S.D.	0.54	8.23	43.747	9.00	45.962
Dibenzoylmethane 1000 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	6	MEAN	20.33	53.57 **	262.877 **	48.13 **	236.105 **
		S.D.	0.72	13.05	59.248	12.54	56.913

EE: Ethynyl Estradiol.

*: Significantly different from the EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg) group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

**: Significantly different from the EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg) group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

Table 9

Histopathological findings of ovariectomized female mice for detection of anti-estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Dibenzoylmethane (SR09134)

Item	Group	EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg)	Dibenzoylmethane			
			30 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	100 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	300 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	1000 mg/kg + EE 0.6 µg/kg
Number of animals examined		6	6	6	6	6
Organ: Findings	Grade					
Uterine horn: Hypertrophy, endometrium	+	6	5	6	6	2
Hypertrophy, endometrial epithelium	+	2	5	3	3	5
	++	4	1	3	3	0
Vacuolation, endometrial epithelium	+	6	6	4	6	4
	++	0	0	1	0	2
Mitosis, endometrial epithelium	+	6	5	4	6	4
	++	0	1	1	0	1
Vacuolation, glandular epithelium	+	6	6	4	6	6
Cellular infiltration, neutrophil, endometrium	+	6	5	6	6	2
Hypertrophy, myometrium	+	5	2	5	4	1
	++	1	0	0	0	0
Uterine cervix: Thickening, squamous epithelium	+	1	3	2	1	4
	++	2	2	2	0	0
	+++	3	1	2	4	0
Keratinization, squamous epithelium	+	1	3	3	1	4
	++	3	1	2	3	0
Vagina: Thickening, squamous epithelium	+++	6	6	6	6	6
Keratinization, squamous epithelium	+++	6	6	6	6	6

Values are number of animals with findings.

Grade; +: slight, ++: moderate, +++: severe change.

[]+, []++ : Significantly different from the EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg) group at $p \leq 0.05$, 0.01 (Mann-Whitney's U-test).

Symbols and process for statistical analysis in INDIVIDUAL DATA

M/C: Values for Bartlett's test for homogeneity of variance,

$p \leq 0.05$ ----- > Kruskal-Wallis test

$p > 0.05$ ----- > One way analysis of variance

F : Values for one way analysis of variance,

$p \leq 0.10$ ----- > Dunnett's test

H : Values for Kruskal-Wallis test,

$p \leq 0.10$ ----- > Mann-Whitney's U-test

† : Significant difference, $p \leq 0.10$

* : Significant difference, $p \leq 0.05$

** : Significant difference, $p \leq 0.01$

t' : Values for Dunnett's test

U : Values for Mann-Whitney's U-test

* : Significant difference, $p \leq 0.05$

** : Significant difference, $p \leq 0.01$

X^2 : Values for chi-square test

p : Values for Fisher's exact probability test

* : Significant difference, $p \leq 0.05$

** : Significant difference, $p \leq 0.01$

INDIVIDUAL DATA 1-1-1

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

General appearance ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Negative control (Olive oil)

Animal No.	<u>Administration period (day)</u> 1-7	Autopsy day
151	N	N
152	N	N
153	N	N
154	N	N
155	N	N
156	N	N

N: No abnormal findings.

INDIVIDUAL DATA 1-1-2

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

General appearance ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 30 mg/kg

Animal No.	<u>Administration period (day)</u> 1-7	Autopsy day
251	N	N
252	N	N
253	N	N
254	N	N
255	N	N
256	N	N

N: No abnormal findings.

INDIVIDUAL DATA 1-1-3

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

General appearance ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 100 mg/kg

Animal No.	<u>Administration period (day)</u> 1-7	Autopsy day
351	N	N
352	N	N
353	N	N
354	N	N
355	N	N
356	N	N

N: No abnormal findings.

INDIVIDUAL DATA 1-1-4

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

General appearance ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 300 mg/kg

Animal No.	<u>Administration period (day)</u>	Autopsy day
	1-7	
451	N	N
452	N	N
453	N	N
454	N	N
455	N	N
456	N	N

N: No abnormal findings.

INDIVIDUAL DATA 1-1-5

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

General appearance ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 1000 mg/kg

Animal No.	<u>Administration period (day)</u> 1-7	Autopsy day
551	N	N
552	N	N
553	N	N
554	N	N
555	N	N
556	N	N

N: No abnormal findings.

INDIVIDUAL DATA 1-1-6

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

General appearance ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Positive control (EE 0.2 µg/kg)

Animal No.	<u>Administration period (day)</u>	Autopsy day
	1-7	
651	N	N
652	N	N
653	N	N
654	N	N
655	N	N
656	N	N

EE: Ethynyl Estradiol.

N: No abnormal findings.

INDIVIDUAL DATA 1-2-1

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylemethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

General appearance ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg)

Animal No.	<u>Administration period (day)</u> 1-7	Autopsy day
161	N	N
162	N	N
163	N	N
164	N	N
165	N	N
166	N	N

EE: Ethynyl Estradiol.

N: No abnormal findings.

INDIVIDUAL DATA 1-2-2

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

General appearance ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 30 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	<u>Administration period (day)</u> 1-7	Autopsy day
261	N	N
262	N	N
263	N	N
264	N	N
265	N	N
266	N	N

EE: Ethynyl Estradiol.

N: No abnormal findings.

INDIVIDUAL DATA 1-2-3

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

General appearance ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 100 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	<u>Administration period (day)</u> 1-7	Autopsy day
361	N	N
362	N	N
363	N	N
364	N	N
365	N	N
366	N	N

EE: Ethynyl Estradiol.

N: No abnormal findings.

INDIVIDUAL DATA 1-2-4

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

General appearance ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 300 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	<u>Administration period (day)</u>	Autopsy day
	1-7	
461	N	N
462	N	N
463	N	N
464	N	N
465	N	N
466	N	N

EE: Ethynyl Estradiol.

N: No abnormal findings.

INDIVIDUAL DATA 1-2-5

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

General appearance ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 1000 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	<u>Administration period (day)</u> 1-7	Autopsy day
561	N	N
562	N	N
563	N	N
564	N	N
565	N	N
566	N	N

EE: Ethynyl Estradiol.

N: No abnormal findings.

INDIVIDUAL DATA 2-1-1

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylemethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Body weight ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Negative control (Olive oil)

Animal No.	Body weight (g) on administration period (day)							Autopsy day
	1	2	3	4	5	6	7	
151	17.3	17.6	17.6	18.2	18.5	18.8	19.1	19.0
152	18.1	18.4	19.3	18.9	19.6	20.0	20.4	20.1
153	18.6	18.9	19.2	19.5	19.8	19.9	20.0	20.0
154	18.6	19.1	19.4	19.1	19.4	19.6	20.0	20.2
155	18.8	19.2	19.6	20.1	20.1	20.4	20.4	20.6
156	18.8	19.4	19.2	19.2	19.9	20.0	20.2	20.0
N	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	18.37	18.77	19.05	19.17	19.55	19.78	20.02	19.98
S.D.	0.58	0.67	0.73	0.63	0.57	0.55	0.48	0.53
S.E.	0.24	0.27	0.30	0.26	0.23	0.22	0.20	0.22
M/C	2.5341	1.8454	3.4268	2.8851	2.7767	2.9976	3.7972	3.3608
F	0.2787	0.2793	0.2895	0.5676	0.5400	0.9837	1.0121	2.5041 †

INDIVIDUAL DATA 2-1-2

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Body weight ANIMAL : Mouse, C57BL/6JMsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 30 mg/kg

Animal No.	Body weight (g) on administration period (day)							Autopsy day
	1	2	3	4	5	6	7	
251	18.0	17.8	18.4	18.9	19.1	19.4	19.0	19.3
252	17.9	18.3	18.3	19.2	18.8	18.8	18.9	19.0
253	18.2	18.7	18.7	19.5	19.3	19.9	20.0	20.0
254	18.2	18.8	18.8	19.5	19.7	19.8	20.3	20.3
255	18.5	18.9	18.9	19.5	19.2	19.3	19.5	19.6
256	19.0	19.5	19.7	20.6	20.7	21.2	21.3	21.6
N	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	18.30	18.67	18.80	19.53	19.47	19.73	19.83	19.97
S.D.	0.40	0.58	0.50	0.58	0.67	0.82	0.90	0.93
S.E.	0.16	0.23	0.20	0.23	0.27	0.33	0.37	0.38
t'								0.0312

INDIVIDUAL DATA 2-1-3

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Body weight ANIMAL : Mouse, C57BL/6JMsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 100 mg/kg

Animal No.	Body weight (g) on administration period (day)							Autopsy day
	1	2	3	4	5	6	7	
351	17.7	18.1	18.3	18.4	18.9	19.4	19.5	19.6
352	18.3	18.7	19.0	19.2	19.3	19.6	19.7	19.7
353	17.5	17.8	18.1	18.1	18.7	18.6	18.5	18.7
354	18.1	19.0	19.1	19.0	19.6	20.1	20.0	20.2
355	18.9	20.2	19.6	19.6	20.9	21.1	21.3	21.5
356	19.4	19.9	20.0	20.0	20.7	21.0	21.1	21.1
N	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	18.32	18.95	19.02	19.05	19.68	19.97	20.02	20.13
S.D.	0.72	0.96	0.73	0.71	0.92	0.97	1.05	1.03
S.E.	0.29	0.39	0.30	0.29	0.38	0.40	0.43	0.42
t'								0.2809

INDIVIDUAL DATA 2-1-4

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Body weight ANIMAL : Mouse, C57BL/6JMsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 300 mg/kg

Animal No.	Body weight (g) on administration period (day)							Autopsy day
	1	2	3	4	5	6	7	
451	17.5	18.1	18.6	18.9	19.0	19.4	19.4	19.8
452	18.0	18.8	18.9	19.1	19.2	19.3	19.4	19.2
453	17.8	18.1	18.2	18.4	18.3	18.6	18.8	18.5
454	18.5	19.2	19.5	20.2	20.4	20.6	20.9	20.5
455	18.9	19.5	19.8	20.1	20.1	20.3	20.4	20.3
456	19.1	20.4	20.6	20.8	20.9	20.9	21.1	20.8
N	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	18.30	19.02	19.27	19.58	19.65	19.85	20.00	19.85
S.D.	0.64	0.88	0.88	0.92	0.98	0.89	0.93	0.87
S.E.	0.26	0.36	0.36	0.38	0.40	0.36	0.38	0.35
t'								0.2497

INDIVIDUAL DATA 2-1-5

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Body weight ANIMAL : Mouse, C57BL/6JMsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 1000 mg/kg

Animal No.	Body weight (g) on administration period (day)							Autopsy day
	1	2	3	4	5	6	7	
551	17.3	17.6	17.2	18.1	18.2	18.7	19.0	19.3
552	18.7	19.0	18.4	19.1	20.1	20.3	20.3	20.7
553	19.1	19.6	20.0	20.5	20.3	20.6	20.3	21.5
554	19.0	19.7	19.4	20.1	20.4	21.0	20.9	21.4
555	18.8	19.2	19.0	19.8	20.6	20.7	21.0	21.0
556	19.1	19.8	19.7	20.5	20.7	20.9	21.0	20.6
N	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	18.67	19.15	18.95	19.68	20.05	20.37	20.42	20.75
S.D.	0.69	0.82	1.02	0.93	0.93	0.85	0.77	0.80
S.E.	0.28	0.33	0.42	0.38	0.38	0.35	0.31	0.33
t'								1.4357

INDIVIDUAL DATA 2-1-6

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylemethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Body weight ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Positive control (EE 0.2 µg/kg)

Animal No.	Body weight (g) on administration period (day)							Autopsy day
	1	2	3	4	5	6	7	
651	18.0	18.3	18.2	18.5	18.3	18.2	18.3	17.9
652	18.0	18.5	18.3	18.9	18.7	18.8	18.8	18.2
653	18.0	18.1	17.8	18.2	18.3	18.4	18.3	18.0
654	18.1	18.4	18.7	19.2	19.4	19.1	19.3	18.9
655	18.4	18.9	18.6	19.4	19.5	19.3	19.4	19.2
656	20.1	20.7	20.9	21.3	21.3	21.6	21.5	21.2
N	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	18.43	18.82	18.75	19.25	19.25	19.23	19.27	18.90
S.D.	0.83	0.96	1.10	1.10	1.13	1.23	1.19	1.24
S.E.	0.34	0.39	0.45	0.45	0.46	0.50	0.49	0.51
t'								2.0287

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 2-2-1

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylemethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Body weight ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg)

Animal No.	Body weight (g) on administration period (day)							Autopsy day
	1	2	3	4	5	6	7	
161	17.8	18.5	18.6	19.3	19.6	19.2	19.4	19.2
162	17.9	19.0	19.5	20.2	20.2	19.6	19.7	19.3
163	18.1	19.0	19.5	20.5	20.7	20.3	20.6	20.2
164	18.3	19.2	19.1	19.8	19.5	19.5	19.5	19.3
165	18.3	19.4	19.2	19.7	20.0	19.5	20.1	19.7
166	19.6	20.6	20.8	21.4	21.5	21.6	21.7	22.0
N	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	18.33	19.28	19.45	20.15	20.25	19.95	20.17	19.95
S.D.	0.65	0.71	0.74	0.74	0.75	0.89	0.87	1.07
S.E.	0.27	0.29	0.30	0.30	0.31	0.36	0.36	0.44
M/C	1.7895	2.4417	0.4117	0.6428	0.1012	0.5894	2.1671	3.3684
F	0.3583	1.0169	2.1413	2.7419 †	2.7991 *	2.7871 *	3.9250 *	3.6443 *

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 2-2-2

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylemethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Body weight ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Dibenzoylemethane 30 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Body weight (g) on administration period (day)							Autopsy day
	1	2	3	4	5	6	7	
261	17.6	18.1	17.5	18.1	18.3	18.2	18.4	18.1
262	18.0	18.8	18.7	19.0	18.8	18.9	19.1	18.8
263	18.0	18.5	18.0	18.6	18.8	18.6	18.9	18.4
264	18.6	19.2	19.3	19.9	20.3	19.9	19.5	19.6
265	18.5	18.3	18.0	18.7	18.8	18.6	18.8	18.8
266	18.9	19.3	18.6	19.3	19.7	19.6	19.7	19.3
N	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	18.27	18.70	18.35	18.93	19.12	18.97	19.07	18.83
S.D.	0.48	0.49	0.64	0.62	0.74	0.65	0.48	0.55
S.E.	0.20	0.20	0.26	0.25	0.30	0.27	0.19	0.23
t'				3.0853 *	2.7845 *	2.2309	2.7817 *	2.6673 *

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 2-2-3

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Body weight ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 100 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Body weight (g) on administration period (day)							Autopsy day
	1	2	3	4	5	6	7	
361	17.1	18.0	18.1	18.5	18.7	19.0	19.2	19.4
362	18.0	18.7	18.9	19.5	19.5	19.8	20.0	19.9
363	18.0	18.3	18.2	18.2	18.6	19.0	19.2	19.1
364	18.7	19.2	19.4	19.6	19.7	20.3	20.2	20.3
365	18.6	19.3	19.5	19.3	19.5	20.1	20.3	20.0
366	19.7	20.4	19.8	20.2	20.4	20.7	20.5	20.8
N	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	18.35	18.98	18.98	19.22	19.40	19.82	19.90	19.92
S.D.	0.87	0.86	0.71	0.74	0.67	0.70	0.57	0.61
S.E.	0.36	0.35	0.29	0.30	0.27	0.28	0.23	0.25
t'				2.3668	2.0883	0.3025	0.6743	0.0796

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 2-2-4

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Body weight ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 300 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Body weight (g) on administration period (day)							Autopsy day
	1	2	3	4	5	6	7	
461	17.8	18.7	18.4	19.0	19.2	19.6	19.7	19.9
462	17.8	18.5	18.6	19.0	19.4	19.3	19.6	19.5
463	18.3	19.3	19.2	19.9	20.2	20.3	20.8	20.2
464	18.4	19.1	19.4	19.3	20.1	20.3	20.2	19.7
465	18.4	18.9	18.7	19.6	19.9	20.0	19.9	19.5
466	19.4	19.8	19.9	20.4	21.1	21.4	21.2	20.9
N	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	18.35	19.05	19.03	19.53	19.98	20.15	20.23	19.95
S.D.	0.59	0.46	0.57	0.55	0.67	0.73	0.64	0.54
S.E.	0.24	0.19	0.23	0.22	0.27	0.30	0.26	0.22
t'				1.5638	0.6552	0.4537	0.1686	0.0000

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 2-2-5

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylemethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Body weight ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Dibenzoylemethane 1000 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Body weight (g) on administration period (day)							Autopsy day
	1	2	3	4	5	6	7	
561	17.8	18.8	18.7	19.1	19.3	19.5	19.9	19.7
562	18.0	18.6	18.1	19.0	19.4	19.5	19.7	19.6
563	18.7	19.4	19.1	19.9	20.2	20.3	20.4	20.3
564	18.7	19.2	18.9	19.0	19.8	20.0	20.2	20.0
565	19.4	20.2	20.0	20.7	21.0	21.6	21.8	21.3
566	19.5	20.1	19.0	20.3	20.7	20.9	21.1	21.1
N	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	18.68	19.38	18.97	19.67	20.07	20.30	20.52	20.33
S.D.	0.70	0.66	0.62	0.74	0.69	0.83	0.79	0.72
S.E.	0.28	0.27	0.25	0.30	0.28	0.34	0.32	0.29
t'				1.2256	0.4504	0.7940	0.8851	0.9156

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 3-1-1

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Autopsy findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Negative control (Olive oil)

Animal No.	Findings
151	No abnormal findings
152	No abnormal findings
153	No abnormal findings
154	No abnormal findings
155	No abnormal findings
156	No abnormal findings

INDIVIDUAL DATA 3-1-2

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Autopsy findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 30 mg/kg

Animal No.	Findings
251	No abnormal findings
252	No abnormal findings
253	No abnormal findings
254	No abnormal findings
255	No abnormal findings
256	No abnormal findings

INDIVIDUAL DATA 3-1-3

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Autopsy findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 100 mg/kg

Animal No.	Findings
351	No abnormal findings
352	No abnormal findings
353	No abnormal findings
354	No abnormal findings
355	No abnormal findings
356	No abnormal findings

INDIVIDUAL DATA 3-1-4

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Autopsy findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 300 mg/kg

Animal No.	Findings
451	No abnormal findings
452	No abnormal findings
453	No abnormal findings
454	No abnormal findings
455	No abnormal findings
456	No abnormal findings

INDIVIDUAL DATA 3-1-5

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Autopsy findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 1000 mg/kg

Animal No.	Findings
551	Liver : Hypertrophy
552	Liver : Hypertrophy
553	Liver : Hypertrophy
554	Liver : Hypertrophy
555	Liver : Hypertrophy
556	Liver : Hypertrophy

INDIVIDUAL DATA 3-1-6

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylemethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Autopsy findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Positive control (EE 0.2 µg/kg)

Animal No.	Findings
651	No abnormal findings
652	No abnormal findings
653	No abnormal findings
654	No abnormal findings
655	No abnormal findings
656	No abnormal findings

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 3-2-1

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Autopsy findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg)

Animal No.	Findings
161	No abnormal findings
162	No abnormal findings
163	No abnormal findings
164	No abnormal findings
165	No abnormal findings
166	No abnormal findings

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 3-2-2

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Autopsy findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 30 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Findings
261	No abnormal findings
262	No abnormal findings
263	No abnormal findings
264	No abnormal findings
265	No abnormal findings
266	No abnormal findings

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 3-2-3

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Autopsy findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 100 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Findings
361	No abnormal findings
362	No abnormal findings
363	No abnormal findings
364	No abnormal findings
365	No abnormal findings
366	No abnormal findings

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 3-2-4

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Autopsy findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 300 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Findings
461	No abnormal findings
462	No abnormal findings
463	No abnormal findings
464	No abnormal findings
465	No abnormal findings
466	No abnormal findings

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 3-2-5

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Autopsy findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 1000 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Findings
561	Liver : Hypertrophy
562	Liver : Hypertrophy
563	Liver : Hypertrophy
564	Liver : Hypertrophy
565	Liver : Hypertrophy
566	Liver : Hypertrophy

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 4-1-1

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylemethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Absolute and relative organ weights ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Negative control (Olive oil)

Animal No.	Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)	
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
151	19.0	16.8	88.42	13.6	71.58
152	20.1	12.8	63.68	10.8	53.73
153	20.0	12.5	62.50	11.0	55.00
154	20.2	15.0	74.26	12.3	60.89
155	20.6	10.0	48.54	8.6	41.75
156	20.0	12.3	61.50	10.1	50.50
N	6	6	6	6	6
MEAN	19.98	13.23	66.483	11.07	55.575
S.D.	0.53	2.36	13.507	1.73	10.050
S.E.	0.22	0.96	5.514	0.71	4.103
M/C	3.3608	9.6331	12.1831 *	15.8396 **	15.2543 **
F	2.5041 †	32.1775 **			
H			16.2372 **	15.8053 **	15.7477 **

INDIVIDUAL DATA 4-1-2

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Absolute and relative organ weights ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Dibenzoylethane 30 mg/kg

Animal No.	Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)	
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
251	19.3	13.4	69.43	11.4	59.07
252	19.0	13.2	69.47	10.3	54.21
253	20.0	10.2	51.00	8.1	40.50
254	20.3	13.1	64.53	11.0	54.19
255	19.6	13.7	69.90	12.1	61.73
256	21.6	15.1	69.91	12.1	56.02
N	6	6	6	6	6
MEAN	19.97	13.12	65.707	10.83	54.287
S.D.	0.93	1.60	7.496	1.50	7.367
S.E.	0.38	0.65	3.060	0.61	3.008
t'	0.0312	0.0918			
U			15.0000	17.5000	17.0000

INDIVIDUAL DATA 4-1-3

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Absolute and relative organ weights ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 100 mg/kg

Animal No.	Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)	
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
351	19.6	10.7	54.59	8.9	45.41
352	19.7	13.3	67.51	10.7	54.31
353	18.7	12.0	64.17	11.0	58.82
354	20.2	13.7	67.82	11.8	58.42
355	21.5	12.8	59.53	10.0	46.51
356	21.1	13.3	63.03	11.0	52.13
N	6	6	6	6	6
MEAN	20.13	12.63	62.775	10.57	52.600
S.D.	1.03	1.11	5.048	1.00	5.736
S.E.	0.42	0.45	2.061	0.41	2.342
t'	0.2809	0.4720			
U			17.0000	15.0000	15.0000

INDIVIDUAL DATA 4-1-4

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Absolute and relative organ weights ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 300 mg/kg

Animal No.	Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)	
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
451	19.8	10.4	52.53	8.7	43.94
452	19.2	13.1	68.23	11.4	59.38
453	18.5	13.0	70.27	11.1	60.00
454	20.5	14.1	68.78	11.7	57.07
455	20.3	14.5	71.43	12.3	60.59
456	20.8	13.6	65.38	11.4	54.81
N	6	6	6	6	6
MEAN	19.85	13.12	66.103	11.10	55.965
S.D.	0.87	1.45	6.960	1.24	6.269
S.E.	0.35	0.59	2.841	0.51	2.559
t'	0.2497	0.0918			
U			15.0000	14.5000	16.0000

INDIVIDUAL DATA 4-1-5

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Absolute and relative organ weights ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 1000 mg/kg

Animal No.	Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)	
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
551	19.3	13.9	72.02	11.7	60.62
552	20.7	10.1	48.79	8.9	43.00
553	21.5	13.4	62.33	11.7	54.42
554	21.4	15.2	71.03	12.2	57.01
555	21.0	12.2	58.10	10.7	50.95
556	20.6	12.7	61.65	11.3	54.85
N	6	6	6	6	6
MEAN	20.75	12.92	62.320	11.08	53.475
S.D.	0.80	1.73	8.617	1.18	6.040
S.E.	0.33	0.70	3.518	0.48	2.466
t'	1.4357	0.2491			
U			14.0000	17.0000	17.0000

INDIVIDUAL DATA 4-1-6

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylemethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Absolute and relative organ weights ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Positive control (EE 0.2 µg/kg)

Animal No.	Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)	
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
651	17.9	24.0	134.08	22.0	122.91
652	18.2	21.3	117.03	16.9	92.86
653	18.0	31.1	172.78	28.0	155.56
654	18.9	23.9	126.46	20.4	107.94
655	19.2	23.3	121.35	20.8	108.33
656	21.2	29.3	138.21	26.8	126.42
N	6	6	6	6	6
MEAN	18.90	25.48	134.985	22.48	119.003
S.D.	1.24	3.82	20.103	4.19	21.571
S.E.	0.51	1.56	8.207	1.71	8.806
t'	2.0287	9.6358 **			
U			0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 4-2-1

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylemethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Absolute and relative organ weights ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg)

Animal No.	Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)	
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
161	19.2	66.0	343.75	58.5	304.69
162	19.3	84.2	436.27	70.8	366.84
163	20.2	119.9	593.56	81.1	401.49
164	19.3	111.3	576.68	75.7	392.23
165	19.7	83.1	421.83	74.8	379.70
166	22.0	90.9	413.18	78.8	358.18
N	6	6	6	6	6
MEAN	19.95	92.57	464.212	73.28	367.188
S.D.	1.07	19.83	99.068	8.05	34.489
S.E.	0.44	8.10	40.444	3.29	14.080
M/C	3.3684	3.6837	3.3752	1.0335	1.2127
F	3.6443 *	9.1647 **	8.8454 **	8.1306 **	8.2443 **

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 4-2-2

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylemethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Absolute and relative organ weights ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Dibenzoylemethane 30 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)	
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
261	18.1	49.1	271.27	42.0	232.04
262	18.8	66.3	352.66	57.2	304.26
263	18.4	37.0	201.09	33.4	181.52
264	19.6	69.7	355.61	60.5	308.67
265	18.8	49.7	264.36	46.5	247.34
266	19.3	47.4	245.60	41.6	215.54
N	6	6	6	6	6
MEAN	18.83	53.20	281.765	46.87	248.228
S.D.	0.55	12.40	61.170	10.25	50.148
S.E.	0.23	5.06	24.972	4.19	20.473
t'	2.6673 *	5.0103 **	4.6531 **	4.5484 **	4.2509 **

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 4-2-3

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylemethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Absolute and relative organ weights ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Dibenzoylemethane 100 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)	
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
361	19.4	96.3	496.39	80.6	415.46
362	19.9	68.5	344.22	57.3	287.94
363	19.1	71.1	372.25	60.6	317.28
364	20.3	88.2	434.48	78.1	384.73
365	20.0	71.8	359.00	64.1	320.50
366	20.8	68.4	328.85	60.9	292.79
N	6	6	6	6	6
MEAN	19.92	77.38	389.198	66.93	336.450
S.D.	0.61	11.88	63.882	9.89	51.875
S.E.	0.25	4.85	26.080	4.04	21.178
t'	0.0796	1.9324	1.9131	1.0933	1.0984

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 4-2-4

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylemethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Absolute and relative organ weights ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Dibenzoylemethane 300 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)	
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
461	19.9	68.0	341.71	58.5	293.97
462	19.5	72.5	371.79	55.6	285.13
463	20.2	84.4	417.82	76.2	377.23
464	19.7	84.0	426.40	73.0	370.56
465	19.5	69.0	353.85	60.9	312.31
466	20.9	65.8	314.83	55.8	266.99
N	6	6	6	6	6
MEAN	19.95	73.95	371.067	63.33	317.698
S.D.	0.54	8.23	43.747	9.00	45.962
S.E.	0.22	3.36	17.860	3.67	18.764
t'	0.0000	2.3694	2.3755	1.7132	1.7685

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 4-2-5

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylemethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Absolute and relative organ weights ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Dibenzoylemethane 1000 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)	
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
561	19.7	56.8	288.32	50.6	256.85
562	19.6	41.2	210.20	35.7	182.14
563	20.3	50.2	247.29	43.7	215.27
564	20.0	48.6	243.00	44.7	223.50
565	21.3	46.5	218.31	42.3	198.59
566	21.1	78.1	370.14	71.8	340.28
N	6	6	6	6	6
MEAN	20.33	53.57	262.877	48.13	236.105
S.D.	0.72	13.05	59.248	12.54	56.913
S.E.	0.29	5.33	24.188	5.12	23.235
t'	0.9156	4.9636 **	5.1348 **	4.3303 **	4.6842 **

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 5-1-1

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Histopathological findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg)

	Animal No.	161	162	163	164	165	166
Organ: Findings							
Right uterine horn: Hypertrophy, endometrium		+	+	+	+	+	+
Hypertrophy, endometrial epithelium		+	++	++	++	+	+
Vacuolation, endometrial epithelium		+	+	+	+	+	+
Mitosis, endometrial epithelium		+	+	+	+	+	+
Vacuolation, glandular epithelium		+	+	-	+	+	+
Cellular infiltration, neutrophil, endometrium		+	+	+	+	+	+
Hypertrophy, myometrium		+	++	+	+	+	+
Left uterine horn: Hypertrophy, endometrium		+	+	+	+	+	+
Hypertrophy, endometrial epithelium		+	++	++	++	+	++
Vacuolation, endometrial epithelium		+	+	+	+	+	+
Mitosis, endometrial epithelium		+	+	+	+	+	+
Vacuolation, glandular epithelium		+	-	+	-	-	-
Cellular infiltration, neutrophil, endometrium		+	+	+	+	+	+
Hypertrophy, myometrium		+	++	+	+	+	+
Uterine cervix: Thickening, squamous epithelium		++	+	+++	+++	++	+++
Keratinization, squamous epithelium		+	-	++	++	-	++
Vagina: Thickening, squamous epithelium		+++	+++	+++	+++	+++	+++
Keratinization, squamous epithelium		+++	+++	+++	+++	+++	+++

-: Normal, +: slight, ++: moderate, +++: severe change.

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 5-1-2

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Histopathological findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 30 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

	Animal No.	261	262	263	264	265	266
Organ: Findings							
Right uterine horn: Hypertrophy, endometrium		+	+	-	+	+	+
Hypertrophy, endometrial epithelium		+	+	+	++	+	+
Vacuolation, endometrial epithelium		+	+	+	+	+	+
Mitosis, endometrial epithelium		+	+	+	+	+	+
Vacuolation, glandular epithelium		+	+	+	+	+	+
Cellular infiltration, neutrophil, endometrium		-	+	-	+	-	+
Hypertrophy, myometrium		+	-	-	+	-	-
Left uterine horn: Hypertrophy, endometrium		+	+	-	+	+	+
Hypertrophy, endometrial epithelium		+	+	+	++	+	+
Vacuolation, endometrial epithelium		+	+	+	+	+	+
Mitosis, endometrial epithelium		+	+	++	-	+	+
Vacuolation, glandular epithelium		+	+	+	+	+	+
Cellular infiltration, neutrophil, endometrium		+	+	-	+	+	-
Hypertrophy, myometrium		+	-	-	+	-	-
Uterine cervix: Thickening, squamous epithelium		+	+	+	+++	++	++
Keratinization, squamous epithelium		-	-	+	++	+	+
Vagina: Thickening, squamous epithelium		+++	+++	+++	+++	+++	+++
Keratinization, squamous epithelium		+++	+++	+++	+++	+++	+++

-: Normal, +: slight, ++: moderate, +++: severe change.

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 5-1-3

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Histopathological findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 100 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

	Animal No.	361	362	363	364	365	366
Organ: Findings							
Right uterine horn: Hypertrophy, endometrium		+	+	+	+	+	+
Hypertrophy, endometrial epithelium		++	+	++	++	+	+
Vacuolation, endometrial epithelium		+	-	+	-	-	++
Mitosis, endometrial epithelium		+	+	+	+	+	-
Vacuolation, glandular epithelium		+	-	+	-	+	-
Cellular infiltration, neutrophil, endometrium		+	+	+	+	-	+
Hypertrophy, myometrium		+	+	+	+	+	-
Left uterine horn: Hypertrophy, endometrium		+	+	+	+	+	+
Hypertrophy, endometrial epithelium		++	+	+	++	+	+
Vacuolation, endometrial epithelium		+	-	+	+	+	+
Mitosis, endometrial epithelium		+	+	+	+	++	-
Vacuolation, glandular epithelium		+	-	+	-	+	+
Cellular infiltration, neutrophil, endometrium		+	+	+	+	+	+
Hypertrophy, myometrium		+	+	+	+	+	-
Uterine cervix: Thickening, squamous epithelium		+++	++	++	+++	+	+
Keratinization, squamous epithelium		++	+	+	++	-	+
Vagina: Thickening, squamous epithelium		+++	+++	+++	+++	+++	+++
Keratinization, squamous epithelium		+++	+++	+++	+++	+++	+++

-: Normal, +: slight, ++: moderate, +++: severe change.

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 5-1-4

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Histopathological findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Dibenzoylethane 300 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

	Animal No.	461	462	463	464	465	466
Organ: Findings							
Right uterine horn: Hypertrophy, endometrium		+	+	+	+	+	+
Hypertrophy, endometrial epithelium		+	++	++	++	+	+
Vacuolation, endometrial epithelium		+	-	+	+	+	+
Mitosis, endometrial epithelium		+	+	+	+	+	+
Vacuolation, glandular epithelium		-	+	+	-	+	+
Cellular infiltration, neutrophil, endometrium		+	+	+	+	+	+
Hypertrophy, myometrium		+	+	+	-	-	+
Left uterine horn: Hypertrophy, endometrium		+	+	+	+	+	+
Hypertrophy, endometrial epithelium		+	++	++	++	+	+
Vacuolation, endometrial epithelium		+	+	+	+	+	+
Mitosis, endometrial epithelium		+	+	-	-	+	+
Vacuolation, glandular epithelium		+	-	+	+	+	+
Cellular infiltration, neutrophil, endometrium		+	+	+	+	+	+
Hypertrophy, myometrium		+	+	+	-	-	+
Uterine cervix: Thickening, squamous epithelium		+++	+++	+++	+++	+	-
Keratinization, squamous epithelium		++	++	+	++	-	-
Vagina: Thickening, squamous epithelium		+++	+++	+++	+++	+++	+++
Keratinization, squamous epithelium		+++	+++	+++	+++	+++	+++

-: Normal, +: slight, ++: moderate, +++: severe change.

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 5-1-5

STUDY NO. SR09134 TITLE : Dibenzoylmethane Uterotrophic bioassay (s.c.)

Histopathological findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Dibenzoylmethane 1000 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

	Animal No.	561	562	563	564	565	566
Organ: Findings							
Right uterine horn: Hypertrophy, endometrium		+	-	-	-	-	+
Hypertrophy, endometrial epithelium		+	-	+	+	+	+
Vacuolation, endometrial epithelium		++	+	+	+	+	+
Mitosis, endometrial epithelium		-	+	-	+	-	++
Vacuolation, glandular epithelium		+	+	+	+	+	+
Cellular infiltration, neutrophil, endometrium		-	-	-	-	-	-
Hypertrophy, myometrium		-	-	-	-	-	+
Left uterine horn: Hypertrophy, endometrium		+	-	-	-	-	+
Hypertrophy, endometrial epithelium		+	-	+	+	+	+
Vacuolation, endometrial epithelium		+	+	++	+	+	+
Mitosis, endometrial epithelium		+	-	+	+	-	++
Vacuolation, glandular epithelium		+	+	+	+	+	+
Cellular infiltration, neutrophil, endometrium		-	-	-	-	+	+
Hypertrophy, myometrium		-	-	-	-	-	+
Uterine cervix: Thickening, squamous epithelium		+	+	+	-	-	+
Keratinization, squamous epithelium		+	+	+	-	-	+
Vagina: Thickening, squamous epithelium		+++	+++	+++	+++	+++	+++
Keratinization, squamous epithelium		+++	+++	+++	+++	+++	+++

-: Normal, +: slight, ++: moderate, +++: severe change.

EE: Ethynyl Estradiol.

試験成績書

1/1 ページ

試験成績書

2009年10月09日

製品名: 1,3-Diphenyl-1,3-propanedione					
製品コード:		等級: GR	製品ロット:		判定: 合格
項目	結果		規格値		
純度(GC)	99.9 %		98.0 %以上		
純度(中和滴定)	99.5 %		98.0 %以上		
融点	78.4 deg-C		77.0 ~ 80.0 deg-C		
熱メタノール溶状	澄明		ほとんど澄明以内		

2009/10/09