

2. 皮膚および眼に対する刺激性

(1) ベンスルタップ原体のウサギを用いた皮膚刺激性試験

(資料 2)

試験機関：武田薬品工業株式会社

報告書作成年：1978年

検体：ベンスルタップ原体

検体純度：

供試動物：白色雄性ウサギ、1群6匹、体重：2.7～3.1 kg

観察期間：48時間

投与方法：動物の背部を刈毛し、4 cm × 4 cm の部位を左右各2区ずつ計4区に分け、対角線的2区分には#桁状の擦り傷をつけた。検体を1区当たり0.5 g ずつ4 cm × 4 cm のリント布に塗布した白色ワセリン上に分散させ、無傷皮膚および有傷皮膚に4時間閉塞適用した。適用後リント布を取り除き、皮膚に残った検体は水で清拭した。

観察項目：適用終了直後、適用開始後24、48時間に適用部分の刺激性変化（紅斑、痂皮、浮腫）の有無等を観察し、FDAのTest for Primary Irritantsの評価基準（別添）に従って採点した。

結果：観察した刺激性変化の採点を次頁の表に示した。

無傷皮膚および有傷皮膚のいずれにも紅斑、痂皮および浮腫のような刺激反応は生じなかった。

以上の結果から、ベンスルタップ原体はウサギの皮膚に対して、刺激性はないと結論した。

適用部位	動物番号	項目	最高評点	適用後時間		
				4時間	24時間	48時間
無傷皮膚	1	紅斑・痂皮	4	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0
	2	紅斑・痂皮	4	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0
	3	紅斑・痂皮	4	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0
	4	紅斑・痂皮	4	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0
	5	紅斑・痂皮	4	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0
	6	紅斑・痂皮	4	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0
	小計	紅斑・痂皮	24	0	0	0
		浮腫	24	0	0	0
平均	紅斑・痂皮	4	0	0	0	
	浮腫	4	0	0	0	
有傷皮膚	1	紅斑・痂皮	4	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0
	2	紅斑・痂皮	4	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0
	3	紅斑・痂皮	4	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0
	4	紅斑・痂皮	4	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0
	5	紅斑・痂皮	4	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0
	6	紅斑・痂皮	4	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0
	小計	紅斑・痂皮	24	0	0	0
		浮腫	24	0	0	0
平均	紅斑・痂皮	4	0	0	0	
	浮腫	4	0	0	0	
合計*	紅斑・痂皮	48	0	0	0	
	浮腫	48	0	0	0	
平均*	紅斑・痂皮	4	0	0	0	
	浮腫	4	0	0	0	

* 無傷皮膚と有傷皮膚を合わせた合計および平均

[別添]

FDA の皮膚刺激性変化の評価基準

	評点
(1) 紅斑および痂皮の形成	
紅斑なし	0
非常に軽度な紅斑 (かろうじて識別できる)	1
はっきりした紅斑	2
中等度ないし高度紅斑	3
高度紅斑 (beet redness) からわずかな痂皮の形成 (深部損傷) まで	4
最高評点	4
(2) 浮腫の形成	
浮腫なし	0
非常に軽度な浮腫 (かろうじて識別できる)	1
軽度浮腫 (はっきりした膨隆による明確な縁が識別できる)	2
中等度浮腫 (約 1 mm の膨隆)	3
高度浮腫 (1 mm 以上の膨隆と暴露範囲を超えた広がり)	4
最高評点	4

(2) ベンスルタッフ原体のウサギを用いた眼刺激性試験

(資料 2)

試験機関：武田薬品工業株式会社

報告書作成年：1978年

検体：ベンスルタッフ原体

検体純度：

供試動物：白色雄性ウサギ、体重：2.8～3.2 kg、1群3～5匹

観察期間：72時間（第1群）または7日間（第2群）

投与方法：検体容積約0.1 mL（約50 mg）を右眼に適用し、第1群は5分後、第2群は24時間後に300 mLの生理食塩液を用いて2分間洗眼した。左眼は無処置対照とした。

観察項目：第1群は洗浄後1*、24、48、72*時間に、第2群は適用後1、24*、48、72*時間および7日に角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察し、FDAのEye Irritation Test for Hazardous Substances（別添-1）に従って採点および程度分けをした。また、「*」を付した時点ではフルオレセインナトリウム液を点眼して角膜損傷の有無を調べ、FDAのIrritation Test for Hazardous Substancesの評価基準（別添-2）に従って採点し、刺激性の程度を分類した。

結果：観察した刺激性変化の採点を次表に示した。

群	刺激性変化	最高 評点	適用後時間					
			1時間	24時間	48時間	72時間	7日	
5分後 洗眼群 (5匹平均)	角膜混濁	4	0.2	0.2	0	0	—	
	虹彩	2	0	0	0	0	—	
	結膜	発赤	3	1.6	1.8	1	0	—
		浮腫	4	2	1.2	0.2	0	—
	合計	13	3.8	3.2	1.2	0	—	
24時間後 洗眼群 (3匹平均)	角膜混濁	4	0	0	0	0	0	
	虹彩	2	0	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	1	1	0.67	0.33	0
		浮腫	4	2	0.33	0	0	0
	合計	13	3	1.33	0.67	0.33	0	

判定

群	5分後洗眼群			24時間後洗眼群			
	24時間	48時間	72時間	24時間	48時間	72時間	7日
刺激性	4/5 (+)	1/5 (-)	0/5 (-)	0/3 (-)	0/3 (-)	0/3 (-)	0/3 (-)
腐食性	0/5 (-)	0/5 (-)	0/5 (-)	0/3 (-)	0/3 (-)	0/3 (-)	0/3 (-)
結果の分類	刺激性			陰性			

5分後洗眼群では適用後1時間に、5/5例の結膜に評点1~2の発赤および評点1~3の浮腫が認められた。適用後24~48時間にも評点1~2の発赤が認められたが、72時間には消失した。浮腫は24時間に4/5例で評点1~2程度のものが見られたが、72時間^{申請者注1}には消失した。3/5例では24時間でも薬物の残留が認められ、検体は洗い流しにくいことがわかった。

24時間後洗眼群では、適用後1時間に3/3例の結膜にのみ評点1~2の刺激性変化が見られたが、24~72時間には評点1程度であった。

以上の結果から、ペンスルタップ原体はウサギの眼粘膜に対して軽度の刺激性が認められた^{申請者注2}。

申請者注1：報告書 p. 3 では48時間となっているが、Table 5によれば動物 No. 3 に浮腫を認めており、72時間に消失している。

申請者注2：Kay & Calandra の評価基準¹⁾に従うと、5分後洗眼群および24時間後洗眼群とも『軽度の刺激性あり』に分類されるため、本剤はウサギの眼に対して軽度の刺激性ありと判断した。また、5分後洗眼群は24時間後洗眼群に比べ、明らかな反応の低減が認められなかったことから、洗眼効果はないと判断した。

1) J. H. Kay, and J. C. Calandra, Journal of the society of cosmetic chemists, 13: 281-289, 1962.

[別添-1] FDA の眼刺激性変化の評価基準

角膜：	評点
潰瘍形成または混濁なし	0
虹彩の細部が十分観察できる程度の散在からびまん性の混濁	1 ¹⁾
不透明領域が容易に識別でき、虹彩の細部がわずかにぼやけて見える	2 ^{1) 2)}
乳白化、虹彩の細部が観察できないが、瞳孔の大きさはかろうじて識別できる	3 ^{1) 2)}
完全な角膜混濁、虹彩の識別不能	4 ^{1) 2)}
潰瘍形成、角膜上皮の斑点識別不能	4 ²⁾
虹彩：	
正常	0
明らかな深い皺、うっ血、腫張、中等度の角膜周囲の充血（これらのいずれか、またはそのいずれかの組み合わせ）を認めるが、虹彩にまだ光反応はある（緩徐反応陽性）	1 ¹⁾
光反応なし、出血、肉眼的に破壊あり（これらのいずれかまたはすべて）	2 ¹⁾
結膜：	
発赤（角膜および虹彩を除く眼瞼結膜、眼球結膜を参照）：	
血管は正常	0
一部血管に明らかな充血	1
びまん性の深紅色となり、個々の血管の識別困難	2 ¹⁾
びまん性の牛肉様赤色	3 ¹⁾
浮腫：	
腫脹なし	0
正常よりもいくぶん腫脹（瞬膜を含む）	1
眼瞼の一部が外反する明らかな腫脹	2 ¹⁾
眼瞼の約半分が閉じる腫脹	3 ¹⁾
半分以上の眼瞼を閉じる腫脹	4 ¹⁾
眼瞼および眼球結膜または瞬膜の潰瘍または壊死	4 ²⁾

1) 刺激性陽性と判断した。

2) 腐食性陽性と判断し、評点1の混濁が6日以上 of 明白な場合も腐食性と判断する。

[別添-2] FDA の刺激性の程度分類

区分	眼の反応	第1群 (5分間曝露)	第2群 (24時間曝露)	
1. 陰性	混濁、虹彩炎または結膜炎なし	1~7日陰性	1~7日陰性	(-)
2. わずか	第1群の眼で概ね評点1の発赤または浮腫	第1群の眼で概ね評点1の発赤または浮腫	24時間陽性、48時間に正常に回復	(±)
3. 刺激性	主として結膜炎—評点2以上の発赤または浮腫	24時間陽性、72時間に正常に回復	24時間陽性、72時間に正常に回復	(+)
4. 強度の刺激性	虹彩炎および結膜炎	24時間陽性、72時間にすべての眼が正常に回復	24時間陽性、7日に正常に回復	(++)
5. 極度刺激性および/または腐食性	虹彩炎および結膜炎	24時間陽性、72時間に1匹以上でまだ陽性	24時間陽性、7日に1匹以上でまだ陽性	(+++)
	混濁および/または潰瘍	陽性	陽性	

3. 皮膚感作性

ベンスルタッフ原体のモルモットを用いた皮膚感作性試験

(資料 3)

試験機関：(株) 臨床医科学研究所

報告書作成年：1983年

検体：ベンスルタッフ原体

検体純度：

供試動物：Hartley系雄モルモット、投与開始時体重300～450g、1群10～20匹

観察期間：感作開始後24日間

試験操作：[Maximization法]

投与量設定根拠：

感作；一次感作（皮内）

動物の上背部を4×6cmの大きさに刈毛・剃毛し、両側6カ所にそれぞれ以下に示す3対の皮内注射（0.05 mL/カ所）を行った。

上部：水と Freund's complete adjuvant (FCA) の1:1混合液

中央部：検体の1%パラフィンオイル懸濁液あるいは陽性対照2,4-ジニトロクロロベンゼン (DNCB) の0.1%エタノール (40%) 溶液

下部：検体を1%含む水と Freund's complete adjuvant (FCA) の1:1混合液あるいは0.1% DNCB エタノール (40%) 溶液と FCA との1:1混合液
対照群（検体対照群および DNCB 対照群）には投与液に検体あるいは DNCB を含まないことを除き、上記と同様に処置した。

二次感作（経皮）

一次感作の7日後、上背部に検体の1%パラフィンオイル懸濁液あるいは0.1% DNCB エタノール (40%) 溶液をそれぞれ0.5 mL ずつ含ませたリント布（2 cm × 2 cm）を48時間閉塞貼付した。対照群にはパラフィンオイルあるいはエタノール (40%) 溶液を含ませたリント布を用いて同様に処置した。なお、検体処理群および検体対照群には、一次感作の6日後に10%ラウリル硫酸ナトリウム含有白色ワセリン0.5 gを24時間塗布した。

惹起；二次感作の2週間後、左右腹側を5×5 cmの大きさに刈毛・剃毛し、検体処理群および検体対照群には、右腹側部にパラフィンオイル、左腹側部に検体の1%パラフィンオイル懸濁液、DNCB 群および DNCB 対照群には右腹側部にエタノール

(40%) 溶液、左腹側部に 0.1% DNCB エタノール (40%) 溶液をそれぞれ 0.5 mL ずつ含ませたリント布 (2 × 2 cm) を 24 時間閉塞貼付した。

観察項目：惹起貼付除去後 24 時間および 48 時間に貼付部位の紅斑および浮腫の有無等を肉眼的に観察して、以下の基準に従って採点した。

評点	判定基準
0	無反応
1	まばらな軽い紅斑
2	中等度の紅斑
3	強度の紅斑および浮腫

検体適用部分 (左側) の評点が溶媒適用部分 (右側) の評点より大きい動物を陽性として陽性反応を示した動物の比率 (陽性率) から下表に従って皮膚感作性の強さを評価した。

Maximization 法の感作性分類

陽性率 (%)	感作程度	分類
0 - 8	A	弱い
9 - 28	B	軽度
29 - 64	C	中等度
65 - 80	D	強度
81 - 100	E	極めて強度

全動物について、実験期間中毎日一般症状を観察し、2 日に 1 回体重を測定した。

結果：各観察時間における感作変化が認められた動物数を次頁の表に示した。

検体処理群 20 例では、惹起後 24 時間に 1 例、48 時間に 2 例で評点 1 の軽度の紅斑が認められた。

一方、陽性対照の DNCB 群 10 例では、惹起後全例に評点 2~3 の強い皮膚反応を認めた。DNCB 対照群において、惹起後 24 時間のみ 10 例中 1 例に DNCB の一次刺激によると思われる評点 1 の紅斑がみられた。

体重変化では、検体処理群、検体対照群および DNCB 群において二次感作後の一時的な体重減少が認められたが、その後の体重増加はいずれの群でも殆ど差がなかった。試験期間を通じていずれの群でも一般症状に検体投与による異常は認められなかった。

以上の結果から、ペンスルタップ原体は軽度の皮膚感作性を有すると判断した。

試験結果

群		供 試 動 物 数	感作反応動物数										陽性率 (%)		分 類	
			24 時間後					48 時間後					時間			
感作	惹起		皮膚反応評点					皮膚反応評点					時間			
			0	1	2	3	計	0	1	2	3	計	24	48		
検 体	1%検体	1%検体	20	19	1	0	0	1/20	18	2	0	0	2/20	5	10	B
	溶媒	1%検体	10	10	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0/10	0	0	-
陽 性 対 照	0.1% DNCB	0.1%DNCB	10	0	0	8	2	10/10	0	1	5	4	10/10	100	100	E
	溶媒	0.1%DNCB	10	9	1	0	0	1/10	10	0	0	0	0/10	10	0	-

検体：ペンシルタツプ原体

4. 急性神経毒性

ベンスルタップ原体のラットを用いた急性経口投与神経毒性試験

(資料 4)

試験機関：Charles River Discovery and Development
Services, Argus Division
[GLP 対応]

報告書作成年：2005 年

検体：ベンスルタップ原体

検体純度：

供試動物：Sprague-Dawley 系ラット、一群雌雄各 10 匹、

投与時週齢；約 7 週齢、体重；雄 184～239 g、雌 146～188 g

観察期間：14 日間（投与日を試験 1 日とし、試験 15 日まで観察）

投与方法：検体を 0.5% (w/w) カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁して 0、35、140 および 560 mg/kg の投与量で、ラットの胃内に単回強制経口投与した。

560 mg/kg 投与群の雄で多数の死亡が認められたため、0 mg/kg と 350 mg/kg（各群雄 10 匹）の追加投与を実施した。投与液量は 5 mL/kg とした。

投与量設定根拠；

観察・検査項目および結果：

死亡率；生死を毎日観察した。

試験終了時の死亡率を下表に示す。

投与量 (mg/kg)		0	35	140	350*	560
死亡率 (%)	雄	0	0	0	0	↑ 50
	雌	0	0	0		10

二項分布の均一性に関する分散分析法：↑； $p \leq 0.01$

*：追加試験群

560 mg/kg 投与群で認められた死亡は、検体投与に関連すると考えられた。

一般状態；一般状態を毎日観察した。
認められた症状を次表に示す。

性別	雄				雄*		雌			
	0	35	140	560	0	350	0	35	140	560
投与量 (mg/kg)	0	35	140	560	0	350	0	35	140	560
症状\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
間代性痙攣	0	0	0	↑ 4	0	0	0	0	0	0
振戦	0	0	1	↑ 8	0	0	0	0	1	↑ 6
異常発声	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
後方突進	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
口周囲の赤色物	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
過剰な流涎	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0

表中の数値は所見を有する動物数

二項分布の均一性に関する分散分析法：↑； $p \leq 0.01$

*：追加試験群

投与に関連した症状として、560 mg/kg 投与群の雄で間代性痙攣、雌雄で振戦が有意な高値を示した。また振戦は 140 mg/kg 投与群の雌でも認められた。さらに、560 mg/kg 投与群の雄で異常発声、後方突進、口周囲の赤色物および過剰な流涎が認められた。

140 mg/kg 投与群の雄で振戦および 35 mg/kg 投与群の雌で過剰な流涎が認められたが、350 mg/kg 投与群の雄および 140 mg/kg 投与群の雌では振戦あるいは過剰な流涎は認められなかった。したがって、これらの所見は用量依存性がなく、1例のみの発現であることから、検体投与に関連しないと考えられた。

体重変化；全動物の体重を観察期間中、毎日測定した。

観察期間中の各投与群の体重値を次表に示す。

性別	投与量 (mg/kg)	試験日							
		1	2	3	4	5	6	7	8
雄	35	98	98	99	98	99	99	99	100
	140	98	97	98	98	99	99	99	100
	350	101	97	97	98	98	98	98	97
	560	98	92	↓ 84	↓ 86	↓ 89	↓ 89	↓ 89	90
雌	35	99	98	97	99	98	98	97	99
	140	98	98	96	97	97	96	97	96
	560	97	95	92	92	94	94	94	94

性別	投与量 (mg/kg)	試験日						
		9	10	11	12	13	14	15
雄	35	99	100	99	100	100	99	100
	140	98	100	100	99	100	99	100
	350	98	98	98	98	98	99	99
	560	↓ 89	↓ 90	↓ 91	↓ 90	↓ 90	↓ 90	91
雌	35	97	97	97	98	98	96	97
	140	95	96	96	96	96	95	95
	560	93	94	93	94	95	93	95

表中の数値は変動の目安として対照群または追加試験対照群を 100 とした場合の値を表したもの

Dunnett、Dunn あるいは Fisher 検定 : ↓ ; $p \leq 0.05$ 、↓ ↓ ; $p \leq 0.01$

体重値は、560 mg/kg 投与群の雄で統計学的に有意な低値が認められ、560 mg/kg 投与群の雌でも統計学的に有意ではなかったものの低値傾向を示した。また体重増加量では、350 mg/kg 投与群の雄および 560 mg/kg 投与群で試験 2~3 日に有意な低下が認められた。

これらの体重変化は検体投与に関連すると判断した。

140 mg/kg 以下の投与群では体重値および体重増加量に影響は認められなかった。

摂餌量 ; 全動物の摂餌量を観察期間中、毎日測定した。

観察期間中の各投与群の絶対摂餌量を次表に示す。

性別	投与量 (mg/kg)	試験日						
		1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8
雄	35	95	100	96	100	104	101	102
	140	↓ 87	105	104	106	106	98	106
	350	↓ 69	↓ 87	105	99	100	95	99
	560	↓ 57	↓ 38	69	98	105	89	98
雌	35	91	100	104	93	100	91	105
	140	89	95	97	92	92	96	98
	560	↓ 64	↓ 54	↓ 76	103	102	99	104

性別	投与量 (mg/kg)	試験日							平均
		8-9	9-10	10-11	11-12	12-13	13-14	14-15	
雄	35	98	99	96	106	97	100	103	100
	140	94	114	104	101	99	95	100	101
	350	100	103	100	98	96	101	100	97
	560	87	105	110	102	91	102	94	↓ 89
雌	35	91	98	95	98	105	96	98	97
	140	85	97	93	94	86	87	96	↓ 92
	560	88	97	88	90	93	92	98	↓ 89

表中の数値は変動の目安として対照群または追加試験対照群を 100 とした場合の値を表したもの

Dunnett、DunnあるいはFisher検定：↓； $p \leq 0.05$ 、↓↓； $p \leq 0.01$

絶対摂餌量は、140 mg/kg 投与群および 350 mg/kg 投与群の雄と 560 mg/kg 投与群において試験 1~4 日に有意な低値が認められた。140 mg/kg 投与群の雌における試験 1~15 日の平均絶対摂餌量の有意な低値は、試験期間を通しての継続的な摂餌の低値を反映した変化であると考えられた。また、体重当りの相対摂餌量では、560 mg/kg 投与群の雌では絶対摂餌量の低値に関連して有意な低値を示したが、雄では体重低値を反映して有意な高値が散見された。これらの摂餌量への影響は検体投与に関連すると判断した。

140 mg/kg 投与群の雄で認められた有意な相対摂餌量の高値は、単発的に発現したことおよび試験期間を通しての摂餌量に影響がなかったことから、毒性学的意義はないものと判断した。35 mg/kg 以下の投与群では、摂餌量に影響は認められなかった。

詳細な症状の観察を含む総合機能観察 (FOB)；全ての動物について、投与前 1 回と投与後 1 時間、さらに試験 8 日および 15 日に、盲検化して FOB を実施した。観察は以下の項目を対象に実施した。

詳細な症状の観察

一般状態 (皮膚、被毛、眼、眼球および粘膜の変化、分泌物の有無等)、体位および姿勢 (円背位等)、自律神経系機能 (流涙、立毛、瞳孔径、呼吸状態、排泄状態等)、運動協調性、歩行の異常、取扱操作および環境刺激に対する反応、神経系 (振戦、痙攣、筋収縮性等)、探索行動の変化、常同行動 (身づくろいの変化、首振り、旋回等)、異常行動 (自咬、後ずさり、異常発声等)、攻撃性

FOB 項目

自律神経機能：流涙、流涎、眼瞼閉鎖、眼球突出、瞳孔反射、立毛、呼吸、排尿、排糞

反応性および感受性：視覚、聴覚、触覚および痛覚刺激に対する感覚運動反応

興奮性：ハンドリングに対する反応およびオープンフィールドでの行動

歩行および感覚運動協調性：オープンフィールドでの歩行状態、歩行異常、空中立ち直り反応、位置視覚反応、着地開脚幅、前肢および後肢握力

その他：痙攣、振戦、異常行動、筋緊張、削瘦、脱水、被毛、眼/鼻/口周囲の付着物、その他の異常な症状

投与に関連していると考えられた症状の発現頻度および対照群と比較して統計学的有意差が認められた定量的評価項目を次表に示す。

用量 (mg/kg)		0			35			140			560			0*			350*		
検査時期 (日)		1	8	15	1	8	15	1	8	15	1	8	15	1	8	15	1	8	15
雄	振戦/痙攣 ^a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	↑2	0	0	0	0	0	0	0	0
	振戦/痙攣 ^b	0	0	0	0	0	0	1	0	0	↑6	0	0	0	0	0	0	0	0
	立ち上がり回数 ^b	-	-	-	108	78	100	90	94	71	↓18	90	71	-	-	-	66	108	98
	運動失調 ^b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	↑2	0	0	0	0	0	0	0	0
	流涎 ^b	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	2	0	1
	着地開脚幅	-	-	-	95	103	100	97	107	102	97	122	↑126	-	-	-	↓77	89	92
雌	振戦/痙攣 ^b	0	0	0	0	0	0	1	0	0	↑5	0	0						
	流涎 ^b	0	0	1	0	0	0	0	0	0	↑5	0	0						

表中の数値は所見を有する動物数。ただし、立ち上がり回数、着地開脚幅については表中の数値は変動の目安として対照群または追加試験対照群を 100 とした場合の値を表したもの

a: ホームケージ観察 b: オープンフィールド観察

*: 追加試験群

二項分布の均一性に関する分散分析法: ↑↓; p ≤ 0.05, ↑; p ≤ 0.01

投与後 1 時間の観察では、560 mg/kg 投与群において振戦/痙攣および雄の運動失調が有意な高値を示し、雄の立ち上がり回数は有意な低値を示した。また、流涎の平均スコアは、雌で有意な高値を示し、雄では有意差はなかったものの 3 例で過剰な流涎が認められた。振戦は 140 mg/kg 投与群の雌でも 1 例認められた。これらの影響は用量依存性であったことから、投与に関連すると考えられた。

350 mg/kg および 560 mg/kg 投与群の雄で試験 1 あるいは 15 日に認められた着

地開脚幅の有意な変化は、用量依存性ではないこと、投与前の値と同等であったこと、また後肢の神経に病理学的影響が無かったことなどから、生物学的意義はないと考えられた。

試験 8 日および 15 日の観察において、投与に関連すると考えられる詳細な症状の観察および FOB の変化は認められなかった。

自発運動量；全動物について投与前 1 回と投与後 1 時間、さらに試験 8 日および 15 日について、FOB 終了後、自発運動量（移動回数および移動時間）を 1.5 時間（5 分間隔で 18 ブロック）測定した。

対照群と比較して統計学的有意差が認められた、投与後 1 時間の雄における移動時間を次表に示す。

性別	雄					
	0	35	140	560	0*	350*
測定時点\投与量 (mg/kg)						
測定開始-5 分	137.3	138.9	124.8	↓ 40.8	183.3	154.8
測定開始後 5-10 分	143.3	171.1	151.4	↓ 55.8	144.2	↓ 88.0
測定開始後 10-15 分	128.5	132.6	136.3	↓ 36.7	120.5	62.8
測定開始後 15-20 分	90.3	109.2	95.3	66.2	109.1	↓ 20.9
測定開始後 20-25 分	56.9	55.4	47.1	15.2	92.9	↓ 13.4
測定開始後 25-30 分	30.5	44.2	19.0	24.8	77.7	↓ 13.3
測定開始後 30-35 分	32.0	14.3	23.1	5.7	79.7	↓ 38.7
測定開始後 35-40 分	8.3	6.2	19.8	8.5	49.5	17.2
測定開始後 40-45 分	1.2	14.9	19.8	14.7	40.1	57.2
測定開始後 45-50 分	1.6	7.3	13.4	16.0	19.4	42.4
測定開始後 50-55 分	0.4	7.3	1.8	↑ 20.8	8.4	34.7
測定開始後 55-60 分	1.6	8.5	1.4	7.3	6.0	↑ 52.5
測定開始後 60-65 分	1.0	5.7	5.1	18.8	9.5	19.1
測定開始後 65-70 分	1.5	5.1	24.6	10.0	1.3	17.2
測定開始後 70-75 分	2.4	6.4	17.8	5.7	5.2	12.1
測定開始後 75-80 分	0.7	16.4	8.6	16.3	1.9	3.9
測定開始後 80-85 分	2.9	10.1	10.9	↑ 42.8	3.2	2.7
測定開始後 85-90 分	1.2	5.4	8.9	13.3	3.2	3.2
90 分間合計	641.6	759.0	729.1	419.5	955.1	↓ 654.1

表中の数値は実測値（秒）で示したもの

反復測定分散分析/Dunnett 検定：↑↓； $p \leq 0.05$ 、↓； $p \leq 0.01$

*：追加試験群

投与後 1 時間の観察時における自発運動量測定の結果、350 および 560 mg/kg 投

与群の雄において移動時間の有意な低値が認められた。この変化は、用量依存性であったことから投与に関連すると考えられた。

350 および 560 mg/kg 投与群の雄で認められた有意な高値は、散発的であることから検体には関連しないと考えられた。また、いずれの投与群でも移動回数に有意差は認められなかった。

試験 1 日の雌と試験 8 日および 15 日の雌雄では、投与に関連すると考えられる自発運動量測定における移動回数または移動時間の変化は認められなかった。

肉眼的病理検査；途中死亡動物および試験終了時の全生存動物については剖検を行った。剖検では各個体の全身を詳細に観察し、肉眼的異常を記録した。いずれの投与群においても検体投与に起因する異常は認められなかった。

脳重量；剖検に供した全ての動物の頭部を 24 時間以上固定液に浸漬した後に、頭蓋骨から脳を取り出して重量を測定した。

対照群と比較して統計学的有意差が認められた項目を次表に示す。

性別	雄				雌		
	35	140	560	350*	35	140	560
投与量 (mg/kg)	35	140	560	350*	35	140	560
最終体重	96	98	90	100	98	97	94
絶対脳重量	↓ 92	↓ 95	99	100	↓ 93	↓ 88	96
相対脳重量	97	96	↑ 110	100	94	↓ 90	101

表中の数値は変動の目安として対照群または追加試験対照群を 100 とした場合の値を表したもの

Dunnett 検定：↑↓； $p \leq 0.05$ 、↓↓； $p \leq 0.01$

*：追加試験群

脳重量は 35 および 140 mg/kg 投与群で有意な低値を示したが、用量依存性ではなかったことおよび固定時間が対照群および高用量群よりも長かったことに関連すると推測されることから、検体投与とは無関係であると考えられた。同じく 140 mg/kg 投与群の雌では最終体重に対する脳重量の割合の有意な低値を示したが、前述の脳重量の低値および体重が同等であったことを反映するものであり、検討投与とは無関係であると考えられた。また、560 mg/kg 投与群の雄では最終体重に対する脳重量の割合の有意な高値を示したが、脳重量が同等であったことおよび体重が低かったことを反映するものであり、体重増加量等に関連する二次的变化であると考えられた。

病理組織学的検査；対照群および 560 mg/kg 投与群の各性 5 例から採取した下記に示す組織を対象にして病理組織学的検査を実施した。検査対象とする動物は、

詳細な症状の観察およびFOBで異常または症状が認められた動物から選択した。動物は全身灌流固定した。

脳（前脳および海馬を含む大脳中央部、中脳、小脳、脳橋および延髄）、眼球（視神経および網膜を含む）、脊髄頸部・胸部・腰部（頸膨大部、腰部膨大部、腹根および背根の神経節と神経根を含む）、三叉神経節（脊髄神経節）、坐骨神経（近位部）、脛骨神経（近位部、膝部および腓腹筋分岐部）腓骨神経および腓腹神経、骨格筋（腓腹筋）

検査の結果、いずれの組織にも検体投与に起因する病変は認められなかった。

以上の結果から、検体のラットに対する急性経口投与神経毒性試験における影響として、140 mg/kg 投与群では雌雄に摂餌量の低値、雌に神経症状（振戦）、雄のみに設定した350 mg/kg 投与群では体重低値、摂餌量の低値および自発運動量の変化、560 mg/kg 投与群では雌雄に死亡および神経症状（振戦、流涎等）、体重低値、摂餌量の低値、機能観察総合評価における変化（振戦/痙攣、立ち上がり回数の低値等）ならびに雄の自発運動量の低値が認められた。対照群および560 mg/kg 投与群について実施した神経組織学的検査では、検体投与に関連した変化は認められなかった。

したがって、ベンスルタップ原体の本試験における無毒性量は、雌雄とも35 mg/kg/日であると判断された。

5. 亜急性毒性

(1) ベンスルタップ原体のラットを用いた飼料混入による3ヵ月間反復経口投与毒性試験
(資料 5-1)

試験機関：(株)臨床医科学研究所
報告書作成年：1983年

検体：ベンスルタップ原体

検体純度：

供試動物：Sprague Dawley系ラット、1群雌雄各20匹、投与開始時週齢；5週齢、
投与開始時体重；雄 平均113.7g、雌 平均104.3g

投与期間：96または97日間（1982年7月22日～1982年10月26日）

投与方法：検体を0、250、1000および2000ppmの濃度で飼料に混入し、96または97日間
にわたって随時摂食させた。飼料調製は2週間に1回行った。

投与量設定根拠；

観察・検査項目および結果：

一般状態および死亡率；毎日1回、一般症状と死亡を観察した。

対照群およびすべての検体投与群に死亡は認められなかった。

投与開始後12～13週に2000ppm群雄に被毛の粗剛な例が散見され、試験終了時に2000ppm群雌雄に耳介の貧血（pale ear）が認められた。

体重変化；毎週1回、全動物の体重を測定した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた時期の概要を次表に示した。

性別	雄			雌		
	250	1000	2000	250	1000	2000
1週	101	99	↓↓ 92	98	96	↓ 94
5週	96	↓ 93	↓↓ 78	98	↓ 94	↓↓ 87
9週	98	↓ 93	↓↓ 78	97	↓ 94	↓↓ 87
13週	98	93	↓↓ 78	97	↓ 94	↓↓ 86

Studentのt検定 ↓：p < 0.05、↓↓：p < 0.01、↓↓↓：p < 0.001

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値

全試験期間を通じ、1000、2000ppm群に用量依存的な体重増加の抑制が認められた。2000ppm群の体重増加抑制は、摂餌量低下による二次的変化と考えられた。250ppm群では有意差は認められなかった。

摂餌量および摂餌効率；毎週 2 回全動物の摂餌量を測定し、1 匹あたりの 1 日平均飼料
 摂取量を算出した。摂餌効率は 2 週間ごとに算出した。
 摂餌量に对照群と比べ統計学的有意差の認められた時期の概要を次表に示した。

性別	雄			雌			
	投与群 (ppm)	250	1000	2000	250	1000	2000
4 日		↓ 94	↓ 93	↓↓ 84	97	97	↓↓ 86
32 日		↓ 90	↓↓ 90	↓↓ 74	102	100	↓↓ 85
60 日		↓ 92	↓↓ 91	↓↓ 82	101	99	↓ 89
91 日		96	97	↓ 88	108	106	97

Student の t 検定 ↓ : $p < 0.05$ 、↓↓ : $p < 0.01$ 、↓↓↓ : $p < 0.001$
 表中の数値は変動の目安として对照群を 100 とした場合の値

2000 ppm 群ではほぼ全試験期間を通じて对照群と比較して摂餌量の有意な低値が
 認められた。1000 および 250 ppm 群雄において摂餌量の有意な低値が認められ
 た申請者注 1。

摂餌効率に对照群と比べ統計学的有意差の認められた時期を次表に示した。

性別	雄			雌			
	投与群 (ppm)	250	1000	2000	250	1000	2000
2 週		104	100	↓↓ 89	95	↓ 90	↓↓ 86
4 週		93	↓ 89	↓↓ 71	98	90	90
6 週		102	93	↓↓ 72	94	91	92
13 週		78	↓ 71	↓ 59	67	74	52

Student の t 検定 ↓ : $p < 0.05$ 、↓↓ : $p < 0.01$ 、↓↓↓ : $p < 0.001$
 表中の数値は変動の目安として对照群を 100 とした場合の値

摂餌効率に関しては、2000 ppm 群の雄で第 6 週まで、雌で第 2 週まで对照群と
 比較して有意な低値を示し、1000 ppm 群の雌で第 2 週まで对照群と比較して低
 値を示した申請者注 2。250 ppm 群では对照群との差は認められなかった。

申請者注 1 : 250 および 1000 ppm 群雄で認められた摂餌量の低値について

250 ppm 群雄で認められた摂餌量の低値については、体重への影響を伴わないことから毒
 性学的意義のない変化であると考えられた。一方、1000 ppm 群雄で認められた摂餌量の低
 値は、体重増加抑制を伴うことから毒性学的意義のある変化と考えられた。

申請者注 2 : 1000 および 2000 ppm 群雌雄で認められた摂餌効率の低値について

1000 および 2000 ppm 群雌雄で認められた摂餌効率の低値について、報告書では抄録本文
 に記載の通り考察されていたが、申請者は以下のように考えた。

2000 ppm 群雄において投与 2、4、6 および 13 週に、2000 ppm 群雌において投与 2 週に対
 照群と比較して統計学的に有意な摂餌効率の低値が認められ、検体投与の影響と考えられ
 た。また、1000 ppm 群雄で投与 4 および 13 週に、1000 ppm 群雌で投与 2 週に対照群と比
 較して統計学的に有意な摂餌効率の低値が認められ、検体投与の影響と考えられた。

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は以下のとおりであった。

投与群 (ppm)		250	1000	2000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	17.9	71.7	158.0
	雌	21.4	89.5	166.4

摂水量；毎週 2 回全動物の水の摂取量を測定し、1 匹あたりの 1 日平均摂水量を算出した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた時期の概要を次表に示した。

性別 投与群 (ppm)	雄			雌		
	250	1000	2000	250	1000	2000
4 日	↓↓ 70	↓ 76	↓↓ 63	110	106	96
18 日	↓ 85	↓ 83	↓↓ 72	100	94	↓ 74
32 日	104	96	↓ 71	105	94	↓ 82
46 日	101	86	↓↓ 71	102	97	↓↓ 67
60 日	84	86	↓↓ 65	98	97	↓↓ 67
74 日	94	96	↓ 77	96	97	↓↓ 67
91 日	↑ 145	↑ 131	99	105	96	81

Student の t 検定 ↓: $p < 0.05$, ↓↑: $p < 0.01$, ↓↓: $p < 0.001$
 表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値

対照群と比較して、2000 ppm 群で試験期間を通じて有意な減少または減少傾向が認められた。1000 および 250 ppm 群でしばしば増加が見られたが、投与量との明らかな関連性は認められなかった^{申請者注}。

血液学的検査；試験開始後 96 日目に雄、試験開始後 97 日目に雌を、解剖前 16 時間絶食させた全動物を対象として、腹大静脈から血液を採取し、以下の項目の測定を行った。

白血球数、赤血球数、血小板数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、網状赤血球数および白血球百分率

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示した。

申請者注：250 および 1000 ppm 群雄で認められた摂水量の統計学的に有意な変化について
 250 および 1000 ppm 群雄において摂水量の統計学的に有意な減少あるいは増加が認められたが、これらの群においては投与期間を通して減少あるいは増加のいずれも認められており、変化に一貫性がないことから検体投与による影響とは考えられなかった。

性別	雄			雌		
	250	1000	2000	250	1000	2000
投与群 (ppm)	250	1000	2000	250	1000	2000
赤血球数	97	98	102	100	99	↓94
ヘモグロビン量	98	↓↓94	↓↓79	97	↓92	↓↓85
ヘマトクリット値	↓96	↓↓95	↓↓84	↓97	↓95	↓↓93
MCV	100	96	↓↓83	97	97	98
MCH	102	95	↓↓79	97	↓94	↓↓90
MCHC	102	99	↓95	100	97	↓↓92
血小板数	96	116	↑↑146	90	87	114
白血球百分率：好酸球	68	100	↓53	100	74	↓61

Student の t 検定 ↓: p < 0.05, ↓↓: p < 0.01, ↓↓↑↑: p < 0.001

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値

2000 ppm 群雄でヘモグロビン量、ヘマトクリット値、MCV、MCH および MCHC の減少が認められた。同群の雌ではヘモグロビン量、ヘマトクリット値、MCH および MCHC の減少が認められた。1000 ppm 群では、雌雄ともヘモグロビン量およびヘマトクリット値に減少が認められ、雌には MCH の減少が認められた。250 ppm 群では、雌雄ともヘマトクリット値が軽度ながら有意に減少した^{申請者注1}。その他、2000 ppm 群雌で赤血球数の減少、2000 ppm 群雄で血小板数の増加および 2000 ppm 群雌雄で好酸球の割合の有意な減少が認められた^{申請者注2}。

血液生化学的検査；血液学的検査の項目で記載した方法で採取した血液の一部から得られた血清を用い、以下の項目の測定を行った。

総蛋白、A/G 比、尿素窒素、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、アルカリホスファターゼ、総コレステロール、血糖、尿酸、ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示した。

申請者注 1：250 ppm 群の雌雄で認められたヘマトクリット値の低値について

250 ppm 群の雌雄においてヘマトクリット値の低値が認められたが、その変化は軽度であり、同群では赤血球数やヘモグロビン量などの項目に有意な変化は認められていないことから、毒性学的意義のない変化と考えられた。

申請者注 2：2000 ppm 群で認められた赤血球数の減少、血小板数の増加および好酸球の割合の減少について

2000 ppm 群雌で認められた赤血球数の減少および 2000 ppm 群雄で認められた血小板数の増加については検体投与の影響と考えられた。2000 ppm 群雌雄で認められた好酸球の割合の減少について、好酸球減少の原因としては骨髓での造血障害が知られているが^{*)}、同群では白血球数の減少は認められなかったこと、さらには、病理組織学的検査において骨髓にも異常はなかったことから、毒性学的意義はないと考えられた。

*) 酒井健、III-10-② 顆粒球の障害、III-10 血液、毒性学、118-119、南江堂、1982。

性別	雄			雌		
	250	1000	2000	250	1000	2000
投与群 (ppm)						
総蛋白	↓96	99	↑↑ 109	99	102	↑ 105
A/G 比	↑ 105	↑ 105	100	↑ 103	101	98
尿素窒素	99	101	↑ 114	96	102	94
AST	106	↑ 117	115	99	110	97
ALT	↓ 85	113	↑↑ 148	91	119	↑ 127
LDH	↓ 74	96	95	87	109	115
総コレステロール	97	94	↑↑ 212	101	113	↑↑ 142
血糖	97	↓ 90	↓ 84	102	99	↓ 90
尿酸	↓↓ 61	↓ 77	115	↓ 84	↓ 78	↓ 79
ナトリウム	100	99	↓ 98	99	99	99
カリウム	100	102	↑ 107	99	98	104
塩素	100	99	↓ 99	100	100	99
カルシウム	99	100	↑↑ 104	99	98	100

Student の t 検定 ↓↑ : p < 0.05, ↓ ↓ ↑ ↑ : p < 0.01, ↓ ↓ ↓ ↑ ↑ : p < 0.001
 表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値

2000 ppm 群の総コレステロールが雌雄共に有意に上昇した。また、2000 ppm 群雄で、総蛋白、尿素窒素、ALT、カリウム、カルシウムの有意な上昇、ナトリウム、塩素、血糖の有意な低下、雌の総蛋白、ALT の軽度の有意な上昇、血糖、尿酸の有意な低下が認められた。1000、250 ppm 群で見られた有意な差は用量依存性のない変化であった^{申請者注}。

申請者注：血液生化学的検査において統計学的有意差が認められた項目について

血液生化学的検査において認められた統計学的に有意な変化について、報告書では抄録本文に記載の通り考察されていたが、申請者は以下の通り考察した。

2000 ppm 群雌雄で総コレステロールの高値が認められ、検体投与の影響と考えられた。2000 ppm 群の雌雄において ALT の高値が認められたが、軽度の変化であり、肉眼的病理検査および病理組織学的検査において肝臓に異常は認められていないことから、毒性学的意義のない変化と考えられた。1000 ppm 群雄および 2000 ppm 群雌雄で血糖の低値が認められたが、これは摂餌量の減少に起因した二次的な変化であり、検体投与の直接的な影響ではないと考えられた。250 および 1000 ppm 群の雄で認められた尿酸の低値は、用量相関性がなく検体投与の影響ではないと考えられた。雌においては全投与群で尿酸値の有意な低値が認められ、検体投与による影響の可能性も考えられたが、投与群で認められた各個体の尿酸値は対照群で認める範囲と比べて大差なく（次表参照）、病理組織学的検査において、尿酸を産生する肝臓あるいは尿酸を排泄・再吸収する腎臓に影響は認められなかったことから、毒性学的意義のない変化と考えられた。以上のことから、尿酸値の低値については検体投与による影響ではない変化、あるいは毒性学的意義のない変化であると考えられた。

表：各群の雌における尿酸値の最大値および最小値

性別	雌			
	0	250	1000	2000
投与量 (ppm)				
群内の最大値 (mg/dL)	1.3	1.2	1.0	1.2
群内の最小値 (mg/dL)	0.6	0.5	0.5	0.4

その他に統計学的有意差が認められた項目については、用量相関性がないか、軽微な変動であることから、検体投与の影響ではないと考えられた。

尿検査；試験開始後 11 週より 13 週にかけて採取した尿について、以下の項目を検査した。

尿量、比重、色調、糖、潜血、pH、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン、沈渣

尿検査および尿沈渣所見に異常は認められなかった^{申請者注}。

臓器重量；試験終了時に屠殺した動物を対象として、剖検後、以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

脳、下垂体、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓（左右）、副腎（左右）、胸腺、甲状腺、精巣（左右）、卵巣（左右）

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示した。

性別		雄			雌		
投与群 (ppm)		250	1000	2000	250	1000	2000
最終体重		97	↓93	↓↓ 78	99	↓94	↓↓ 87
脳	重量	97	98	96	↓96	98	98
	対体重比	100	104	↑↑ 124	99	105	↑↑ 113
下垂体	重量	100	100	90	100	108	108
	対体重比	106	110	↑ 123	100	↑ 120	↑ 123
心臓	重量	103	103	99	101	100	99
	対体重比	107	↑↑ 111	↑↑ 126	103	↑ 106	↑↑ 112
肺	重量	105	99	↓↓ 85	96	↓↓ 89	↓↓ 87
	対体重比	↑ 106	↑ 106	↑ 110	98	95	98
肝臓	重量	95	105	↑↑ 124	98	103	↑↑ 117
	対体重比	97	↑↑ 113	↑↑ 160	99	↑↑ 110	↑↑ 135
脾臓	重量	97	95	95	90	↓86	90
	対体重比	100	100	↑↑ 117	90	90	105
腎臓 (右)	重量	↑↑ 120	↑↑ 125	↑↑ 123	97	103	101
	対体重比	↑↑ 120	↑↑ 133	↑↑ 157	100	↑ 110	↑↑ 116
腎臓 (左)	重量	↑↑ 118	↑↑ 128	↑↑ 125	99	104	104
	対体重比	↑↑ 123	↑↑ 137	↑↑ 160	97	↑↑ 109	↑↑ 119
副腎 (右)	重量	100	109	109	↓86	100	90
	対体重比	100	↑ 115	↑↑ 138	↓88	104	103
副腎 (左)	重量	105	105	110	96	100	100
	対体重比	105	112	↑↑ 135	97	108	↑ 115

申請者注：尿検査について

申請者が、尿量、比重、pH については t 検定（両側）、色調、潜血（雌のみ）、ケトン体、ビリルビン（雄のみ）、沈渣については Wilcoxon 検定（両側）を実施したが、有意差は認められなかった。

性別		雄			雌		
投与群 (ppm)		250	1000	2000	250	1000	2000
胸腺	重量	93	87	↓ 82	108	95	89
	対体重比	96	94	105	109	102	103
甲状腺	重量	100	95	90	94	94	106
	対体重比	101	102	↑ 116	90	98	↑ 116
精巣 (右)	重量	99	101	99	-	-	-
	対体重比	102	110	↑↑ 129	-	-	-
精巣 (左)	重量	103	106	102	-	-	-
	対体重比	105	↑ 115	↑↑ 130	-	-	-
卵巢 (右)	重量	-	-	-	95	90	↓ 87
	対体重比	-	-	-	98	98	99
卵巢 (左)	重量	-	-	-	103	95	100
	対体重比	-	-	-	105	103	↑ 114

Student の t 検定 ↓↑: p < 0.05、↓ ↓↑: p < 0.01、↓↓ ↓↑↑: p < 0.001

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値

臓器重量では、2000 ppm 群の肝臓および雄の腎臓（両側）の増加、雌雄の肺の減少および雄の胸腺および雌の卵巢（右側）の有意な減少、1000 ppm 群では、雄の腎臓（両側）の増加、雌の肺および脾臓の減少が認められた。

対体重比では、2000 および 1000 ppm 群の肝臓および腎臓（両側）の増加が認められた。250 ppm 群雄の腎臓（両側）で認められた臓器重量および対体重比の軽度に有意な増加は、諸検査から得られた結果を考慮すると、検体投与による影響は特に考えられなかった^{申請者注}。

申請者注：臓器重量について

臓器重量に認められた変化について、報告書では抄録本文に記載の通り考察されていたが、申請者は以下のように考えた。

1000 および 2000 ppm 群雌雄において肝臓重量あるいは対体重比の増加が認められたが、肉眼的病理検査および病理組織学的検査において肝臓に異常は認められていないことから、毒性学的意義のない変化と考えられた。

250 ppm 以上の群の雄において腎臓の重量および対体重比の増加が認められたが、尿検査、血液生化学的検査および病理組織学的検査のいずれの検査においても腎臓に異常は認められていないことから、毒性学的意義のない変化と考えられた。

250 ppm 群の雄で肺の対体重比の増加が認められたが、肺重量に変化が認められない程度の軽度の変化であることから、検体投与の影響とは考えられなかった。1000 ppm 以上の群の雌雄で認められた肺重量あるいは対体重比の変化は、体重減少に起因した二次的な変化と考えられ、検体による直接的な影響ではないと考えられた。

250 ppm 群雌で認められた脳重量の減少、1000 ppm 群雌で認められた脾臓重量の減少ならびに 250 ppm 群雌で認められた副腎（右）の重量および対体重比の減少は、用量相関性がないことから検体投与の影響ではないと考えられた。

その他に認められた統計学的に有意な変化は、体重減少に起因した二次的な変化と考えられ、いずれの変化も検体による直接的な影響ではないと考えられた。

肉眼的病理検査；採血終了後、全生存動物について剖検を行った。

肉眼的病理所見

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		0	250	1000	2000	0	250	1000	2000
臓器	所見/検査動物数	20	20	20	20	20	20	20	20
胃	粘膜のびらん	0	1	0	0	0	0	0	0
	噴門部の点状出血	0	0	1	0	0	0	0	0
腎臓	退色	0	0	5*	20**	0	0	6*	20**
	肥大	0	0	0	1	0	0	0	0
乳腺	乳腺腫	-	-	-	-	0	1	0	0
精巣	萎縮	1	0	0	0	-	-	-	-
	欠落 (右側)	0	0	1	0	-	-	-	-
精巣上体	欠落 (右側)	0	0	1	0	-	-	-	-
子宮	子宮蓄膿症	-	-	-	-	0	0	0	1
胸腺	点状出血	0	0	0	0	0	0	1	0

申請者注：申請者が統計検定を行った。

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ Fisher の直接確率検定 (両側)

2000 ppm 群全例に腎臓の退色が認められ、1000 ppm 群数例にも同様の所見が認められた^{申請者注}。

胸腺、腎臓、胃、精巣、精巣上体、子宮および乳腺にそれぞれ1例ずつ見られた変化は投与量との関連がみられず、検体投与による影響ではないと考えられた。

病理組織学的検査；肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、以下の組織について病理標本を作製し、検鏡した。

脳、下垂体、心臓、肺、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、副腎、胸腺、甲状腺 (上皮小体)、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、腸間膜リンパ節、頸部リンパ節、脊髄 (胸部)、膀胱、精巣、精囊、前立腺、子宮、卵巣、眼球、筋肉、坐骨神経 (大腿部)、骨髄、顎下腺、食道、気管、舌、大動脈、皮膚、乳腺、肉眼的病変部位

申請者注：腎臓に認められた退色について

1000 および 2000 ppm 群の雌雄に腎臓の退色が認められたが、病理組織学的検査において腎臓に異常は認められなかったことから、毒性学的意義はないと考えられた。

観察された病理組織学的所見

性別		雄				雌			
投与群 (ppm)		0	250	1000	2000	0	250	1000	2000
臓器	所見/検査動物数	20	20	20	20	20	20	20	20
卵巣	黄体欠損	-	-	-	-	0	0	1	0
	卵胞嚢腫	-	-	-	-	1	2	0	1
乳腺	嚢胞腺腫	-	-	-	-	0	0	2	1
	乳腺腫	-	-	-	-	0	1	0	0

申請者注：申請者が Fisher の直接確率検定（両側）を実施したが、有意差は認められなかった。

卵巣および乳腺における変化が対照群を含む全群で散発的に見られたが、いずれも偶発的な変化と考えられた。

他の組織に異常は認められなかった。

以上の結果から、ペンスルタップ原体のラットに対する飼料混入による3ヵ月間反復経口投与毒性試験における影響として、2000 ppm 群雄に被毛粗剛、2000 ppm 群雌雄に耳介の貧血 (pale ear) が認められた。1000 および 2000 ppm 群に体重増加抑制が認められた。摂餌量では 2000 ppm 群雌雄で低値が認められた^{申請者注1}。2000 ppm 群雌雄および 1000 ppm 群雌に摂餌効率の減少が認められ^{申請者注2}、2000 ppm 群雌雄で摂水量の減少が認められた。血液学的検査では 1000 および 2000 ppm 群雌雄でヘモグロビン量およびヘマトクリット値の低値が認められ、1000 ppm 群雌では MCH の減少、2000 ppm 群雌では MCV、MCH および MCHC の減少ならびに血小板数の増加、2000 ppm 群雌では赤血球数、MCH および MCHC の減少が認められた^{申請者注3}。血液生化学的検査では 2000 ppm 群雌雄に総コレステロールの高値が認められた。肉眼的病理検査では 1000 および 2000 ppm 群の雌雄で腎臓の退色が認められ、2000 ppm 群の雌雄で肝臓および腎臓の臓器重量および対体重比の増加、1000 ppm 群の雌雄で腎臓の臓器重量および対体重比の増加ならびに肝臓の対体重

申請者注 1：1000 ppm 群雄の摂餌量の低値について

報告書では 2000 ppm 群雌雄の摂餌量の低値のみ検体投与の影響とされていたが、申請者は 1000 ppm 群雄で認められた摂餌量の低値についても、検体投与の影響であると考えた。

申請者注 2：1000 ppm 群雄の摂餌効率の低値について

摂餌効率について、報告書では 2000 ppm 群雌雄および 1000 ppm 群雌に低値が認められたと記載されていたが、申請者は 1000 ppm 群雄についても有意な低値が認められ、検体投与の影響であると考えた。

申請者注 3：血液学的検査において認められた影響について

血液学的検査において認められた影響について、申請者は抄録本文に記載の項目のほか、2000 ppm 群雄の血小板数の増加および 2000 ppm 群雌の赤血球数の減少について、検体投与の影響であると考えた。

比の増加が認められた^{申請者注1}。
したがって無毒性量は雌雄とも 250 ppm（雄：17.9 mg/kg/日、雌：21.4 mg/kg/日）であると判断された。

申請者注1：肝臓および腎臓で認められた肉眼的病理検査所見および臓器重量の変化について既出の申請者注の通り、肝臓および腎臓の肉眼的病理検査所見あるいは臓器重量の変化については病理組織学的検査で影響は認められていないことから、毒性学的意義のない変化であると考えられた。

(2) ベンスルタップ原体のマウスを用いた飼料混入による3ヵ月間反復経口投与毒性試験

(資料 5-2)

試験機関：(財) 残留農薬研究所

報告書作成年：1982年

検体：ベンスルタップ原体

検体純度：

供試動物：ICR (Crj:CD-1) 系マウス、1群雌雄各20匹、投与開始時週齢；5週齢、

投与開始時平均体重；雄28.4g、雌23.8g、追加試験；雄30.4g、雌23.4g

投与期間：91または92日間、追加試験91日間

投与方法：検体を0、100、300、1000および3000ppmの濃度で、追加試験では0および40ppmの濃度で飼料に混入し、91または92日間にわたって随時摂食させた。

投与量設定根拠；

観察・検査項目および結果：

一般状態および死亡率；毎日1回、一般症状と死亡を観察した。

試験期間中、検体投与に関連する一般状態の異常は認められなかったが、投与13週に3000ppm群の雄1例が心耳血栓のため死亡した^{申請者注}。その他の群では、死亡例は認められなかった。

体重変化；毎週1回、全動物の体重を測定した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた時期を次表に示した。

申請者注：3000ppm群で認められた死亡について

3000ppm群で認められた死亡について、1例のみの発現であり、一般状態の異常も認められなかった。また、報告書には「心耳血栓のため死亡した」と記載されているが、その他の動物において心耳血栓に関連するような変化は認められなかった。しかしながら、死亡は高用量群のみで認められており、検体投与の影響を完全に否定することはできないことから、検体投与の影響と判断した。

性別	雄					雌				
	40	100	300	1000	3000	40	100	300	1000	3000
6週	97	100	98	98	96	96	97	96	94	↓93
8週	98	101	98	98	95	96	98	96	94	↓91
9週	97	101	98	97	94	95	97	98	95	↓90
10週	97	100	99	97	↓93	93	98	98	94	↓88
11週	97	101	101	98	93	93	95	93	↓91	↓↓84
12週	96	101	101	99	↓92	98	97	96	93	↓85
13週	97	100	100	97	↓92	92	95	94	↓91	↓↓84

Student の t 検定 ↓ : p < 0.05、↓↓ : p < 0.01、↓↓↓ : p < 0.001

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値

摂餌効率の低下を伴う体重の増加抑制が 3000 ppm 群雄および 1000 ppm 以上の群の雌で認められ、試験後半においてより顕著であった。300 ppm 以下の群では、有意差は認められなかった。

摂餌量および摂餌効率；毎週 2 回動物の摂餌量を測定し、摂餌効率を算出した。

摂餌量について、統計検定は実施しなかったが申請者注、3000 ppm 群雌雄において軽度の減少が認められ、試験後半においてより顕著であった。1000 ppm 以下の群では対照群との差は特に認められなかった。

摂餌効率に関して、統計検定は実施しなかったが申請者注、対照群と比較して 3000 ppm 群雄および 1000 ppm 以上の群の雌に低下が認められたが、その他の群では対照群との差はほとんどなかった。

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は以下のとおりであった。

投与群 (ppm)		40	100	300	1000	3000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	4.64	11.3	34.5	114	319
	雌	5.73	12.3	37.0	123	349

申請者注：摂餌量および摂餌効率における統計検定について

報告書中に個体別表が収載されていなかったため、申請者による統計検定も実施できなかった。

摂水量；毎週2回動物の水の摂取量を測定した。

統計検定は実施しなかったが申請者注¹、対照群と検体投与群との間に差異は認められなかった。

血液学的検査；投与91日に1群雌雄各10匹を選び、後大静脈から血液を採取し、以下の項目の測定を行った。

検体投与群に貧血を示す赤血球関連の異常が認められたため、ニューメチレンブルーによる超生体染色を施し網状赤血球数を算定した。

ヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、血小板数、白血球数、白血球百分率、網状赤血球数および赤血球形態

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示した。

性別	雄					雌				
	投与群 (ppm)	40	100	300	1000	3000	40	100	300	1000
ヘマトクリット値	98	↓89	↓91	↓88	↓↓32	104	↓93	98	94	↓↓47
ヘモグロビン量	98	↓93	↓95	93	↓↓59	103	↓94	99	97	↓↓71
赤血球数	99	↓90	↓92	↓89	↓↓34	↑105	↓95	99	95	↓↓51
MCV	99	99	99	↓98	↓↓94	99	99	99	99	↓↓93
MCH	100	↑104	↑104	↑104	↑↑181	98	98	99	101	↑↑142
MCHC	101	106	105	↑106	↑↑185	99	99	100	102	↑↑153
血小板数	99	102	102	102	↑118	110	99	98	107	108
網状赤血球数	108	113	133	↑167	↑493	106	88	106	94	↑218

Student の t 検定 ↓↑: p < 0.05, ↓↓↑↑: p < 0.01, ↓↓↓↑↑↑: p < 0.001

申請者注：網状赤血球数についてのみ、申請者が Student の t 検定を行った。

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値

100 ppm 以上の群の雄および 3000 ppm 群雌にヘマトクリット値、ヘモグロビン量および赤血球数の減少が認められた。また、3000 ppm 群の雄では血小板数が有意に増加した^{申請者注²}。血液形態学的には、3000 ppm 群では雌雄とも網状赤血球の増加が観察され、赤血球は全般に輪郭不明瞭で色素親和性も低く、菲薄化、大小不同および多染性を示した。また、有棘赤血球、破碎赤血球などの奇形赤血球も多数観察された。1000 ppm 群雌において、網状赤血球数の増加が認められた。一方、1000 ppm 以上の群の雄および 3000 ppm 群の雌において MCV の減

申請者注 1：摂水量の統計検定について

報告書中に個体別表が収載されていないため、申請者による統計検定も実施できなかった。

申請者注 2：血小板数の増加について

3000 ppm 群の雄で認められた血小板数の増加について、報告書に記載はないが、対照群と比較して統計学的に有意であることから、検体投与の影響と判断した。

少が認められたほか、100 ppm 以上の群の雄および3000 ppm 群の雌で MCH の増加、1000 ppm 以上の群の雄および3000 ppm 群の雌で MCHC の増加が認められたが、一般に貧血の場合これらの数値は互いに比例して増減すること、また赤血球数が形態異常により実際より低く測定された可能性があることを考えると、上記赤血球平均恒数の変動は検体投与による影響を正確に反映しているとは考えられなかった。100 ppm 群雌に見られたヘマトクリット値、ヘモグロビン量および赤血球数の有意な減少ならびに40ppm 群雌に見られた赤血球数の有意な高値は、300 および1000 ppm 群の雌には異常がなかったことから検体投与に関連した変化ではないと判断された。

40 ppm 群では、雌雄ともに検体投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

血液生化学的検査；血液学的検査の項目で記載した方法で採取した血液の一部から得られた血漿を用い、以下の項目の測定を行った。

総蛋白、アルカリホスファターゼ (ALP)、血糖、尿素窒素、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、総コレステロール、カルシウム

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示した。

性別	雄					雌					
	投与群 (ppm)	40	100	300	1000	3000	40	100	300	1000	3000
総蛋白		99	98	98	100	103	101	↓95	↓96	↓97	97
AST		↑121	90	100	106	106	88	105	79	82	128
ALT		113	115	146	108	↑138	92	123	77	85	146
総コレステロール		93	92	92	↓83	96	99	94	121	106	↑113
カルシウム		99	98	100	96	101	↑107	98	98	99	100

Student の t 検定 ↓↑: p < 0.05、↓: p < 0.01

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値

検体投与による異常は特に認められなかった^{申請者注}。

申請者注：血液生化学的検査で統計学的有意差が認められた項目について

血液生化学的検査において、統計学的に有意な変動を示す項目が認められたが、これらの変動について報告書中では明確な考察はされていなかった。しかしながら、いずれの変化についても、用量相関性がなく、軽微な変動であるため、検体投与の影響ではないと考えられた。

尿検査；投与 13 週目に、生存動物全例について腰背部圧迫法により尿を採取し、以下の項目を検査した。

pH、蛋白、糖、ケトン体、潜血、比重

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示した。

性別		雄						
投与群 (ppm)		0*1	40	0*2	100	300	1000	3000
比重		100	100	100	100	101	↑ 101	100
pH	5	0	0	0	0	0	0	0
	6	13	10	7	10	12	10	↓ 19
	7	7	10	13	10	7	10	1
	8	0	0	0	0	1	0	0
蛋白	陰性	0	0	0	0	0	0	0
	痕跡	0	0	3	1	1	0	1
	軽度	1	↑ 0	16	↑ 7	↑ 10	↑ 7	↑ 10
	中等度	15	6	0	8	8	12	6
	高度	3	13	1	4	1	1	3
	重度	1	1	0	0	0	0	0
ケトン体	陰性	14	6	0	2	8	5	10
	痕跡	6	14	0	0	↓ 0	↓ 0	↓ 0
	軽度	0	0	20	18	12	15	10

性別		雌						
投与群 (ppm)		0*1	40	0*2	100	300	1000	3000
比重		100	100	100	↓ 99	↓ 98	↓ 98	↓ 98
pH	5	1	0	0	0	0	0	0
	6	7	↓ 16	19	17	19	17	19
	7	4	2	1	2	1	3	1
	8	8	2	0	1	0	0	0
蛋白	陰性	0	0	0	0	0	0	0
	痕跡	1	0	0	1	4	1	3
	軽度	13	7	15	15	↓ 14	16	14
	中等度	3	10	5	4	2	3	3
	高度	3	3	0	0	0	0	0
	重度	0	0	0	0	0	0	0
ケトン体	陰性	12	4	5	4	3	3	0
	痕跡	6	↑ 12	0	0	0	0	↑ 0
	軽度	2	4	15	16	17	17	20

申請者注：申請者が統計検定を行った (↑ ↓: p < 0.05、↑: p < 0.01)。

比重は t 検定 (両側)、pH・蛋白・ケトン体は Wilcoxon 検定 (両側)

比重の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値

pH・蛋白・ケトン体の数値はそのグレードを示した動物数

*1：追加試験の対照群

*2：本試験の対照群

比重、pH、蛋白およびケトン体において統計学的有意差が認められた^{申請者注}。

臓器重量；部検後、計画屠殺した動物全例について以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

脳、下垂体、甲状腺(上皮小体を含む)、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、生殖腺(精巣・卵巣)、骨格筋(下腿三頭筋)

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示した。

申請者注：尿検査において統計学的有意差が認められた項目について

尿検査の結果について、報告書には「検体投与の影響は認められなかった」と記載されていたが、申請者は以下のように考察した。

3000 ppm 群雄で pH の低値、100 ppm 以上の群の雌で比重の減少、40 ppm 以上の群の雄で蛋白の高値がそれぞれ認められたが、いずれの変動も本試験および追加試験の対照群と比較して大差はなく、血液生化学的検査および病理組織学的検査において腎臓に影響は認められていないことから、毒性学的意義のない変化と考えられた。

1000 ppm 群雄で比重の増加、300 ppm 群の雌で蛋白の低値が認められたが、用量相関性がないことから検体投与の影響ではないと考えられた。

ケトン体については、本試験の対照群の雄では 20 例中 20 例が軽度を示したが、追加試験の対照群の雄では 20 例中 14 例が陰性、残り 6 例が痕跡であり、軽度を示す動物はいなかった。このように、対照群の雄の間でも陰性から軽度までの変動は認められていることから、本試験および追加試験の投与群の雌雄で認められた程度の変動については、検体投与の影響ではないと考えられた。

性別		雄					雌				
投与群 (ppm)		40	100	300	1000	3000	40	100	300	1000	3000
最終体重		97	100	100	97	↓92	92	95	95	92	↓84
脳	重量	99	100	100	99	99	99	99	100	99	99
	対体重比	102	99	99	101	106	108	104	105	107	↑115
甲状腺	重量	88	97	103	103	105	100	98	100	102	105
	対体重比	93	100	113	113	125	113	100	109	↑109	↑↑127
心臓	重量	97	102	106	105	↑107	98	95	97	99	103
	対体重比	100	103	108	↑108	↑↑118	107	103	103	↑108	↑↑124
胸腺	重量	↑120	103	103	97	88	100	97	87	105	97
	対体重比	↑133	100	100	100	100	108	100	90	110	110
肝臓	重量	↓93	98	96	96	96	↓90	95	95	96	104
	対体重比	96	99	96	99	↑106	98	99	100	104	↑↑123
腎臓	重量	104	107	110	100	101	97	97	100	100	101
	対体重比	107	107	109	104	↑110	106	101	105	↑108	↑↑118
脾臓	重量	98	100	98	94	138	↓85	93	89	89	120
	対体重比	104	100	100	95	↑150	94	97	94	94	141
副腎	重量	102	94	94	100	108	↑112	101	100	103	104
	対体重比	100	91	91	100	↑118	↑126	105	105	↑110	↑↑120
卵巢	重量	-	-	-	-	-	91	88	89	↓87	↓73
	対体重比	-	-	-	-	-	101	94	94	94	↓85
骨格筋	重量	97	100	99	96	99	94	95	98	↓93	95
	対体重比	100	98	98	98	106	102	100	102	100	↑110

Student の t 検定 ↓↑: p < 0.05, ↓↓↑↑: p < 0.01, ↓↓↓↑↑↑: p < 0.001

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値

3000 ppm 群の雄で心臓重量、1000 ppm 以上の群の雌雄で心臓の対体重比が有意に増加した。また、3000 ppm 群の雄で脾臓重量の増加傾向および対体重比の有意な増加、3000 ppm 群の雌雄で肝臓の対体重比の有意な増加が認められた。心臓の重量の増加については、対応する組織学的変化がなく原因は不明であった申請者注。その他の臓器においては、一部に有意な増減は見られたが、いずれも体重の増加抑制に伴うものであり、検体投与に起因すると考えられる特異的变化はなかった。

300 ppm 以下の群では検体投与に関連する異常は認められなかった。

申請者注：1000 ppm 以上の群の雌雄で認められた心臓重量および対体重比の増加について 1000 ppm 群雌雄および 3000 ppm 群雌において心臓の対体重比が増加し、3000 ppm 群雄では心臓重量および対体重比が増加したが、いずれも軽度の変化であり、病理組織学的検査において心臓に異常は認められていないことから毒性学的意義のない変化と考えられた。

肉眼的病理検査；投与期間終了時、全生存動物について剖検を行った。

肉眼的病理所見

性別		雄						雌					
投与量 (ppm)		0	40	100	300	1000	3000	0	40	100	300	1000	3000
臓器	所見/検査動物数	40	20	20	20	20	20	40	20	20	20	20	20
前胃	粘膜肥厚	0	0	0	0	3	9**	0	0	0	0	0	0
	白色肥厚	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	粘膜白色肥厚	0	0	0	0	1	9**	0	0	0	0	12**	16**
	粘膜白色化	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2
	粘膜白色硬化	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	表面粗造	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5*
	偽膜様物附着	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
脾臓	腫大	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	3

申請者注：申請者が統計検定を行った。

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ Fisher の直接確率検定 (片側)

3000 ppm 群の雄および 1000 ppm 以上の群の雌において前胃粘膜の白色肥厚の発現頻度が有意に増加し、1000 ppm 群の雄においても増加傾向が認められた^{申請者注1}。3000 ppm 群ではさらに脾臓の腫大が散見された^{申請者注2}。300 ppm 以下の群では、検体投与に関連する肉眼的異常は特に認められなかった。

病理組織学的検査；試験動物全例について、以下の臓器・組織について病理標本を作製し検鏡した。

申請者注1：前胃粘膜の肥厚および白色肥厚について

3000 ppm 群の雄で認められた前胃粘膜の肥厚について、報告書に記載はないが、その発現頻度は対照群と比較して有意に増加しており、また、いずれの個体においても、粘膜角化亢進および上皮増生といった通常的环境下で飼育された無処置マウスではほとんどみられない病理組織学的変化を伴うことから、検体投与の影響と判断した。

1000 ppm 群の雄で認められた前胃粘膜の肥厚および白色肥厚についても、いずれも統計学的有意差はないものの、上記と同様の病理組織学的変化を伴うことから、検体投与の影響と判断した。

申請者注2：脾臓の腫大について

3000 ppm 群の雌雄で認められた脾臓の腫大について、報告書に記載はないが、その発現頻度に統計学的な差はないものの、いずれの個体においても、貧血に対応する変化と考えられる髄外造血亢進といった病理組織学的変化を伴うことから検体投与の影響と判断した。

脳、下垂体、眼球および付属腺、甲状腺・上皮小体、鼻腔、副鼻腔、耳道、気管、喉頭、頬部粘膜、舌、食道、唾液腺、胸腺、肺、心臓、肝臓、胆嚢、胃、十二指腸、膵臓、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、肛門、脾臓、副腎、腎臓、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、凝固腺、卵巣、子宮、膀胱、尿道、リンパ節（頸部・腸間膜）、大動脈、横隔膜、皮膚（腰背部）、乳腺（腹部）、坐骨神経、脊髄（頸・胸・腰部）、骨・骨髄（胸骨・大腿骨）、膝関節、骨格筋（下腿三頭筋）および肉眼的病変部位

観察された主要な病理組織学的所見

性別		雄						雌					
投与群 (ppm)		0	40	100	300	1000	3000	0	40	100	300	1000	3000
臓器	所見/検査動物数	40	20	20	20	20	19(1)	40	20	20	20	20	20
肝臓	肝細胞混濁腫脹	0	0	0	2	3	10*** (1)	0	0	0	0	1	13***
脾臓	髓外造血亢進	4	2	4	6	9*	13***	4	0	2	4	3	12**
骨髄	造血亢進	0	0	0	2	4	7**	0	0	0	0	0	8**
前胃	角化亢進	0	0	0	0	16***	19*** (1)	0	0	0	0	17***	20***
	上皮増生	0	0	0	0	9***	17***	0	0	0	0	14***	20***
膀胱	上皮増生	0	0	0	14***	11***	18***	0	0	0	0	9***	20***

() ; 途中死亡例数

Fisher の直接確率計算法 * : p < 0.05, ** : p < 0.01, *** : p < 0.001

前胃、膀胱、肝臓、脾臓および骨髄に検体投与に関連すると思われる変化が認められた。1000 ppm 以上の群の雄雌で認められた前胃粘膜の角化亢進・上皮増生ならびに 300 ppm 以上の群の雄および 1000 ppm 以上の群の雌で認められた膀胱粘膜の上皮増生は、通常的环境下で飼育された無処置マウスにはほとんど見られない変化であり、本検体投与に起因する特異的变化と推察された。そのほか、1000 ppm 以上の群の雄および 3000 ppm 群の雌では脾臓において髓外造血亢進、300 ppm 以上の群の雄および 3000 ppm 群の雌では骨髄において造血亢進がそれぞれ認められた。これらの造血亢進は、血液学的に認められた貧血に対応する変化と考えられた。

100 ppm 以下の群の雄および 300 ppm 以下の群の雌においては、検体投与に関連する異常は認められなかった。

以上の結果から、ベンスルタップ原体のマウスを用いた飼料混入による 90 日間反復経口投与毒性試験における影響として、3000 ppm 群雄 1 例で死亡が認められた。3000 ppm 群雄および 1000 ppm 以上の群の雌で体重増加抑制が認められ、3000 ppm 群雌雄で摂餌量の減少、3000 ppm 群雄および 1000 ppm 以上の群の雌に摂餌効率の減少が認められた。血液学的検査^{申請者注}では、100 ppm 以上の群の雄および 3000 ppm 群雌でヘマトクリット

申請者注：申請者が 3000 ppm 群の雌で認められた血小板数の増加について、検体投与の影響と判断した。

値、ヘモグロビン量および赤血球数の有意な減少が観察された。1000 ppm 以上の群の雄および 3000 ppm 群の雌で網状赤血球の増加が認められ、3000 ppm 群の雌雄では異常赤血球像が観察された。3000 ppm 群雄の脾臓重量が増加傾向を示し、対体重比では雌雄の肝臓ならびに雄の脾臓の値が有意に増加した。病理組織学的検査では、1000 ppm 群以上の群の雌雄で前胃粘膜の角化亢進・上皮増生、膀胱粘膜の上皮増生が認められたほか、1000 ppm 群以上の雄および 3000 ppm 群の雌における脾臓、ならびに 300 ppm 以上の群の雄および 3000 ppm 群の雌における骨髄では血液学的に認められた貧血に対応する変化として造血亢進が認められた^{申請者注}。また、3000 ppm 群の雌雄で肝細胞混濁腫脹が認められた。300 ppm 群では、雄の膀胱粘膜に上皮増生が認められたが、雌に異常は認められなかった。40 ppm 群では検体投与に関連した変化は認められなかった。

したがって無毒性量は雄 40 ppm (4.64 mg/kg/日)、雌 300 ppm (37.0 mg/kg/日) であると判断された。

申請者注:肉眼的病理検査において認められた1000 ppm以上の群の雄での前胃粘膜の肥厚、1000 ppm 以上の群の雌雄での前胃粘膜の白色肥厚、3000 ppm 群の雌雄での脾臓の腫大については、病理組織学的変化を伴うことから申請者が検体投与の影響と判断した。

(3) ベンスルタップ原体のイヌにおける亜急性毒性試験

(資料 5-3)

ベンスルタップのイヌにおける亜急性経口毒性試験成績については、以下のとおり、慢性毒性試験の予備試験(4週間投与)成績及び慢性毒性試験成績(資料7-3)で代替できるものと考えます。

ベンスルタップのイヌにおける4週間亜急性毒性試験

試験機関：Hazleton Laboratories America, Inc.

[GLP 対応]

報告書作成年：1984年

検体：ベンスルタップ原体

検体純度：

供試動物：若齢ビーグル犬、1群雌雄各2匹、投与開始時週齢；30～34週齢、

投与開始時平均体重；雄 8.4 kg、雌 7.2 kg

投与期間：4週間(1984年1月26日～1984年2月23日)

投与方法：当初、検体を0、25、75、225および675 ppmの濃度で飼料に混入して摂食させた。投与1週間後、いずれの動物にも臨床症状が認められなかったため、投与2週から25 ppm群の投与量を2025 ppmに増加した(25/2025 ppm群とした)。25/2025 ppm群2週に飼料の嗜好性に問題がみられたため、3週にはすべての投与群に被験物質量の2 w/w%の割合でコーンオイルを添加した。25/2025 ppm群は3週にも他の群の60%しか飼料を摂取しなかった。嗜好性が影響しない高用量を確認するため、4週に75 ppm群の投与量を1300 ppmに増加した(75/1300 ppm群とした)。飼料調製は週1回行った。

観察・検査項目および結果：

一般状態および死亡率；一般状態および生死を毎日2回以上、6時間以上の間隔で観察した。

試験期間を通じて全投与群に軟便、粘液便、血便、下痢および嘔吐が散見されたが、検体投与に関連すると考えられる症状および死亡は認められなかった。

体重変化；毎週1回、全動物の体重を測定した。

体重値および体重増加量について Dunnett 検定を行ったところ対照群と投与群との間に統計学的に有意な差は認められなかった（有意水準： $p < 0.05$ ）が、25/2025 および 75/1300 ppm 群雌雄で投与量増加後に体重減少が認められた^{申請者注}。

各検査時期に認められた体重増加量について、次表に示した。

検査時期 (週)	投与群 (ppm)									
	雄					雌				
	0	25/ 2025	75/ 1300	225	675	0	25/ 2025	75/ 1300	225	675
-2~-1	0.1	0.2	0.0	-0.1	-0.2	0.3	0.2	0.3	0.1	0.1
-1~0	0.3	0.4	0.7	0.4	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.3
0~1	0.2	0.2	0.4	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.1
1~2	0.1	-0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	-0.3	-0.1	0.2	0.0
2~3	0.2	-0.7	0.1	0.0	-0.1	0.0	-0.5	0.0	0.2	0.1
3~4	0.0	-0.3	-0.2	0.0	0.0	-0.1	-0.3	-0.2	-0.2	-0.1

表中の値は、各検査時期における2例の平均体重増加量 (kg) を示す。

摂餌量；毎週1回、全動物の摂餌量を測定した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた時期を次表に示した。

検査時期 (週)	投与群 (ppm)							
	雄				雌			
	25/2025	75/1300	225	675	25/2025	75/1300	225	675
1	97	117	91	93	126	107	116	109
2	↓ 40	129	99	99	76	99	119	96
3	50	117	95	106	73	108	116	110
4	48	102	100	102	76	98	113	108

Dunnett 検定 ↓： $p < 0.05$

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値

25/2025 ppm 群雌雄において2~4週に摂餌量の減少が認められ、2週雄の摂餌量は対照群と比較して有意に減少した。対照群との差は、被験物質による嗜好性の低下によるものと考えられた。

申請者注：25/2025 および 75/1300 ppm 群で認められた体重減少について

25/2025 ppm 群では、投与量を2025 ppmに増加した後、継続的に体重減少が認められ、検体投与による影響と考えられた。一方、75/1300 ppm 群では3~4週に体重減少が認められたが、同群で認められた体重減少は軽微であり、対照群や投与前の動物においても同程度の体重減少は認められていることから、検体投与の影響ではないと考えられた。

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は以下のとおりであった。

投与群 (ppm)		25/2025			75/1300			225	675
検体摂取量 ^{申請者注} (mg/kg/日)	雄	1週	0.29	20.8	1~3週	1.73	9.01	5.96	19.7
		2~4週	27.6		4週	30.8			
	雌	1週	0.30	29.8	1~3週	1.54	8.69	5.79	17.3
		2~4週	39.6		4週	30.1			

血液学的検査；投与開始前および投与期間終了時に、全生存動物を対象とし、終夜絶食後、頸静脈または桡側皮静脈から血液を採取し、以下の項目の測定を行った。
赤血球数、白血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血小板数、白血球分類（好中球、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球、桿状核球、分葉核球）、有核赤血球

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示した。

検査項目	投与群 (ppm)							
	雄				雌			
	25/2025	75/1300	225	675	25/2025	75/1300	225	675
血小板数	↑ 174	87	82	99	152	101	117	116

Dunnnett 検定 ↑: $p < 0.05$

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値

25/2025 ppm 群雄雄で血小板数の増加が認められ、雄では対照群と比較して統計学的に有意に増加した。その他に検体投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

血液生化学的検査；血液学的検査において採取した血液を対象に、以下の項目の測定を行った。

アルブミン、尿素窒素、カルシウム、塩素、クレアチンホスホキナーゼ、クレアチニン、グロブリン、血糖、無機リン、カリウム、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、ナトリウム、総ビリルビン、総コレステロール、総蛋白

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示した。

申請者注：検体摂取量の算出について

報告書では1週間あたりの検体摂取量 (mg/kg/週) で表記されていたため、申請者がその値を7で割って1日あたりの検体摂取量 (mg/kg/日) を算出した。

検査項目	投与群 (ppm)							
	雄				雌			
	25/2025	75/1300	225	675	25/2025	75/1300	225	675
グロブリン	↓ 73	92	88	100	95	109	118	105
カリウム	100	96	94	92	↑ 108	↓ 92	↑ 108	↓ 90

Dunnett 検定 ↑ ↓ : p < 0.05

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値

25/2025 ppm 群雄でグロブリン値の減少が認められた。また、雌の全投与群においてカリウムが統計学的に有意に増加あるいは減少した^{申請者注}。

尿検査；投与開始前および投与期間終了時に、全生存動物を対象とし、終夜採取した尿について以下の項目を検査した。

外観、尿量、pH、尿比重、ビリルビン、潜血、糖、ケトン体、蛋白、ウロビリノーゲン、沈渣

Dunnett 検定を行ったが、検体投与群と対照群の間に有意差は認められなかった（有意水準：p < 0.05）。

臓器重量；投与期間終了時に全動物を対象として以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

脳（延髄／橋、小脳皮質）、腎臓、肝臓、精巣および精巣上体

対照群と比べ増加した項目を次表に示した。

検査項目	投与群 (ppm)								
	雄				雌				
	25/2025	75/1300	225	675	25/2025	75/1300	225	675	
肝臓	重量	122	131	103	118	157	127	119	144
	対体重比	150	125	115	132	157	126	105	128

Dunnett 検定（有意差なし）

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値

検体を投与した雌雄共に肝臓の平均絶対重量および対体重比の増加傾向が認められた。対照群との有意差は認められなかったが、検体投与に起因した変化と

申請者注：血液生化学的検査で認められたグロブリン値およびカリウムの変化について
 25/2025 ppm 群雄では、対照群と比較してグロブリン値の低値が認められたが、軽度の変化であり、総蛋白には影響しない程度の軽度の変化であることから、毒性学的意義のない変化と考えられた。
 また、投与群の雌で認められたカリウムの変化は軽度であり、用量反応性のない変化であることから偶発的な変動と考えられ、検体投与の影響ではないと考えられた。

考えられた^{申請者注1}。

肉眼的病理検査；投与期間終了時、全生存動物について剖検を行った。

いずれの組織にも、検体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；投与期間終了時、対照群および25/2025 ppm群動物の以下の組織について病理標本を作製し、検鏡した。

肝臓、脳、腎臓、副腎、胃、脾臓、卵巣、精巣

認められたすべての病理組織学的所見を次表に示した。

性別		雄		雌	
投与量 (ppm)		0	25/2025	0	25/2025
臓器・所見\検査動物数		2	2	2	2
腎臓	髓質尿細管鈣質化 (左腎)	0	0	0	1
	髓質尿細管鈣質化 (右腎)	0	0	0	1
	皮質尿細管硝子円柱	0	0	0	1
肝臓	慢性炎症	1	0	1	1
	空胞化	0	1	0	0

検定未実施

これらの所見は偶発的なもので、検体投与に起因した変化ではなかった。

以上の結果から、本試験におけるペンスルタップ原体のビーグル犬に対する飼料混入投与による4週間反復経口投与毒性試験における影響として、25/2025 ppm群雌雄で体重増加量の減少、摂餌量の減少および血小板数の増加ならびにすべての投与群雌雄の平均肝臓重量および対体重比の増加が認められた。したがって、無毒性量は雌雄共225 ppm (雄5.96 mg/kg/日、雌5.79 mg/kg/日)未満であると判断された^{申請者注2}。

申請者注1：肝臓重量の変化について

全ての投与群において肝臓重量および対体重比の増加が認められたが、いずれの投与群でも血液生化学的検査において肝臓への影響を示唆する変化は認められなかった。また、検体の総摂取量が最も多かった25/2025 ppm群において、肉眼的病理検査および病理組織学的検査で肝臓に投与の影響と考えられる異常は認められなかった。以上のことから、肝臓重量および対体重比の増加について、いずれの群においても毒性学的意義のない変化であると考えられた。

申請者注2：本試験で認められた肝臓重量の増加および無毒性量について

全ての投与群で認められた肝臓重量および肝臓対体重比の増加傾向について、報告書では抄録本文に記載の通り検体投与の影響であると考察されていた。しかしながら、申請者は申請者注1に記載の通り、血液生化学的検査、肉眼的病理検査および病理組織学的検査において肝臓に影響は認められなかったことから、いずれの群で認められた肝臓重量の増加についても毒性学的意義のない変化であると考えた。

以上のことから、本試験における影響として、25/2025 ppm群雌雄で体重増加量の減少、摂餌量の減少および血小板数の増加が認められ、無毒性量は雌雄共675 ppm (雄19.7 mg/kg/日、雌17.3 mg/kg/日)であると申請者は考えた。

90日間亜急性毒性試験については、以下に示すとおり、本試験およびイヌを用いた1年間慢性毒性試験成績(資料7-3)から、その無毒性量は、雌雄共600~675ppm(雄15.52~19.7mg/kg/日、雌15.88~17.3mg/kg/日)と推定される^{申請者注}。

申請者注：ベンスルタップのイヌにおける90日間亜急性毒性試験について

1. イヌにおける4週間投与試験(投与量：0, 25/2025, 75/1300, 225および675ppm、資料5-3)を実施した結果は次のとおりである。

- (1) 一般状態において検体投与による影響は認められなかった。
- (2) 体重および摂餌量において、25/2025ppm群で低下が認められた。
- (3) 血液学的検査において、25/2025ppm群で血小板数の高値が認められた。
- (4) 血液生化学的検査および剖検において、検体投与による毒性変化は認められなかった。
- (5) 従って、無毒性量は675ppm(雄19.7mg/kg/日、雌17.3mg/kg/日)であることが示唆された。

2. イヌにおける1年間慢性毒性試験(投与量：0, 200, 600および2000ppm、資料7-3)を実施した結果は次のとおりである。

- (1) 一般状態において、2000ppm群で運動失調症、流涎、線維束性収縮、振戦および筋肉衰弱などの臨床徴候が認められ、投与36週時に雄1例を瀕死状態のため屠殺した。
- (2) 体重および摂餌量において、2000ppm群で低下が認められた。
- (3) 血液学的検査において、赤血球数、ヘモグロビン量およびヘマトクリット値の低値ならびに血小板数の高値が認められた。
- (4) 血液生化学的検査において、アルブミン、A/G比、総蛋白およびカルシウムの低値ならびに無機リンの高値が認められた。
- (5) 尿検査および眼検査において、検体投与による影響は認められなかった。
- (6) 投与36週時に瀕死状態のため屠殺した雄1例で、肝細胞の肥大が認められ、投与26週時にALTとASTの高値傾向が認められていたことから、本屠殺例においては肝臓への影響が考えられた。一方、生存例においては肝臓への影響は認められなかった。
- (7) 臓器重量、肉眼的病理検査および病理組織学的検査では、検体投与による毒性学的に意義のある変化は認められなかった。
- (8) 従って、無毒性量は600ppm(雄15.52mg/kg/日、雌15.88mg/kg/日)であると考えられた。

3. 次表にベンスルタップ原体のイヌにおける4週間投与試験および1年間慢性毒性試験にて得られた結果を示した。上記1および2に記載の通り、これらの試験で体重および摂餌量の減少ならびに血小板数の高値が共通して認められた。これらの毒性変化は4週間投与と1年間投与とともに最高用量のみで認められ、無毒性量は4週間投与試験で675ppm(雄19.7mg/kg/日、雌17.3mg/kg/日)、1年間投与試験で600ppm(雄15.52mg/kg/日、雌15.88mg/kg/日)であった。以上のことから、ベンスルタップ原体をイヌに90日間投与した場合の無毒性量は、600ppm(雄15.52mg/kg/日、雌15.88mg/kg/日)以上かつ675ppm(雄19.7mg/kg/日、雌17.3mg/kg/日)を下回るものと推定される。

また、約2000ppmの高用量投与では、投与期間に関わらず前述した体重、摂餌量および血小板数への影響が共通して認められた。このことから、90日間投与の高用量として2000ppmを設定した場合においても、4週間投与あるいは1年間投与と同様の毒性変化が認められるものと考えられる。

4. 以上のように、ベンスルタップ原体をイヌに90日間投与した場合の毒性変化としては、少なくとも体重、摂餌量および血小板数といった4週間および1年間投与で共通して発現した毒性が認められ、その無毒性量は600ppm(雄15.52mg/kg/日、雌15.88mg/kg/日)以上かつ675ppm(雄19.7mg/kg/日、雌17.3mg/kg/日)を下回るものと考えられる。したがって、90日間投与による亜急性毒性試験については当該試験結果で代替可能であり、試験実施の必要はないものと考えられる。

投与量 (ppm)	投与量 (mg/kg)	4週間投与	1年間投与
200	♂5.54 ♀5.85	-	NE
225	♂5.96 ♀5.79	NE	-
75/1300	♂9.01 ♀8.69	NE	-
600	♂15.52 ♀15.88	-	NE
675	♂19.7 ♀17.3	NE	-
25/2025	♂20.8 ♀29.8	雌雄： 体重減少、摂餌量減少、血小板数増加	-
2000	♂52.01 ♀50.51	-	雌雄： 運動失調症、流涎、線維束性収縮、振戦、筋肉衰弱 体重減少、摂餌量減少 赤血球、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値の低値 血小板数の高値 アルブミン、A/G比の低値 雄： 瀕死例屠殺（投与36週時） 無機リンの高値 屠殺例において肝細胞肥大ならびに投与26週時のALTおよびAST高値傾向 雌： 四肢の衰弱、運動失調症、手押し車反応および跳び直り反応の減弱 総蛋白、カルシウムの低値

- : 実施せず、NE : 毒性変化なし

6. 反復経口投与神経毒性

ペンスルタップ原体のラットを用いた 90 日間反復経口投与神経毒性試験

(資料 6)

試験機関: Charles River Discovery and Development
Services, Argus Division
[GLP 対応]

報告書作成年: 2007 年

検体: ペンスルタップ原体

検体純度:

供試動物: Sprague-Dawley 系ラット、一群雌雄各 10 匹、

投与開始時週齢; 7 週齢、投与開始時体重; 雄 176~241 g、雌 130~172 g

投与期間: 13 週間 (2003 年 9 月 9 日~2003 年 12 月 10 日)

投与方法: 検体を 0.5% (w/w) カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁して 0、10、30、100 および 200 mg/kg/日の投与量で、ラットの胃内に強制経口投与した。

混餌飼料中においては検体が不安定だったため、この方法を選択した。投与液量は 5 mL/kg とした。投与液は週 1 回調製し、使用まで遮光して冷蔵保存した。

投与量設定根拠:

観察・検査項目および結果:

死亡率; 生死を毎日観察した。

試験終了時の死亡率を次表に示す。

投与量 (mg/kg/日)		0	10	30	100	200
死亡率 (%)	雄	10	0	0	0	20
	雌	0	0	0	0	↑ 30

二項分布の均一性に関する分散分析法: \uparrow ; $p \leq 0.01$

200 mg/kg/日群で認められた死亡は、検体投与に関連すると考えられた。

雄の対照群で認められた 1 例の死亡 (切迫殺) は、外傷または事故によるものと考えられた。

一般状態；全ての動物について、毎日の投与後約 60 分に観察した。

検体投与に関連すると考えられた症状を次表に示す。

性別	雄					雌				
	0	10	30	100	200	0	10	30	100	200
投与量 (mg/kg/日)	0	10	30	100	200	0	10	30	100	200
検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
症状										
脱水	0	1	1	0	↑ 5	0	0	0	1 ¹	3
円背位	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
皮温低下	0	0	0	0	0	0	0	0	0	↑ 3
過呼吸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	↑ 3
ラッセル音	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2
振戦	0	0	0	0	0	0	0	0	1 ¹	↑ 5
筋攣縮	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
過剰な流涎	0	0	0	↑ 10	↑ 9	0	0	0	↑ 8	↑ 8
流涙	0	0	0	0	0	0	0	0	0	↑ 3
眼瞼下垂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
正向反射の異常	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2
聴覚反応の亢進	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
自発運動の減少	0	0	0	0	2	0	0	0	1 ¹	↑ 5
四肢の蒼白化	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
口周囲の付着物 (赤/橙/褐色)	0	0	0	↑ 4	↑ 5	0	0	1 ²	↑ 5	↑ 6
鼻周囲の付着物 (透明/赤/橙/褐色)	0	0	0	2	2	0	0	0	↑ 4	↑ 2
腹部被毛の尿による 汚れ	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1 ³
排糞量の減少	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2
無便	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

表中の数値は所見を有する動物数

二項分布の均一性に関する分散分析法：↑；p ≤ 0.05、↑↑；p ≤ 0.01

申請者注 1：100 mg/kg/日群の雌において認められた脱水、振戦および自発運動の減少については報告書で考察されていないが、200 mg/kg/日群の多数例で認められている症状であり、100 mg/kg/日群では他に過剰な流涎など多数の症状も認められていることから検体投与の影響であると考えられた。

申請者注 2：30 mg/kg/日群の雌 1 例において認められた口周囲の付着物については、30 mg/kg/日群の雌において他に症状が認められていないことから、検体投与の影響ではないと考えられた。

申請者注 3：200 mg/kg/日群の雌 1 例において認められた腹部被毛の尿による汚れについては、報告書中では検体投与の影響ではないと考察されていたが、200 mg/kg/日群の雄において影響と判断していることおよび 200 mg/kg/日群では他に多数の症状も認められていることから検体投与の影響であると考えられた。

100 および 200 mg/kg/日群の雌雄において、過剰な流涎および口周囲の付着物の発生頻度が対照群と比較して有意な高値を示した。また、100 および 200 mg/kg/日群の雌で鼻周囲の付着物が、200 mg/kg/日群の雄で脱水が、200 mg/kg/日群の雌で、皮温低下、過呼吸、振戦、流涎および自発運動の減少の発生頻度が対照群と比較して有意な高値を示した。さらに、投与に関連した症状として、100 および 200 mg/kg/日群の雄で鼻周囲の付着物が認められ、200 mg/kg/日群の雄で自発運動の減少および腹部被毛の尿による汚れが、200 mg/kg/日群の雌で脱水、円背位、ラッセル音、筋攣縮、眼瞼下垂、正向反射の異常、聴覚反応の亢進、四肢の蒼白化、排糞量の減少あるいは無便が認められた。その他の雄で認められた症状については、1例のみの発現、対照群でも同様に発現していること、発生率に用量依存性がないことから検体投与の影響ではないと判断した。

体重変化；全動物の体重を投与期間中、毎日測定した。

投与期間中の各投与群の体重を次表に示す。

性別	投与量 (mg/kg/日)	試験日						
		1	8	15	22	29	36	43
雄	10	101	101	100	99	99	99	99
	30	101	100	99	99	97	97	97
	100	101	100	99	98	99	99	100
	200	101	↓ 88	↓ 89	↓ 87	↓ 88	↓ 87	88
雌	10	98	97	95	95	95	95	94
	30	97	97	97	96	96	95	96
	100	97	96	94	95	95	95	95
	200	98	90	↓ 84	↓ 83	↓ 82	↓ 83	↓ 83

性別	投与量 (mg/kg/日)	試験日						
		50	57	64	71	78	85	91
雄	10	99	101	101	102	101	102	101
	30	97	99	100	99	100	101	101
	100	98	100	100	99	98	98	97
	200	↓ 87	↓ 87	↓ 86	↓ 85	↓ 84	↓ 83	↓ 82
雌	10	94	95	94	94	94	94	94
	30	96	97	96	96	96	96	97
	100	94	95	95	94	95	96	96
	200	↓ 83	↓ 84	↓ 82	↓ 82	↓ 81	↓ 81	↓ 84

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの
Dunnett、Dunn あるいは Fisher 検定：↓；p ≤ 0.05、↓；p ≤ 0.01

体重は、雌雄とも 200 mg/kg/日群において投与期間を通して低値を示した。これらの体重抑制は検体投与に関連すると判断した。体重増加量では、100 mg/kg/日群の雌において、試験 8~15 日において統計学的に有意な低値が認められた。また、200 mg/kg/日群の雄では、試験 1~8 日および試験 71~78 日において、雌では、試験 1~8 日および試験 8~15 日において統計学的に有意な低値が認められた。さらに、試験 1~91 日の累積体重増加量では、200 mg/kg/日群の雌雄で統計学的に有意な低値が認められた。

100 mg/kg/日群の雄および 30 mg/kg/日群では、体重値および体重増加量に影響は認められなかった。

摂餌量；全動物の摂餌量を投与期間中、毎週測定した。

投与期間中の各投与群の摂餌量を次表に示す。

性別	投与量 (mg/kg/日)	試験日						
		1-8	8-15	15-22	22-29	29-36	36-43	43-50
雄	10	103	101	96	96	101	101	101
	30	98	97	97	93	97	98	97
	100	100	100	101	102	103	104	100
	200	↓ 72	89	91	97	95	95	94
雌	10	96	94	98	95	95	98	98
	30	97	97	99	96	100	103	101
	100	95	93	100	97	100	101	101
	200	↓ 80	↓ 77	↓ 78	↓ 74	↓ 89	↓ 82	↓ 83

性別	投与量 (mg/kg/日)	試験日						平均
		50-57	57-64	64-71	71-78	78-85	85-91	
雄	10	104	101	103	105	106	100	101
	30	101	103	100	105	108	102	98
	100	102	101	103	105	107	104	102
	200	93	↓ 90	94	94	100	94	↓ 90
雌	10	94	94	96	94	92	98	96
	30	99	99	98	93	96	99	98
	100	95	98	99	97	102	98	98
	200	↓ 73	↓ 82	↓ 84	↓ 79	↓ 82	89	↓ 82

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの
Dunnett、Dunn あるいは Fisher 検定：↓； $p \leq 0.05$ 、↓↓； $p \leq 0.01$

摂餌量は、雄では、200 mg/kg/日群で試験 1～8 日および 57～64 日で統計学的有意な低値が認められ、投与期間を通して摂餌量の低値を示した。雌では、200 mg/kg/日群で試験 85～91 日を除いて、投与期間を通して統計学的有意な低値が認められた。これらの摂餌量への影響は検体投与に関連すると判断した。100 mg/kg/日以下の群では、摂餌量に影響は認められなかった。

詳細な症状の観察を含む総合機能観察 (FOB) ; 全ての動物について、投与開始前 1 回と試験 2 週、4 週、8 週および 13 週に、盲検化して FOB を実施した。観察 (ハンドリング、オープンフィールドおよびケージ外) は以下の項目を対象に、毎日の投与前に実施した。

詳細な症状の観察項目

一般状態 (皮膚、被毛、眼、眼球および粘膜の変化、分泌物の有無等)、体位および姿勢 (円背位等)、自律神経系機能 (流涙、立毛、瞳孔径、呼吸状態、排泄状態等)、運動協調性、歩行の異常、ハンドリングおよび環境刺激に対する反応、神経系 (振戦、痙攣、筋収縮性等)、探索行動の変化、常同行動 (身づくろいの変化、首振り、旋回等)、異常行動 (自咬、後ずさり、異常発声等)、攻撃性

FOB 項目

自律神経機能：流涙、流涎、眼瞼閉鎖、眼球突出、瞳孔反射、立毛、呼吸、
排尿、排糞

反応性および感受性：視覚、聴覚、触覚および痛覚刺激に対する感覚運動反
応

興奮性：ハンドリングに対する反応およびオープンフィールドでの行動

歩行および感覚運動協調性：オープンフィールドでの歩行状態、歩行異常、
空中立ち直り反射、位置視覚反応、着地開脚幅、前肢および後肢
握力

その他：痙攣、振戦、異常行動、筋緊張、削瘦、脱水、被毛粗剛、眼/鼻/
口周囲の付着物、その他の異常な症状

対照群と比較して統計学的有意差が認められた項目を次表に示した。

性別	検査時期 (週)	項目	投与量 (mg/kg)				
			0	10	30	100	200
雌	2	ホームケージ内行動スコア					
		1: 睡眠	2	3	0	4	1
		2: 覚醒、静止	7	5	3	4	4
		3: 正常な動き	1	2	↑7	2	↑3
		4: 異常な姿勢	0	0	0	0	0
		5: 異常な行動	0	0	0	0	0
雄	4	ホームケージ内行動スコア					
		1: 睡眠	0	3	4	3	3
		2: 覚醒、静止	3	6	6	5	6
		3: 正常な動き	7	↓1	↓0	↓2	↓1
		4: 異常な姿勢	0	0	0	0	0
		5: 異常な行動	0	0	0	0	0
雌	13	着地開脚幅	100	↑122	117	↑128	118

ホームケージ内行動スコア：表中の数値は所見を有する動物数

二項分布の均一性に関する分散分析法：↑； $p \leq 0.05$ 、↑↓； $p \leq 0.01$

着地開脚幅：表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

Dunnett、Dunn あるいは Fisher 検定：↑； $p \leq 0.05$ 、↑↓； $p \leq 0.01$

FOB において、試験 2 週における雌の 30 および 200 mg/kg/日および試験 4 週における雄の 10 mg/kg/日以上の群で認められたホームケージ内の行動スコア、試験 13 週における雌の 10 および 100 mg/kg/日群の着地開脚幅に有意差が認められたが、何れも単発的で用量依存性がなく、偶発的な変化であると考えられた。その他の観察、測定項目に変化は認められなかった。

自発運動量；全ての動物について、投与開始前 1 回と試験 2 週、4 週、8 週および 13 週の FOB 終了後、自発運動量（移動回数および移動時間）を 1.5 時間（5 分間隔で 18 ブロック）測定した。反復測定分散分析および Dunnett 検定を用いて、統計解析を実施した。いずれの場合も有意水準は 5% および 1% で評価した。

いずれの投与群でも異常は認められなかった。

眼科学的検査；投与開始前および試験終了時に全動物について検査をした。

前眼房、中間透光体および眼底を肉眼および検眼鏡で検査した結果、全動物において検体投与に関連すると思われる変化は認められなかった。

肉眼的病理検査；途中死亡動物および試験終了時の全生存動物については剖検を行った。

剖検では各個体の全身を詳細に観察し、肉眼的異常を記録した。いずれの投与群においても検体投与に起因する異常は認められなかった。

脳重量；病理組織学的検査に供した対照群および 200 mg/kg/日群の各性 5 匹の動物の頭部を 24 時間以上固定液に浸漬した後に、頭蓋骨から脳を取り出して重量を測定した。

対照群と比較して統計学的有意差が認められた項目を次表に示した。

性別	雄				雌			
	10	30	100	200	10	30	100	200
投与量 (mg/kg)	10	30	100	200	10	30	100	200
最終体重	107	99	96	↓79	96	99	94	↓84
絶対脳重量	102	100	100	100	100	101	98	100
相対脳重量	95	100	103	↑125	105	104	105	↑118

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの
Dunnett、Dunn あるいは Fisher 検定：↓； $p \leq 0.05$ 、↑↓； $p \leq 0.01$

200 mg/kg/日群の雌雄で、統計学的に有意な最終体重の減少が認められた。さらに、200 mg/kg/日群の雌雄で、最終体重に対する脳重量の割合が有意な増加を示したが、脳重量が同等であったことおよび体重が低かったことを反映するものであり、体重増加量等に関連する二次的変化であると考えられた。
よって、脳重量におけるこれらの変化には、毒性学的意義がないと判断された。

病理組織学的検査；対照群および 200 mg/kg/日群の各性 5 匹から採取した下表に示す組織を対象にして病理組織学的検査を実施した。検査対象とする動物は、詳細な症状の観察および FOB で異常または症状が認められた動物から選択した。動物は全身灌流固定した。

脳（前脳および海馬を含む大脳中央部、中脳、小脳、橋および延髄）、眼球（視神経および網膜を含む）、脊髄の頸部・胸部・腰部（頸膨大部、腰部膨大部、腹根および背根の神経節と神経根を含む）、三叉神経節（脊髄神経節）、坐骨神経（近位部）、脛骨神経（近位部、膝部および腓腹筋分岐部）、腓骨神経および腓腹神経、骨格筋（腓腹筋）

検査したいずれの組織にも検体投与に関連する病変は認められなかった。

以上の結果から、いずれの投与群においても FOB、自発運動量および神経病理組織学的検査において選択的神経毒性影響は認められなかった^{申請者注}。一方、検体のラットに対する 90 日間反復経口投与神経毒性試験における影響として、100 および 200 mg/kg/日群において一般状態が悪化し、100 mg/kg/日群の雌で体重増加量の低値が認められ、さらに 200 mg/kg/日群では死亡が認められ、体重、体重増加量および摂餌量の低値も認められた。

したがって、ペンシルタップ原体の本試験における無毒性量は雌雄共に 30 mg/kg/日であった。

申請者注：神経毒性試験では神経系への影響を評価するために特異的検査項目として FOB、自発運動量測定および病理組織学的検査を実施する。選択神経毒性とは、これらの検査項目において認められる神経系への影響を示唆する所見を指す。本試験では一般状態観察において振戦などの神経症状を認めているものの、特異的検査項目においては神経系への影響を示唆する所見を認めていない。したがって、神経毒性評価の特異的検査項目において、機能的および構造的な神経系への影響は認められていないことから、本報告書では選択的神経毒性影響は認められないと評価した。