

5) 90 日間反復経口投与毒性試験

5-1) ラットを用いた 3 ヶ月間反復経口投与毒性試験

(資料 9)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2000 年

検体純度:

試験動物: Wistar 系ラット [Chbb:THOM (SPF)], 1 群雌雄各 10 匹, 投与開始時齢: 42 ± 1 日, 投与開始時体重範囲: 雄 167~201g, 雌 132~155g

試験期間: 3 ヶ月間 (1997 年 10 月 10 日 ~ 1998 年 1 月 14 日)

投与方法: 検体を 0, 100, 500, 2000, 5000 及び 15000ppm の濃度で飼料に混入し, 3 ヶ月間にわたって随時摂食させた。検体を混入した飼料は 4 週間隔で調製した。

試験項目及び結果:

一般状態及び死亡率; 一般状態及び生死について, 少なくとも毎日 1 回観察し, また詳細な観察を毎週 1 回行った。

異常な徴候は何ら観察されず, 途中死亡もなかった。

体重: 投与期間中全動物の体重を毎週測定した。

体重には検体投与に関連する変化は何もみられなかった。2000ppm 群の雄で投与 28 日の体重増加が統計学的に有意に ($p \leq 0.05$, ANOVA 及び Dunnett 検定) 少なかったが, 一時的な変化であることから, 偶発的なものと考えられた。

摂餌量及び食餌効率; 全動物の摂餌量を 7 日間隔で毎週測定し, 体重と摂餌量の個体別値に基づいて食餌効率を算出した。

摂餌量には検体投与に関連する変化は何もみられなかった。

食餌効率は, 2000ppm 群の雄で投与 56 日に, 15000ppm 群の雌で投与 42 日にそれぞれ統計学的に有意な ($p \leq 0.05$, ANOVA 及び Dunnett 検定) 低値がみられたが, いずれも一時的な変化であることから偶発的なものと考えられた。

検体摂取量；体重と摂餌量の個体別値に基づいて群ごとに1日当りの平均検体摂取量を算出した。

投与期間を通じた平均検体摂取量

		投与量 (ppm)				
		100	500	2000	5000	15000
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	7	34	137	347	1055
	雌	8	40	159	395	1225

飲水量；飲水量の明らかな変化について、給水ビンを目視によって毎日観察した。

飲水量における明らかな変化は何もみられなかった。

検眼鏡による検査；眼の変化について投与開始1日前に全動物を、投与88日に最高用量群と対照群の全動物を検査した。

観察されたいずれの所見も自然発生的で、投与群と対照群の間で同等の発生であり、検体投与に関連する影響は何もみられなかった。

血液学的検査；投与90日(投与終了時)に、絶食していない無麻酔の全動物の後眼窩静脈叢から血液を採取し、以下の項目を測定した。

白血球数、赤血球数、血色素量、ヘマトクリット、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、白血球百分率

統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

血液学的検査結果

検査項目	投与量 (ppm)									
	雄					雌				
	100	500	2000	5000	15000	100	500	2000	5000	15000
赤血球数			↑ 105	↑ 110	↑ 108					
血色素量				↑ 108	↑ 105					
ヘマトクリット			↑ 104	↑ 109	↑ 107					
プロトロンビン時間										↓ 91

Kruskal-Wallis 検定及び Mann-Whitney の U 検定：↑ p ≤ 0.05, ↑↓ p ≤ 0.02, ↑↑ p ≤ 0.002

表中の数値は変動の目安として群平均値の対照群に対する変動率(%)を表したもの

赤血球数とヘマトクリット値が2000, 5000及び15000ppm群の雄で、血色素量が5000及び15000ppm群の雄でそれぞれ有意に高かった。しかし、雌でそのような所見はなかった。また、これら雄の変化の程度における対照群との差は僅かであり、いずれも背景対照データの範囲内にあることから、これらの変化は偶発的で毒性学的関連はない

ものと考えられた。一方 15000ppm 群の雌で、プロトロンビン時間が有意に短縮した。

血液生化学的検査；血液学的検査で使用した血液から得られた血清を用いて、以下の項目の測定を行った。

アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、血清γ-グルタミルトランスフェラーゼ、ナトリウム、カリウム、塩素、無機リン、カルシウム、尿素、クレアチニン、血糖、総ビリルビン、総蛋白、アルブミン、グロブリン、トリグリセリド、コレステロール、マグネシウム

次表に統計学的有意差の認められた項目を示す。

血液生化学的検査結果

検査項目	投与量 (ppm)									
	雄					雌				
	100	500	2000	5000	15000	100	500	2000	5000	15000
アスパラギン酸 アミノトランスフェラーゼ						↓ 77	↓ 86	↓ 82		
アルカリホスファターゼ						↑ 116	↓ 87	↓ 76	↓ 79	↓ 74
γ-グルタミル トランスフェラーゼ			↑ 250	↑ 233	↑ 392				↑ 264	↑ 300
カリウム				↑ 115						
カルシウム	↑ 103			↑ 106	↑ 106					
総ビリルビン			↓ 70	↓ 65	↓ 67					
総蛋白				↑ 107	↑ 107					↑ 107
アルブミン				↑ 107	↑ 107					
グロブリン							↓ 94			↑ 110
トリグリセリド					↓ 72					
コレステロール										↑ 130

Kruskal-Wallis 検定及び Mann-Whitney の U 検定：↑ ↓ p ≤ 0.05, ↑ ↓ p ≤ 0.02, ↑ ↓ p ≤ 0.002

表中の数字は変動の目安として群平均値の対照群に対する変動率 (%) を表したものの

血清γ-グルタミルトランスフェラーゼ活性の増加が 2000, 5000 及び 15000ppm 群の雄と 5000 及び 15000ppm 群の雌の血清で認められた。また、アルカリホスファターゼ活性が 500, 2000, 5000 及び 15000ppm 群の雌の血清で低下した。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性が 100, 500 及び 2000ppm 群の雌で統計学的に有意に低かったが、5000 及び 15000ppm 群では変化がみられていないことから、検体投与の影響とは考えられなかった。

雄において、5000 及び 15000ppm 群でカルシウム、総蛋白及びアルブミンの量の増加、2000, 5000 及び 15000ppm 群で総ビリルビン濃度の減少ならびに 15000ppm 群でトリ

グリセリド量の減少が認められた。雌では、総蛋白、アルブミン(有意差なし)、グロブリン及びコレステロールの濃度増加が 15000ppm 群でのみ観察された。

500ppm 以上の群の雌におけるアルカリホスファターゼ活性の低下、15000ppm 群の雄におけるトリグリセリドの減少、また 5000ppm または 15000ppm 群の雄におけるカルシウム値の増加については解釈が困難であるが、最高用量群の雌雄で発生しているため、これらの変化は投与に関連していると考えなければならない。しかし、アルカリホスファターゼ活性の低下については十分に理解されず、有害な毒性の影響としての酵素誘導と評価するには議論の余地がある。本試験において、アルカリホスファターゼ活性の低下に関連する悪影響は何も観察されなかったため、特有症候の関連を酵素活性の低下に帰すことはできない。したがって、アルカリホスファターゼ活性の低下は毒性学的に重要ではないと考えられた。

上記以外に認められた変動は軽微で偶発的であり、雌雄間で比較した場合一致していないことから、毒性学的意義はないものと考えられた。

尿検査：各動物を代謝ケージに移して(飼料と水を取除いて)一晚尿を採取し、以下の項目について検査した。

量、色、混濁度、亜硝酸塩、pH、蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビン、潜血、比重、沈渣

いずれの項目についても検体投与に関連する変化は認められなかった。

臓器重量：全動物を二酸化炭素麻酔下で断頭によって屠殺し、放血後以下の臓器重量を測定し、相対重量(%体重比)を算出した。

肝臓、腎臓、副腎、精巣、卵巣、脾臓、脳、甲状腺

次表に統計学的有意差の認められた項目を示す。

臓器重量

		投与量 (ppm)									
		雄					雌				
		100	500	2000	5000	15000	100	500	2000	5000	15000
肝臓	A					↑119				↑109	↑123
	R				↑114	↑121				↑112	↑124
副腎	A				↓67	↓80					
	R				↓74	↓83					
卵巣	A	—	—	—	—	—					
	R	—	—	—	—	—			↑115		
脾臓	A					↓76					
	R					↓77					
甲状腺	A			↑121		↑134				↑117	↑131
	R			↑140		↑140				↑114	↑129

A 絶対重量, R 相対重量(体重比)

Kruskal-Wallis H 検定及び Wilcoxon 検定: ↑↓ $p \leq 0.05$, ↑↓ $p \leq 0.01$

表中の数字は変動の目安として群平均値の対照群に対する変動率(%)を表したもの

絶対重量は、肝臓重量が 15000ppm 群の雌雄と 5000ppm 群の雌で対照群に比べ有意に増加した。また、甲状腺重量が 15000ppm 群の雌雄、5000ppm 群の雌及び 2000ppm 群の雄でそれぞれ有意に増加した。副腎重量が 5000 及び 15000ppm 群で、脾臓重量が 15000ppm 群の雄においてのみ有意に減少した。

相対重量は、肝臓が 5000 及び 15000ppm 群の雌雄で、甲状腺が 15000ppm 群の雌雄、5000ppm 群の雌及び 2000ppm 群の雄でそれぞれ有意に高かった。副腎相対重量が 5000 及び 15000ppm 群の雄で、脾臓相対重量が 15000ppm 群の雄でそれぞれ有意に低かった。雌の卵巣相対重量は 5000ppm 投与群でのみ有意に高かった。

剖 検 ; 肉眼による病理学的変化について全動物を検査した。

いくつかの肉眼的病変が観察されたが、いずれも散発的であり、または対照群と投与群の間で有意な差もみられなかった。

病理組織学的検査;以下の臓器について対照群を含む全試験群の雌雄全動物を対象とし、ヘマトキシリン・エオジン染色組織標本を作製して病理組織学的に検査した。

甲状腺、肺、肝臓、腎臓、全ての肉眼的異常部位

さらに、以下の臓器については対照群と最高用量群の雌雄全動物を対象として病理組織学的検査を行った。

脳、下垂体、上皮小体、胸腺、気管、肺、心臓、大動脈、唾液腺(下顎腺及び舌下腺)、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、膵臓、精巣、卵巣、子宮/卵管/腔、精巣上体/前立腺/精囊、皮膚、食道、胃(前胃及び腺胃)、十二指腸/空腸/回腸、盲腸/結腸/直腸、

膀胱，腸間膜及び下顎のリンパ節，雌の乳腺，骨格筋，坐骨神経，胸骨（骨髓を含む），骨髓（大腿骨），脊髓（頸髄，胸髄及び腰髄）

[非腫瘍性病変]

肝 臓

小葉中心性肝細胞肥大が 15000ppm 群の雄 (10/10) と雌 (7/10) 及び 5000ppm 群の雄 (8/10) と雌 (2/10) に認められた。小葉中心性肝細胞肥大の程度は，軽微ないし中等度であった。また，15000ppm 群の雄の小葉中心性肝細胞肥大では，脂肪の蓄積は小葉の中間域より辺縁で頻繁に認められた。肝臓にみられた他のすべての病変は，自然発生的または偶発的であり，検体投与に関連していなかった。

甲 状 腺

濾胞上皮細胞の肥大と瀰漫性過形成の発生率が，雄において対照群の 1/10 に対して 100ppm 群で 2/10 及び 500ppm 群で 3/10 であった。これらの発生率は，通常のラット個体群において予期される頻度であり，正常な機能を表す組織像であることから，偶発的なものと評価された。しかし，2000ppm 群 (7/10)，5000ppm 群 (7/10) 及び 15000ppm 群 (8/10) では明らかに高く，検体投与の影響と考えられた。両所見の程度は弱く，軽微または軽度であった。甲状腺にみられた他のすべての病変は，自然発生的または偶発的であり，検体投与に関連していなかった。

他の器官

腎臓，卵巣，子宮，腺胃，脂肪組織，下垂体，脾臓ならびに腸間膜及び下顎のリンパ節に病理組織学的変化が観察されたが，いずれも偶発的あるいは自然発生的であり，検体投与に関連していなかった。

[腫瘍性病変]

腫瘍性病変はいずれの動物においても認められなかった。

以上，Wistar 系ラットへの本剤の 3 ヶ月間経口投与によって，雄では 2000ppm 以上においてγ-グルタミルトランスフェラーゼの増加、総ビリルビンの減少、甲状腺重量の増加、甲状腺濾胞上皮細胞軽度肥大、甲状腺濾胞上皮細胞軽度瀰漫性過形成の高い発生率がみられた。5000ppm 以上において肝臓の重量増加、小葉中心性肝細胞肥大、及び脂肪変性の高い発生率がみられた。雌では 500ppm 以上でアルカリホスファターゼの減少がみられた。病理学的検査における標的器官は肝臓と甲状腺であった。アルカリホスファターゼの減少は悪影響とみなされなかったため，本試験条件下で無毒性量 (NOAEL) は 500ppm (雄 34mg/kg 体重/日，雌 40mg/kg 体重/日) と判断された。

5-2) マウスを用いた3ヵ月間反復経口投与毒性試験

(資料 10)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 2000年

検体純度:

試験動物: C57BL/6JRj マウス, 1群雌雄各10匹, 開始時49日齢, 試験開始時体重範囲(雄: 20.3~23.7g, 雌: 16.0~19.1g)

試験期間: 3ヵ月間(1997年10月27日~1998年1月28日)

投与方法: 検体を0, 150, 1000, 4000及び8000ppmの濃度で飼料に混入し, 3ヵ月間にわたって随時摂食させた. 検体を混入した飼料は4週間に1回調製した.

投与量設定根拠:

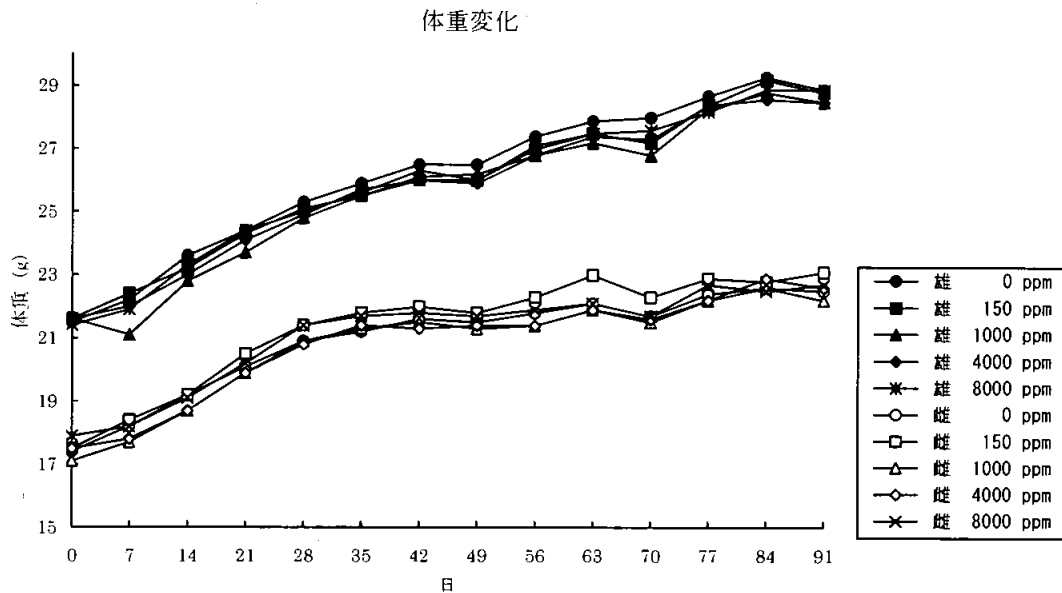
試験項目及び結果:

一般状態及び死亡率: 一般状態及び生死を毎日観察した.

死亡及び検体投与に関連した異常は観察されなかった.

体重変化: 試験期間中, 全動物について毎週1回体重を測定した.

平均体重変化を下図に示す。



1000ppm 群の雄において投与 14 及び 21 日目に体重増加が統計学的に有意に減少した (F 検定及び Dunnett 検定)。単発的であることから検体投与の影響ではなく、偶発的なものと考えられた。

摂 餌 量；全動物の摂餌量を週 1 回測定し、食餌効率も算出した。

150 及び 1000ppm 群の雌において投与 14 日目に摂餌量が対照群と比較して統計学的に有意に減少した (F 検定及び Dunnett 検定)。単発的であることから検体投与の影響ではなく、偶発的なものと考えられた。

検体摂取量；投与期間中の 1 日当たりの平均検体摂取量は以下の通りであった。

表 1. 1 日当たりの平均検体摂取量

投与量 (ppm)		150	1000	4000	8000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	29	197	788	1518
	雌	42	277	1184	2209

血液学的検査；投与終了時に全生存動物を対象として、後眼窩静脈叢から及び断頭により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、血色素量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、血小板数、型別白血球数

対照群と比較し統計学的有意差の認められた項目はなかった (Kruskal-Wallis 検定及び Mann-Whitney U 検定 (両側))。

血液生化学的検査；血液学的検査で使用した血液から得られた血清を用い、以下の項目の測定を行った。

アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST), アルカリホスファターゼ(ALP), 血清-γ-グルタミルトランスフェラーゼ(GGT), ナトリウム, カリウム, 塩素, 無機リン, カルシウム, 尿素, クレアチニン, 血糖, 総ビリルビン, 総蛋白, アルブミン, グロブリン, トリグリセリド, コレステロール, マグネシウム

統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

表 2. 血液生化学的検査

検査項目	用量群 (ppm)							
	雄				雌			
	150	1000	4000	8000	150	1000	4000	8000
アラニンアミノトランスフェラーゼ							↑ 119	↑ 117
クレアチニン		↓ 91		↓ 90				
総蛋白			↓ 96	↓ 95				
アルブミン			↓ 97	↓ 95				
グロブリン			↓ 94	↓ 93				
コレステロール		↓ 88	↓ 74	↓ 72				
トリグリセリド								↓ 81

Kruskal-Wallis 検定及び Mann-Whitney U 検定(両側) ↑ ↓ : $p \leq 0.05$, ↑ ↓ : $p \leq 0.02$, ↑ ↓ : $p \leq 0.002$
 表中の数値は変動の目安として群平均値の対照群に対する変動率(%)を示したもの。

4000 及び 8000ppm 群の雌においてアラニンアミノトランスフェラーゼがわずかに増加した。1000, 4000 及び 8000ppm 群の雄においてコレステロールが有意に低下したが、低コレステロール症は一般に疾病徴候とは考えられないので、毒性影響とは考えられない。また、4000 及び 8000ppm 群の雄に総蛋白、アルブミン、グロブリンの有意な低下が認められた。

その他の血液生化学的検査項目に対照群と比較して統計学的有意差が認められたが、いずれも単発的であり、検体投与に関連した影響とは考えられなかった。

臓器重量：投与終了時の全生存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。

肝臓, 腎臓, 副腎, 精巣/卵巣, 脾臓, 脳

統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

表 3. 臓器重量

性 別		雄				雌			
投与量 (ppm)		150	1000	4000	8000	150	1000	4000	8000
肝臓	絶対重量		↑ 112	↑ 111	↑ 127	↑ 108		↑ 112	↑ 122
	対体重比		↑ 114	↑ 113	↑ 129		↑ 108	↑ 111	↑ 121
脳	絶対重量	↑ 103							

Kruskal-Wallis 検定及び Wilcoxon 検定 (両側) ↑↓ : $p \leq 0.05$, ↑↓ : $p \leq 0.01$

表中の数値は変動の目安として群平均値の対照群に対する百分率 (%) を示したものの。

肝臓重量の背景データとの比較

性 別		雄					雌				
投与量 (ppm)		0	150	1000	4000	8000	0	150	1000	4000	8000
本試験	絶対重量 mg	1097	1114	1228	1220	1397	887	956	947	995	1085
	対体重比 %	4.39	4.51	5.01	4.97	5.66	4.72	4.87	5.09	5.23	5.7
背景データ	絶対重量 mg	平均 1208 ± 94 (範囲 1097-1443)					平均 970 ± 80 (範囲 887-1053)				
	対体重比 %	平均 4.35 ± 0.25 (範囲 4.18-4.58)					平均 4.95 ± 0.28 (範囲 4.72-5.07)				

同系統のマウスを用いて行った本試験を含む 8 試験の背景データである。

太字は投与関連があると考えられる変化。

1000, 4000 及び 8000ppm 群の雄において肝臓の絶対重量ならびに対体重比が増加した。雌においては 150, 4000, 8000ppm 群において肝臓の絶対重量が増加し, 1000, 4000, 8000ppm 群において肝臓の対体重比が増加した。

上記の背景データと比較したとき, 本試験の対照群の値が背景データの下限にあることから投与群が相対的に増加した結果となり, 投与に関連のある変化は 8000ppm 群雌雄及び 4000ppm 群雌のみと考えられた。しかし, 申請者は, 臓器重量の場合は絶対重量及び対体重比が同方向に有意に変動した時は, 原則的に投与による毒性影響と考えるので雄の 1000ppm, 雌の 4000ppm は毒性量と判断いたします。

また, 150ppm 群の雄において脳の絶対重量が増加したが, この変動は偶発的なものと思われた。

肉眼的病理検査 ; 全動物について剖検を行った。

対照群と比較して統計学的に有意差の認められた所見はなかった。

病理組織学的検査 ; 全動物を対象として, 以下の組織について病理標本を作製し, 検鏡した。

全ての肉眼的異常部位, 脳, 下垂体, 甲状腺, 上皮上体, 胸腺, 気管, 肺, 心臓, 大動脈, 唾液腺 (顎下腺及び舌下腺), 肝臓, 胆嚢, 脾臓, 腎臓 (両側), 副腎 (皮質及び髄質), 膵臓, 精巣 (両側), 精巣上体 (両側), 前立腺, 精嚢, 卵巣 (両側), 卵管 (両側), 子宮/膣, 食道, 胃 (前胃, 腺胃), 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸, 膀胱, リンパ節 (腸間膜及び顎下), 骨格筋, 坐骨神経, 脊髄 (頸部, 胸部, 腰部), 胸骨 (骨髄を含む), 大腿骨 (膝関節を含む), 骨髄 (大腿骨), 眼 (両側), 乳腺 (雌), 皮膚。

全群の肝臓に瀰漫性の脂肪性空胞化が観察された。これは、肝重量の変動に関連する所見と考えられた。その発生頻度と程度を次頁の表に示す。4000 及び 8000ppm 群の雄における変化は顕著(程度 3~4)であり、検体投与に関連した所見であると考えられた。

表 4. 肝臓の脂肪性空胞化

性 別	雄					雌				
	0	150	1000	4000	8000	0	150	1000	4000	8000
用量 (ppm)	0	150	1000	4000	8000	0	150	1000	4000	8000
検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
肝臓 脂肪性空胞化	10	10	9	10	10	9	8	10	8	9
程度 1	0	0	0	0	0	2	1	0	4	2
2	5	3	6	1	1	2	3	2	3	4
3	5	7	3	6	4	5	4	7	1	2
4	0	0	0	3	5	0	0	1	0	1

以上のとおり、本剤のマウスに対する 3 ヶ月間反復経口投与毒性試験における毒性影響として 8000ppm 群において雄における総蛋白、アルブミン及びグロブリンの低下、雌におけるアラニンアミノトランスフェラーゼの増加及び肝重量の増加、雄における重度の肝臓脂肪性空胞化の増加が認められ、4000ppm 群において雄における総蛋白、アルブミン及びグロブリンの低下、雌におけるアラニンアミノトランスフェラーゼの増加、雌における肝重量の増加、雄における重度の肝臓脂肪性空胞化の増加が認められた。また、1000ppm 以上の群の雄において肝重量の増加が認められた。150ppm 群では検体投与に関連する毒性変化は認められなかった。したがって、本試験における無毒性量は、雄は 150ppm (29mg/kg 体重/日)、雌は 1000ppm (277mg/kg 体重/日) と判断される。

5-3) ビーグル犬における3ヵ月間反復経口投与毒性試験

(資料 11)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 2000年

検体純度:

試験動物: 純系ビーグル犬, 1群雌雄各5匹, 開始時8ヵ月齢, 試験開始時体重範囲(雄: 8.9~14.1kg, 雌: 8.2~13.2kg)

試験期間: 3ヵ月間(1998年1月20日~1998年4月28日)

投与方法: 検体を0, 250, 2500及び25000ppmの濃度で飼料に混入し, 3ヵ月間にわたって随時摂食させた。検体を混入した飼料は2週間に1回調製した。

投与量設定根拠:

試験項目及び結果:

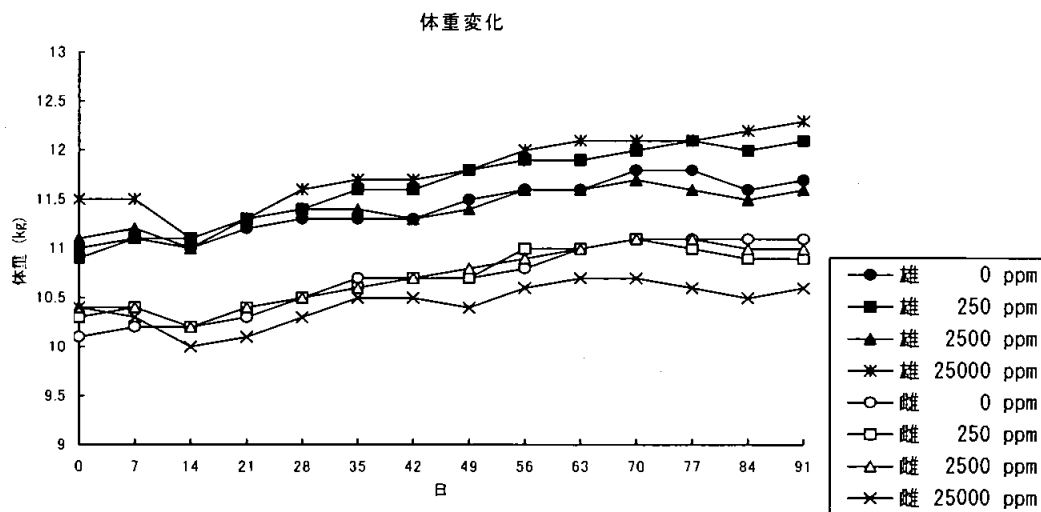
一般状態及び死亡率; 一般状態及び生死を毎日観察した。

投与期間中, 死亡は認められなかった。

25000ppm群の全動物に淡褐色便(一部軟便)が観察された。2500ppm群においても雄3例, 雌3例に一過性の淡褐色便(一部軟便)が観察された。これらは検体投与の影響と考えられた。

体重変化; 全動物について毎週1回体重を測定した。

平均体重変化を次図に示す。



いずれの投与群においても体重及び体重増加に対照群と比較して統計学的に有意な変化は認められなかった。しかし 25000ppm 群の雌雄(特に雌)において投与初期に検体投与の影響による体重減少及び体重増加抑制が認められた。

摂餌量及び食餌効率；全動物の摂餌量を毎日測定し、食餌効率も算出した。

投与期間中の平均摂取量(%)を次表に示す。

投与量 (ppm)		0	250	2500	25000
平均摂餌量 (%)	雄	100	100	100	96
	雌	98	99	99	96

表中の数値は給餌量に対する飼料摂取量の割合(%)

25000ppm 群において摂餌量がわずかに減少し、食餌効率もわずかに減少した。これらは検体投与の影響と考えられた。

検体摂取量；投与期間中の1日当たりの平均検体摂取量は以下の通りであった。

投与量 (ppm)		250	2500	25000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	7.6	78.1	728.9
	雌	8.1	81.7	824.8

血液学的検査；投与 43/44 日目及び 87/90 日目(雄/雌)に全生存動物を対象として、前腕橈側皮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、血色素量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、血小板数、型別白血球数、活性化部分トロンボプラスチン時間、プロトロンビン時間

対照群と比較し、統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

検査項目	検査時期 (雄/雌)	用量群 (ppm)					
		雄			雌		
		250	2500	25000	250	2500	25000
赤血球数	87/90 日						↓ 89
血色素量	43/44 日						↓ 93
	87/90 日						↓ 90
血小板数	87/90 日		↑ 121	↑ 135			
プロトロンビン時間	43/44 日	↓ 91					
活性化部分 トロンボプラスチン時間	43/44 日				↑ 109		↑ 109

Kruskal-Wallis 検定及び Mann-Whitney U 検定 (両側) ↑↓: $p \leq 0.05$, ↑↑: $p \leq 0.02$
 表中の数値は変動の目安として群平均値の対照群に対する変動率 (%) を示したもの。

25000ppm 群の雌において血色素量が投与 44 及び 90 日目に減少し、赤血球数が投与 90 日目に減少した。投与 44 日目においても統計学的有意差はないものの赤血球数に減少傾向がみられた。

その他、対照群と比較して統計学的有意差の認められた項目があったが、いずれも検体投与の影響とは考えられなかった。

血液生化学的検査；血液学的検査で使用した血液から得られた血清を用い、以下の項目の測定を行った。

アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), アルカリホスファターゼ (ALP), 血清 γ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT), 血糖, 総ビリルビン, コレステロール, クレアチニン, 尿素, 総蛋白, アルブミン, グロブリン, ナトリウム, カリウム, 塩素, カルシウム, 無機リン, マグネシウム, トリグリセリド

統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

検査項目	検査時期 (雄/雌)	用量群 (ppm)					
		雄			雌		
		250	2500	25000	250	2500	25000
ALT	43/44 日					↓ 57	↓ 54
	87/90 日			↓ 51		↓ 44	↓ 48
AST	87/90 日			↓ 73		↓ 55	↓ 54
ALP	43/44 日			↑ 283			
	87/90 日			↑ 278		↑ 187	↑ 289
塩素	43/44 日			↓ 97			
カルシウム	43/44 日			↑ 105			
トリグリセリド	43/44 日			↑ 213			↑ 182
	87/90 日	↑ 133	↑ 147	↑ 200		↑ 148	↑ 200

Kruskal-Wallis 検定及び Mann-Whitney U 検定(両側) ↑↓: $p \leq 0.05$, ↑↓: $p \leq 0.02$
 表中の数値は変動の目安として群平均値の対照群に対する変動率(%)を示したものの。

血液生化学的検査の結果、アラニンアミノトランスフェラーゼ活性(ALT)の低下が、2500 及び 25000ppm 群の雌において投与 44 及び 90 日目に認められ、25000ppm 群の雄において投与 87 日目に認められた。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性(AST)の低下が 25000ppm 群の雄において投与 87 日目に、2500 及び 25000ppm 群の雌において投与 90 日目に認められた。また、アルカリホスファターゼ活性(ALP)の増加が 25000ppm 群の雄において投与 43 及び 87 日目に認められ、2500 及び 25000ppm 群の雌において投与 90 日目に認められた。アラニンアミノトランスフェラーゼ活性及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性の低下は一般に毒性影響とは考えられない。トリグリセリドの増加が投与 43・44 日目に 25000ppm 群の雌雄において認められ、投与 87・90 日目には雄の全投与群に、雌でも 2500 及び 25000ppm 群において認められた。25000ppm 群におけるトリグリセリドの増加は検体投与に関連したものと判断したが、250 及び 2500ppm 群におけるトリグリセリドの増加は対照群の値が低かったことに起因しており、また次表のように背景データの範囲内であることから検体投与の影響とは考えられなかった。その他の血液生化学的検査項目に検体に関連した変化は観察されなかった。

トリグリセリドの背景データとの比較

性 別	雄				雌			
	0	250	2500	25000	0	250	2500	25000
投与量 (ppm)	0	250	2500	25000	0	250	2500	25000
本試験	0.30	0.40	0.44	0.60	0.33	0.44	0.49	0.66
背景データ	平均 0.38 (範囲 0.24-0.45)				平均 0.45 (範囲 0.38-0.51)			

10 試験の背景データである。太字は投与関連があると考えられる変化。

尿 検 査：投与 37/38 及び 85/86 日目(雄/雌)に全動物から採取した尿について以下の項目を検査した。

尿量、色、濁度、亜硝酸塩、pH、蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビン、潜血、尿比重、尿沈査

検体投与に関連する変化は認められなかった(Fisherの直接確率計算法)。

臓器重量：投与終了時の全生存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、肝臓、腎臓(両側)、副腎、精巣/卵巣(両側)、精巣上体、甲状腺/上皮小体

下表に統計学的有意差の認められた項目を示す。

性別		雄			雌		
投与量(ppm)		250	2500	25000	250	2500	25000
肝臓	絶対重量		↑ 118	↑ 142		↑ 119	↑ 149
	対体重比			↑ 127		↑ 121	↑ 163
腎臓	対体重比			↓ 80			
甲状腺	対体重比						↑ 143

Kruskal-Wallis 検定及び Wilcoxon 検定(両側)↑↓: $p \leq 0.05$, ↑↓: $p \leq 0.01$
表中の数値は変動の目安として群平均値の対照群に対する百分率(%)を示したもの。

2500及び25000ppm群の雌雄において肝臓の絶対重量が有意に増加した。2500ppmの雌、25000ppm群の雌雄において肝臓の対体重比も増加した。また、25000ppm群の雄において腎臓の対体重比が減少し、25000ppm群の雌では甲状腺の対体重比が増加した。これらの臓器重量の変動と関連するような病理組織学的所見は観察されなかった。

肉眼的病理検査：全動物について剖検を行った。

対照群と比較して統計学的に有意差の認められた所見はなかった。

病理組織学的検査：全動物を対象として、以下の組織について病理標本を作製し、検鏡した。

全ての肉眼的異常部位、脳、下垂体、甲状腺、上皮上体、胸腺、気管、肺、心臓、大動脈、唾液腺(顎下腺及び耳下腺)、肝臓、胆嚢、脾臓、腎臓(両側)、副腎(皮質及び髓質)、膵臓、精巣(両側)、精巣上体(両側)、卵巣(両側)、卵管(両側)、子宮/膣、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、リンパ節(腸間膜及び腋窩)、骨格筋、坐骨神経、脊髓(頸部、胸部、腰部)、胸骨(骨髓を含む)、骨髓(大腿骨)、眼(両側)、前立腺、乳腺(雌)、皮膚。

検体に関連する病理組織学的変化は観察されなかった。

以上のとおり、本剤のイヌに対する3ヵ月間混餌経口反復投与毒性試験における毒性影響として、25000ppm群において雌雄における初期の体重減少・体重増加抑制、雄における摂餌量のわずかな減少、雌雄における食餌効率のわずかな減少、雌雄における淡褐色便(一部軟便)、雌雄のアルカリホスファターゼ及びトリグリセリドの増加、雌の赤血球数及び

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Boscalid

血色素量の減少，雌雄の肝重量の増加，雌の甲状腺重量の増加が認められ，2500ppm 群において一過性の淡褐色便（雄 3 例，雌 3 例，一部軟便），雌の血清アルカリホスファターゼ活性の増加，雌雄の肝重量の増加が認められた。250ppm の投与では，検体投与に関連する変化は認められなかった。

したがって，本試験における無毒性量は 250ppm（雄：7.6mg/kg 体重/日，雌：8.1mg/kg 体重/日）と判断される。

6) 反復経口投与神経毒性試験

Wistar 系ラットにおける 90 日間経口神経毒性試験

(資料 12)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2001 年

検体純度:

供試動物: Wistar 系 SPF ラット [Chbb: THOM], 1 群雌雄各 10 匹, 検体投与開始時 49 日齢,
検体投与開始時の体重範囲 (雄: 232~271g, 平均 248g, 雌: 159~194g, 平均 177g)

投与期間: 3 ヶ月 (1999 年 2 月 22 日~1999 年 5 月 28 日)

投与方法: 検体を 0, 150, 1500 及び 15000ppm の用量で飼料に混合し, 3 ヶ月間にわたって
随時摂食させた. 検体を混入した飼料は検体の飼料中での安定性が保証されている
間隔で行った.

投与量設定根拠:

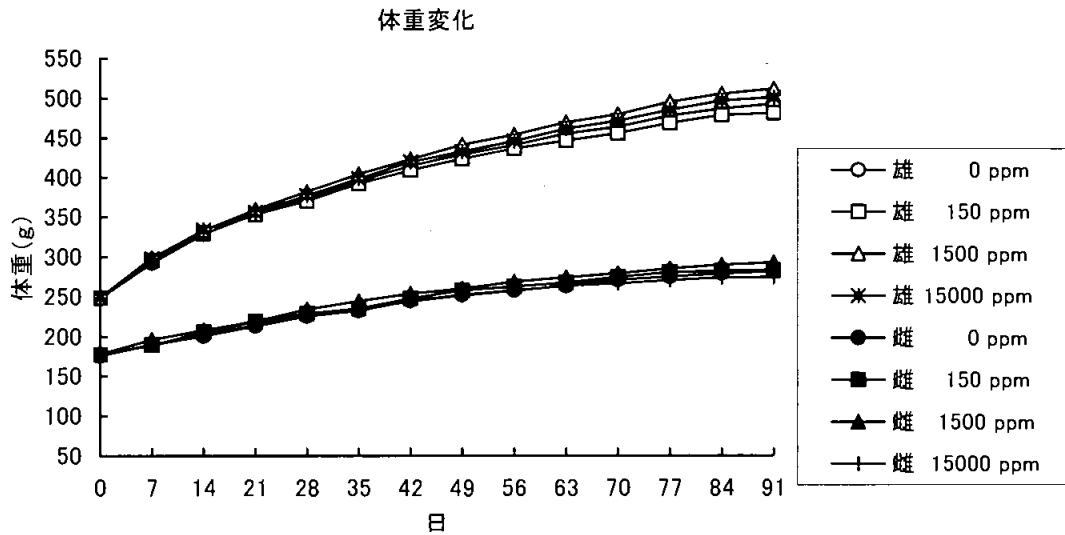
観察・検査項目及び結果:

一般状態: 一般状態を 1 日 2 回 (土曜, 日曜, 祝日は 1 日 1 回) 観察した. さらに触診
を含む詳細な観察を週 1 回行った.

検体投与に関連する一般状態の異常及び死亡は認められなかった.

体重変化: 各用量群へ動物を配分するため第 1 回の機能検査前 (投与 11 日前~14 日
前), 投与開始日, 投与後は週 1 回体重を測定し, さらに投与 22, 50, 85 及び
91 日後にも測定した. 平均体重変化を次頁に示す.

検体投与に関連する影響は認められなかった [統計学的解析法は一元配置分散分
析 (ANOVA) 及び Dunnett 検定].



摂餌量及び食餌効率；全動物の摂餌量を週1回測定し、さらに食餌効率を算出した。

摂餌量においては検体投与に関連する影響は認められなかった。

食餌効率においては対照群と比較して投与63日の低用量群の雄に統計学的に有意な減少が認められた(下表)。他に発生のないことから偶発的なものと判断された。

性別	雄			雌		
投与量 (ppm)	150	1500	15000	150	1500	15000
投与 63 日	↓ 68					

Anova 及び Dunnett 検定 (両側) ↓: $p < 0.05$

表中の数値は、変動の目安として群平均値の対照群に対する変動率(%)を示したもの

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。

投与量 (ppm)		150	1500	15000
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	10.5	103.1	1050.0
	雌	12.7	124.5	1272.5

詳細な状態の観察及び機能検査 (FOB)；全動物を対象に、検体投与 7 日前、投与 22、50 及び 85 日後に FOB を実施した。

FOB における観察項目

1) ホームケージ内観察

- ・姿勢
- ・振戦
- ・痙攣
- ・異常運動
- ・歩行異常
- ・その他の異常

2) オープンフィールド観察 (50 cm × 50 cm, 高さ 25 cm)

- ・ケージから取り出した時の行動
- ・被毛
- ・皮膚
- ・姿勢
- ・唾液分泌
- ・呼吸
- ・活動/覚醒レベル
- ・振戦
- ・痙攣
- ・異常行動
- ・歩行異常
- ・流涙
- ・眼瞼閉鎖
- ・眼球突出
- ・糞 (糞塊数, 外観, 硬さ)
- ・尿 (量, 色)
- ・立ち上がり回数

3) 感覚運動検査/反射

- ・接近反応
- ・触覚反応
- ・視覚
- ・瞳孔反射
- ・眼瞼反射
- ・耳介反射
- ・聴覚 (驚愕反応)
- ・嗅覚
- ・カタレプシー検査
- ・運動協調性 (立ち直り反応)
- ・ハンドリング中の行動
- ・発声
- ・痛覚反応 (テイルピンチ)
- ・前肢握力
- ・後肢握力
- ・着地時開脚幅

FOB において観察された所見はいずれも対照群と投与群間で同程度に発生したか、または 1 例のみに発生したものであり、自然発生した偶発的なものと考えられた。

定量的観察項目 (糞, 立ち上がり, 握力, 着地時開脚幅) に検体投与に関連した影響は認められなかった。

運動量測定; 全動物を対象に, FOB 検査と同じ日 (被験物質投与 7 日前, 投与 22, 50 及び 85 日後) に運動量を測定した。

運動量の総量では投与 7 日前の中用量群の雌に統計学的に有意な上昇が認められたが他に発生のないこと及び/あるいは用量-相関性を欠くことから偶発的なものと判断された。また, 1 回当たりの運動量において統計学的に有意な変化が投与 7 日前及び投与 85 日の高用量群の雄, 中用量群の雄, 投与 50 及び 85 日の高用量群の雌に認められた。散発的に発生していること, 用量相関性を欠くことから偶発的なものと判断された (Kruskal-Wallis 及び Mann-Whitney U 検定 (両側))。

病理学的検査；被験物質投与 92 日後に各群各性 5 匹の動物を灌流固定し、肉眼的病理検査を行い、脳重量を測定した。さらに下記の臓器/組織を摘出し、対照群及び高用量群について神経病理学的検査を行った。

末梢神経系；	背側根神経節 (C3-C6)	背側根神経 (C3-C6)
	腹側根神経 (C3-C6)	背側根神経節 (L1-L4)
	背側根神経 (L1-L4)	腹側根神経 (L1-L4)
	近位座骨神経	脛骨神経 (膝部)
	腓腹神経 (膝部)	
脳 (横断面)；	前頭葉	頭頭葉 (間脳を含む)
	中脳 (後頭葉, 側頂葉を含む)	橋
	小脳	延髄
脊髄 (横断面)；	頸部膨大部 (C3-C6)	腰部膨大部 (L1-L4)
末梢神経系；	ガッサー神経節	腓腹筋

肉眼的異常ならびに脳重量の変化は認められなかった。

高用量群の雌雄各 1 例に腰部神経節の軸索変性 (程度 1) が観察されたが、中枢神経系のみならず末梢神経系にも神経の病変は全くなく、一連の機能観察試験及び自発運動測定中に神経毒性作用は全くみられていないことから、この腰部軸索変性は自然発生性であり、投与に関連したものではないと考えられた。

以上のとおり、本試験では、いかなる用量においても死亡及び臨床症状は認められず、体重増加ならびに摂餌量にも検体投与による影響は認められなかった。神経毒性を示す所見は一般状態観察、機能検査、運動量の測定及び神経病理学的検査の何れにおいても観察されなかった。高用量群の雌雄各 1 例に腰神経節の軸索変性が認められたが、自然発生性であり、投与に関連したものではないと考えられた。

これらのことより、本試験条件下における無影響量 (NOEL) は、15000ppm (雄 1050.0mg/kg 体重/日、雌 1272.5mg/kg 体重/日) であると判断される。

7) 1 又は 2 年間反復経口投与毒性及び発がん性試験

7-1) イヌを用いた飼料混入投与による慢性毒性

(資料 13)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2000 年

検体純度:

供試動物: 純系ビーグル犬, 1 群雌雄各 5 匹, 開始時 7~8 ヶ月齢, 試験開始時体重
範囲(雄; 10.0~14.5kg, 雌; 8.8~12.7kg)

投与期間: 12 ヶ月間(1998 年 10 月 13 日~1999 年 10 月 13~21 日)

投与方法: 検体を 0, 200, 800, 2000 及び 20000ppm の濃度で飼料に混入し, 12 ヶ月
間にわたって随時摂食させた. 検体を混入した飼料は 2 週間に 1 回調製した.

用量設定根拠:

観察・検査項目及び結果:

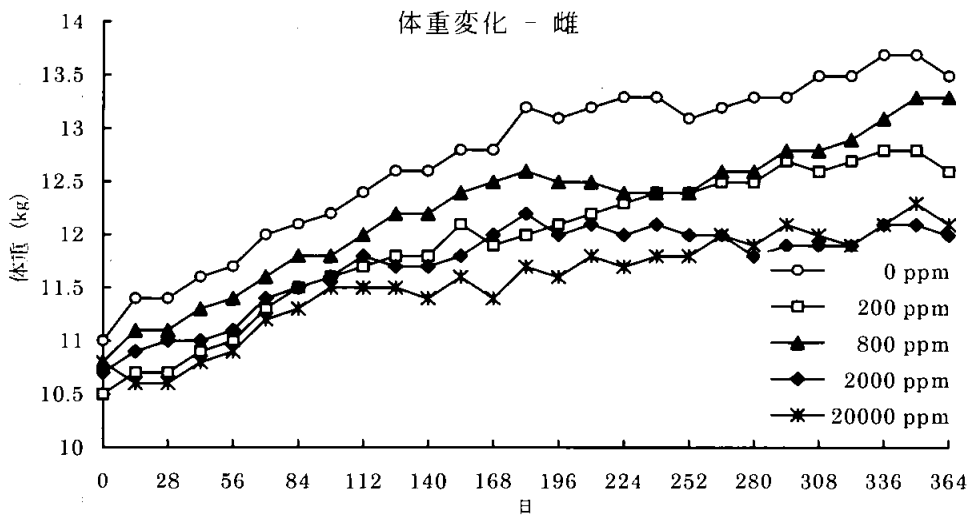
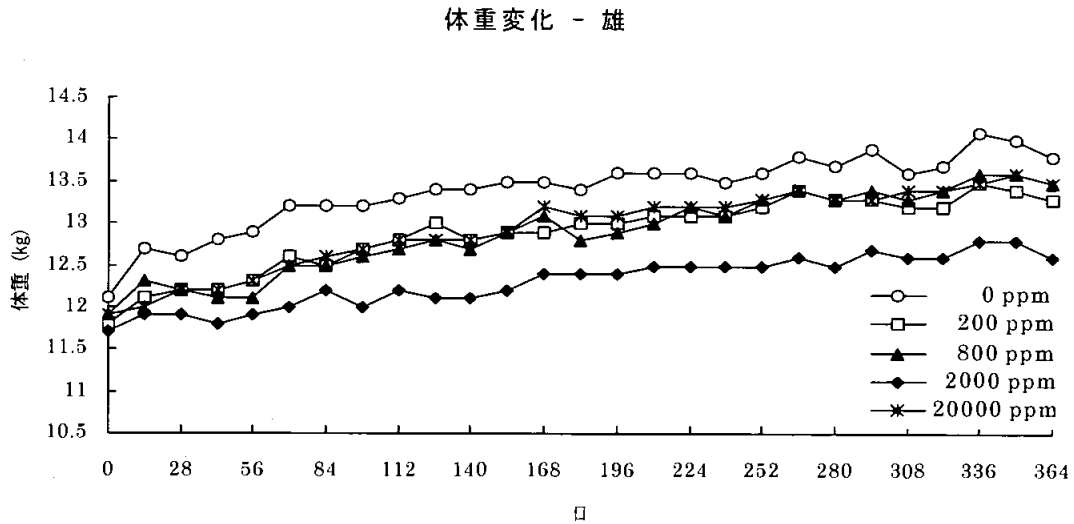
一般状態及び死亡率; 一般状態及び生死を毎日観察した.

投与期間中, 死亡は認められなかった.

20000ppm 群の全動物において投与開始から投与 350 日まで淡褐色軟便が観察さ
れた. 雌雄各 1 例においては剖検前日まで観察されていた. これは検体投与の影
響と考えられた.

体重変化; 全動物について週 1 回体重を測定した.

平均体重変化を次図に示す。



体重は、雌雄いずれの投与群においても対照群と比較して統計学的に有意な変化は認められなかった。

体重増加は、2000及び20000ppm群の雄において、投与14日目に有意に減少した。さらに、2000ppm群では統計学的有意ではないものの投与期間を通して平均体重増加が抑制された。しかし20000ppm群では投与期間を通して抑制は認められなかったことから、投与14日目にみられた統計学的有意差は偶発的なもので、検体投与に関係しないものと思われた。雌では、20000ppm群において投与7日目及び14日目に平均体重増加の有意な減少が認められ、全投与期間を通して体重増加抑制が認められた。2000ppm群の雌においても体重増加抑制が認められた。これらの影響は検体投与に起因するものと考えられた。

摂餌量及び食餌効率：全動物の摂餌量を毎日測定し、食餌効率も算出した。

投与期間中の平均摂餌量 (%) を次表に示す。

表 1. 平均摂餌量

投与量 (ppm)		0	200	800	2000	20000
平均摂餌量 (%)	雄	100	100	100*	100	100*
	雌	97	98	96	98	97

* 四捨五入により 100 の値となった

表中の数値は給餌量に対する飼料摂取量の割合 (%)

摂餌量に検体投与の影響は認められなかった。

2000 及び 20000ppm 群の雌において食餌効率が低下した。

検体摂取量；投与期間中の 1 日当たりの平均検体摂取量は以下の通りであった。

表 2. 平均検体摂取量

投与量 (ppm)		200	800	2000	20000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	5.5	21.8	57.4	544.0
	雌	5.8	22.1	58.3	592.9

血液学的検査；投与開始前、投与 3、6 及び 12 ヶ月後に全生存動物を対象として、前腕橈側皮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、血色素量、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)、血小板数、型別白血球数、活性化部分トロンボプラスチン時間 (PTT)、プロトロンビン時間 (QT)

いずれの検査項目、検査時期においても検体投与の影響を示すような変化は認められなかった。20000ppm 群の雌においてプロトロンビン時間 (QT) が統計学的に有意に増加したが ($p \leq 0.02$, Kruskal-Wallis 検定及び Mann-Whitney U 検定 (両側)), 単発的な発生であり検体投与の影響とは考えられなかった。

血液生化学的検査；血液学的検査で使用した血液から得られた血清を用い、以下の項目の測定を行った。

アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アルカリホスファターゼ (ALP)、血清- γ -グルタミルトランスフェラーゼ (SGGT)、血糖、総ビリルビン、コレステロール、クレアチニン、尿素、総蛋白、アルブミン、グロブリン、ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン、マグネシウム、トリグリセリド

統計学的有意差の認められた項目を表 3 に示す。

表 3. 血液生化学的検査

検査項目	検査時期 (月)	用量群 (ppm)							
		雄				雌			
		200	800	2000	20000	200	800	2000	20000
ALT	3			↓ 54	↓ 47				↓ 49
	6			↓ 42	↓ 42		↑ 160		
	12			↓ 57	↓ 52				
AST	3								↓ 67
ALP	3			↑ 184	↑ 241				↑ 276
	6			↑ 199	↑ 268				↑ 296
	12				↑ 238				↑ 335
SGGT	6		↓ 78						
塩素	3				↓ 98				↓ 97
総ビリルビン	12							↓ 65	
総蛋白	3								↑ 108
	6								↑ 108
グロブリン	3								↑ 116
トリグリセリド	3				↑ 181		↑ 133		↑ 177
	6			↑ 150	↑ 165				
	12				↑ 150				
コレステロール	3						↑ 127		↑ 160

Kruskal-Wallis 検定及び Mann-Whitney U 検定(両側) ↓: $p \leq 0.05$, ↑↓: $p \leq 0.02$, ↑↑: $p \leq 0.002$
 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。

血清酵素検査の結果、アラニンアミノトランスフェラーゼ活性(ALT)が 20000 及び 2000ppm 群の雄において全検査時期で有意に減少し、20000ppm 群の雌でも投与 3 ヶ月後の検査において有意に減少した。アルカリホスファターゼ活性(ALP)の有意な増加が 20000ppm 群の雌雄において全検査時期において認められ、雄では 2000ppm 群においても投与 3 及び 6 ヶ月後の検査で有意に増加した。投与 3 ヶ月後にアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性(AST)の有意な減少が 20000ppm 群の雌に認められた。

血液生化学的検査の結果、20000ppm 群の雄において投与 3 ヶ月後に塩素濃度が有意に減少し、全検査時期でトリグリセリドが増加した。20000ppm 群の雌では投与 3 ヶ月後に総蛋白、グロブリン、トリグリセリド及びコレステロールの増加及び塩素濃度の減少が認められ、投与 6 ヶ月後にも総蛋白の有意な増加が認められた。

その他、いくつかの項目において統計学的有意差がみられたが、いずれも単発的で雌雄の整合性がないことから偶発的なものと考えられた。

尿検査：投与開始前、投与 3、6、12 ヶ月後に全動物から採取した尿について以下の項目を検査した。

尿量、色、濁度、亜硝酸塩、pH、蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビン、潜血、尿比重、尿沈査

検体投与に関連する変化は認められなかった (Fisher の直接確率計算法)。

眼科学的検査：投与開始前および投与期間終了時に、全動物について検査した。

検体投与に関連する異常は認められなかった。

臓器重量：投与終了時の全生存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、肝臓、腎臓(両側)、副腎、精巣/卵巣(両側)、精巣上体(両側)、甲状腺

次表に統計学的有意差の認められた項目を示す。

表 4. 臓器重量

性 別		雄				雌			
		200	800	2000	20000	200	800	2000	20000
肝 臓	絶対重量		103	118	130		107	109	↑ 142
	相対重量		105	129	132		108	↑ 123	↑ 155
甲状腺	絶対重量			↑ 139	↑ 154				
	相対重量			↑ 143	↑ 157				↑ 144

Kruskal-Wallis 検定及び Wilcoxon 検定(両側)↑↓: $p \leq 0.05$, ↑↓: $p \leq 0.01$

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

表中 ↑↓ のない数値に有意差はない。

20000ppm 群の雌において肝臓の絶対重量及び対体重比が有意に増加し、2000ppm 群では対体重比が有意に増加した。2000 及び 20000ppm 群の雄において甲状腺の絶対重量及び対体重比が統計学的に有意に増加した。20000ppm 群の雌においても甲状腺重量の対体重比が有意に増加した。

肉眼的病理検査：全動物について剖検を行った。

いずれの投与群においても対照群と比較して統計学的に有意差の認められた所見はなく (Fisher の直接確率計算法、申請者実施)、また検体投与の影響と思われる所見も観察されなかった。

病理組織学的検査：全動物を対象として、以下の組織について病理標本作製し、検鏡した。

全ての肉眼的異常部位、脳、下垂体、甲状腺、上皮上体、胸腺、気管、肺、心臓、大動脈、唾液腺(顎下腺及び耳下腺)、肝臓、胆嚢、脾臓、腎臓(両側)、副腎(皮質及び髄質)、膵臓、精巣(両側)、精巣上体(両側)、卵巣(両側)、卵管(両側)、子宮/膣、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、リンパ節(腸間膜及び腋窩)、骨格筋、坐骨神経、脊髓(頸部、胸部、腰部)、胸骨(骨髓

を含む)、骨髄(大腿骨)、眼(両側)、前立腺、乳腺(雌)、皮膚。

統計学的有意差の認められた所見を下表に示す。

表 5. 主な病理組織学的所見所見

性 別		雄					雌				
		投与量 (ppm)					投与量 (ppm)				
臓 器	所見/検査例数	0	200	800	2000	20000	0	200	800	2000	20000
甲 状 腺	C 細胞過形成 瀰漫性	0	↑ 4	1	0	2	1	1	1	0	1

Fisher の直接確率計算法 1 ↓, $p \leq 0.05$; ↑↓, $p \leq 0.01$ (申請者実施)

検体投与に関連する病理組織学的変化は観察されなかった。また、臓器重量が有意に増加した臓器についても関連するような所見は認められなかった。200ppm 群の雄において甲状腺の瀰漫性 C 細胞過形成が統計学的に有意に増加したが ($p \leq 0.05$, Fisher の直接確率計算法, 申請者実施), 低用量群のみで増加していることから偶発的なものと考えられた。

以上のとおり、本剤のイヌに対する 1 年間反復経口投与毒性試験における毒性影響として、20000ppm 群では雌における体重増加抑制、食餌効率のわずかな減少、雌雄における淡褐色軟便、雌雄のアルカリホスファターゼ及びトリグリセリドの増加、雌の肝重量の増加、雌雄の甲状腺重量の増加が認められた。2000 ppm 群では雌における体重増加抑制ならびに食餌効率の低下、雄におけるアルカリホスファターゼ活性の増加、雌の肝重量の増加、雄の甲状腺重量の増加が認められた。肝重量の増加に関連する病理組織学的所見は認められなかったが、血清アルカリホスファターゼの増加が観察されたことから、重量の増加は肝臓のミクロソーム酵素誘導に起因するものと考えられた。甲状腺重量の増加については臨床的、血液生化学的または病理形態学的変化に関連は認められなかった。

200 及び 800ppm の投与では、検体投与に関連する変化は認められなかった。

したがって、本試験における無毒性量は 800ppm (雄; 21.8mg/kg 体重/日, 雌; 22.1mg/kg 体重/日) と判断される。

7-2) Wistar 系ラットにおける 24 ヶ月間経口慢性毒性試験

(資料 14)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2001 年

検体純度:

試験動物: Wistar 系 Chbb:THOM ラット, 1 群雌雄各 20 匹, 開始時雌雄 42 日齢, 試験開始時体重範囲(雄: 163.5~206.2g, 雌: 114.4~156.9g)

試験期間: 24 ヶ月間(1998 年 1 月 27 日~2000 年 2 月 8 日)

投与方法: 検体を 0, 100, 500, 2500 及び 15000ppm の濃度で飼料に混入し, 24 ヶ月間にわたって随時摂食させた。検体を混入した飼料は毎週調製した。

しかし, 15000ppm 群の動物は投与による低体重及び一般状態不良のため 17 ヶ月目に屠殺し, 剖検を含め諸検査を実施しなかった。

投与量設定根拠:

試験項目及び結果:

一般状態及び死亡率: 一般状態及び生死を毎日観察した。さらに週 1 回, 触診を含む詳細な臨床症状を観察した。

15000ppm 群の動物は投与による低体重及び一般状態不良のため 17 ヶ月目に屠殺した。

2500ppm 以下の投与群に検体投与に関連する一般状態の異常及び死亡は認められなかった。

表 1 に各群雌雄の死亡動物数を示す。2500ppm 群雌の死亡動物数が対照群に比し有意に減少したが、検体投与との関係は明らかでなかった。

表 1. 死亡動物数

性 別	雄				雌			
用量群 (ppm)	0	100	500	2500	0	100	500	2500
検査動物数	20	20	20	20	20	20	20	20
死亡動物数	5	4	6	6	7	3	7	1*

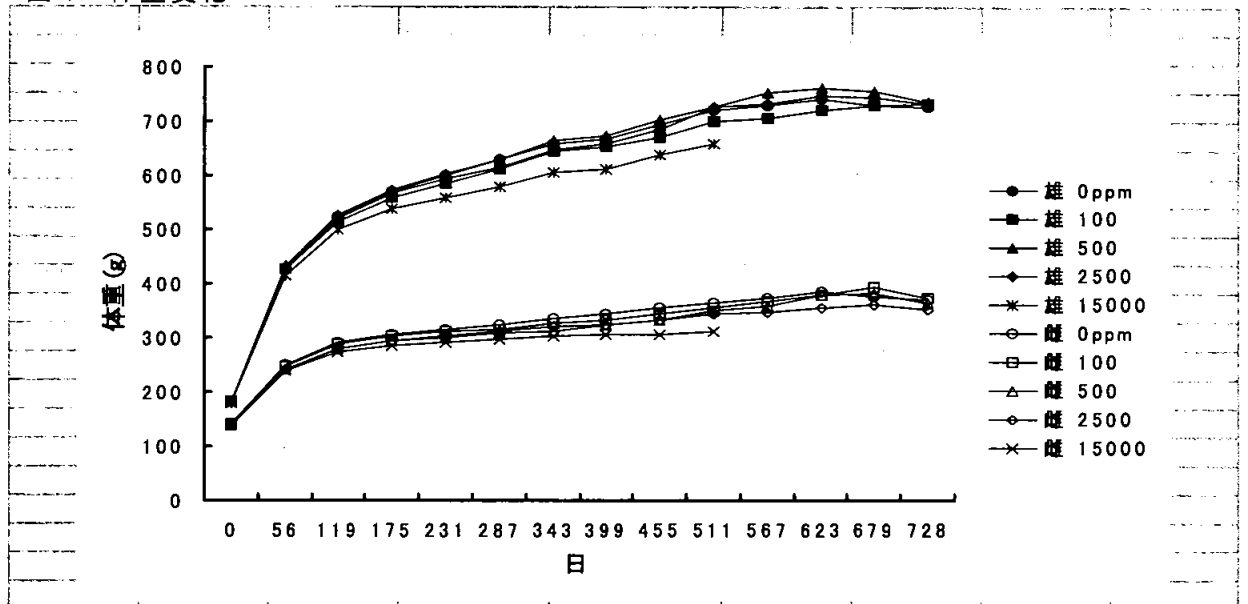
有意差検定：* $p < 0.05$ (Fisher の直接確率計算法、申請者実施)

体重変化：

全動物について、投与開始から 13 週までは毎週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回の頻度で、さらに剖検前に体重を測定した。

体重変化を図 1 に示す。

図 1. 体重変化



15000ppm 群の雌雄において体重増加抑制が顕著に認められ、17 ヶ月目には対照群に比し雄は 8.5%、雌は 14.4% の低値を示し、また、体重増加も雄で 11.2%、雌で 21.3% 低下した。この時点で試験続行は無意味と判断し投与を中止し、動物を屠殺した。2500ppm 以下の投与群雌雄の体重と体重増加に投与群と対照群の差はなかった。

摂餌量及び食餌効率；全動物の摂餌量を投与期間最初の 13 週間は毎週測定し、その後は 4 週毎に、また、剖検前に測定した。食餌効率も算出した。

対照群と比較して統計学的有意差の認められた測定日を表 2 に示す。

表 2. 摂餌量

試験日/ 投与群 (ppm)	雄				雌			
	100	500	2500	15000	100	500	2500	15000
試験 147 日								↑107
試験 175 日						↑105	↑105	↑107
試験 203 日					↑107	↑108	↑108	↑109
試験 483 日				↓ 91				
試験 17 カ月目				↓ 93				

統計学的有意差：↑↓ $p \leq 0.05$ (Anova 及び Dunnett の t 検定, 両側)
表中の数値は対照群に対する変動率 (%)

上表のように雌雄において、摂餌量の変動が散見されたが、連続性がないことから投与に関連はないと判断された。

飼料効率においても同様に有意な変化 (増加あるいは減少) が散見されたが連続性がないことから投与に関連はないと判断された。

検体摂取量；全投与期間における 1 日あたり平均検体摂取量 (mg/kg 体重) を次表に示す。

表 3. 1 日あたり平均検体摂取量

投与群	投与濃度 (ppm)	検体摂取量, mg/kg 体重	
		雄	雌
1	100	4.4	5.9
2	500	21.9	30.0
3	2500	110.0	150.3

平均検体摂取量の計算に供す測定間隔を一定にするため、試験 7, 35, 63, 91 並びに 119 ~ 707 日までの測定値のみを用いた。

血液学的検査；投与開始後 3 カ月, 6 カ月, 12 カ月目に非絶食動物から、また 13 カ月, 18 カ月及び 24 カ月目に一晚絶食した動物について眼窩静脈叢から採血した。これらの血液について以下の項目を測定した。なお、15000ppm 群は 17 カ月目に全生存例を屠殺したので評価の対象にできなかった。

ヘマトクリット値 (PCV), 血色素量 (HB), 赤血球数 (RBC), 白血球 (WBC) 及び白血球型別百分率並びに異常細胞, 血小板数 (PLAT), 平均赤血球素濃度 (MCHC), 平均赤血球血色素量 (MCH), 平均赤血球容積 (MCV), 網赤血球数 (Retic), メトヘモグロビン (MetHB), プロトロンビン時間 (PT)

さらに、対照群と 15000ppm 群について、雌雄それぞれ投与後 366/365 日まで網赤血球数を測定したが、統計学的有意差はみられなかった。

表 4 に統計学的有意差の認められた項目を示す。

表 4. 血液学的検査成績

検査項目	検査日	用量群 (ppm)							
		雄				雌			
		100	500	2500	15000	100	500	2500	15000
白血球数	86				↓ 84				
	176				↓ 91				
	365				↓ 76				
	721				- ^a	↑170			-
赤血球数	86				↑105				
	176				↑107				
	365		↑103		↑105				
血色素量	87								↓ 96
	177								↓ 98
	366								↓ 94
ヘマトクリット	86/87				↑103			↓ 97	↓ 96
	366								↓ 95
平均赤血球容積 (MCV)	86/87		↓ 98					↓ 98	↓ 98
	365/366		↓ 97		↓ 97			↓ 98	↓ 98
	547/548		↓ 98		-			↓ 97	-
平均赤血球血色素量 (MCH)	87								↓ 97
	177								↓ 98
	365/366		↓ 98		↓ 97			↓ 97	↓ 97
	547		↓ 96		-				-
血小板数	87								↑109
プロトロンビン時間	86/87				↑111		↓ 96	↓ 93	↓ 91
	176/177				↑109				↓ 87
	366								↓ 94

^a: 17 カ月目に全例屠殺したため検査せず

表中の数字は対照群に対する変動率

統計学的有意差: ↑↓ P<0.05, ↓↑ P<0.01 (Anova 及び Dunnett の t 検定, 両側)

2500ppm 群の雌において、一部の検査時にヘマトクリット、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量及びプロトロンビン時間が低下した。

500ppm 群の雌において、一部の検査時にプロトロンビン時間が低下した。

100ppm 群の雌及び雄の投与群に異常を認めなかった。

血液生化学的検査：血液学的検査に供した血液の血清を用い以下の項目を検査した。なお、15000ppm 群については屠殺までの検査結果を参考までに示したが評価の対象に示なかった。

アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)*, アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)*, アルカリホスファターゼ (ALP)*, γ-グルタミルトランスフェラーゼ (SGGT)*, ナトリウム, カリウム, 塩素, 無機リン, カルシウム, 尿素窒素, クレアチニン, 血糖, 総ビリルビン*, 総蛋白*, アルブミン*, グロブリン*, トリグリセリド*, コレステロール*, マグネシウム

*: 投与後 395 日 (雄) 及び 投与後 400 日 (雌) にも眼窩静脈叢から採血し測定した。

表 5 に統計学的有意差の認められた項目を示す。

表 5. 血液生化学的検査成績

検査項目	検査日	用量群 (ppm)							
		雄				雌			
		100	500	2500	15000	100	500	2500	15000
ALT	87							↓ 85	↓ 87
	176/177			↓ 86	↓ 81	↓ 88	↓ 88	↓ 79	↓ 77
	365/366				↓ 84	↓ 81	↓ 79	↓ 76	↓ 70
	395/400				↓ 82			↓ 88	↓ 86
	547			↓ 76	- ^a				-
AST	177							↓ 74	↓ 69
	366					↓ 76			↓ 72
ALP	86/87		↓ 88	↓ 77	↓ 76		↓ 86	↓ 76	↓ 77
	176/177		↓ 89	↓ 74	↓ 62			↓ 79	↓ 74
	365/366			↓ 71	↓ 64			↓ 74	↓ 67
	395/400			↓ 86	↓ 78			↓ 87	↓ 89
	547/548			↓ 79	- ^a			↓ 83	-
	720/721			↓ 72	-	↑ 134	↑ 124		-
SGGT	86/87	↑ 225	↑ 275	↑ 325	↑ 2100			↑ 257	↑ 971
	176/177		↑ 121	↑ 171	↑ 404	0 ^b	1	0	↑ 26
	365/366		↑ 143	↑ 243	↑ 779			↑ 167	↑ 375
	395/400			↑ 1800	↑ 7500				↑ 600
	547			↑ 205	-				-
	720			↑ 142	-				-
カリウム	176				↑ 105				
塩素	548				-			↓ 98	-
無機リン	86		↓ 95	↓ 91	↓ 94				
	365/366		↑ 101					↑ 103	↑ 104
カルシウム	548				-			↑ 104	-
	721				-	↑ 103		↑ 104	-
尿素窒素	721				-	↑ 130			-
クレアチニン	366					↑ 105		↑ 106	↑ 107
血糖	365	↑ 107	↑ 107	↑ 106					

^a: 17 ヶ月目に全例屠殺したため検査せず

^b: 対照群の値が「0」のため、投与群の値は実数を示す。

表中の数字は対照群に対する変動率(%)

統計学的有意差: ↓ p<0.05, ↓↑ p<0.02 (Anova 及び Dunnett の t 検定, 両側)

表 5. 血液生化学的検査成績(つづき)

検査項目	検査日	用量群 (ppm)							
		雄				雌			
		100	500	2500	15000	100	500	2500	15000
総ビリルビン	86/87				↓ 72	↓ 88	↓ 77	↓ 71	↓ 71
	176			↓ 70	↓ 71				
	365		↓ 66	↓ 55	↓ 69				
	395/400			↓ 80	↓ 67	↓ 88	↓ 80	↓ 71	↓ 74
	547		↓ 82	↓ 76	-				-
	720/721			↓ 75	-			↓ 79	-
総蛋白	86/87			↑ 104	↑ 107			↑ 104	↑ 105
	176/177			↑ 103	↑ 104				↑ 106
	365/366				↑ 106			↑ 105	↑ 107
	395/400			↑ 103	↑ 106			↑ 106	↑ 108
	548				- ^a			↑ 107	-
	721				-			↑ 105	-
アルブミン	86				↑ 104				
	365				↑ 106				
	395				↑ 105				
	720	↑ 107		↑ 106	-				-
グロブリン	86/87			↑ 107	↑ 112			↑ 107	↑ 113
	176/177			↑ 104	↑ 107				↑ 111
	365/366				↑ 106			↑ 106	↑ 111
	395/400			↑ 104	↑ 106			↑ 107	↑ 112
	548				-			↑ 109	-
トリグリセリド	86				↓ 95				
	176/177				↓ 70		↓ 70		↓ 56
	365/366				↓ 60				↓ 66
	395/400	↑ 126							↓ 64
コレステロール	86/87				↑ 107			↑ 118	↑ 139
	177								↑ 132
	366							↑ 119	↑ 144
	395/400			↑ 114	↑ 112		↑ 117	↑ 133	↑ 161
	548				-			↑ 118	-

^a: 17ヵ月目に全例屠殺したため検査せず

表中の数字は対照群に対する変動率(%)

統計学的有意差: ↓ p<0.05, ↓↑ p<0.02 (Anova 及び Dunnett の t 検定, 両側)

表示したごとく多くの項目に対照群と投与群間に有意な変動が観察されたが、血液生化学的検査における主たる所見は検体投与による肝臓のミクロソーム酵素誘導に伴う変化と考えられる。

γ-グルタミルトランスフェラーゼ、総蛋白、アルブミン、グロブリン及びコレステロールの変化は肝臓における臓器内の酵素、凝固因子、種々の蛋白並びにコレステロール合成への影響を示すものである。

総ビリルビンの低下は肝臓における“第Ⅱ相”酵素誘導によるビリルビン排泄増加に起因するものと判断した。

これらの判断を検証するため肝臓酵素誘導を検索したメカニズム試験(資料 26 参照)を行ったところ、異物代謝に関与する種々の酵素が誘導された。従って、表中の全ての変化は、肝臓におけるミクロソーム酵素誘導によりもたらされたと考えらる。

病理組織学的に小葉中心性肝細胞肥大あるいは好酸性肝細胞小増殖巣の増加が500ppmあるいは2500ppm群の雌雄で認められており、100ppmでは何ら肝臓障害は認められていない。従って、肝ミクロソーム酵素誘導の影響は異物による刺激に対応する適応性代謝反応と解釈されるため、肝臓への影響が認められない100ppm群は毒性影響ではないと判断した。

アラニン及びアスパラギン酸トランスフェラーゼ並びにアルカリホスファターゼの減少も検体投与の影響と考えられる。しかし、これらの血清中酵素活性低下は毒性に関連する悪影響とは一般的にみなされていない。

検体投与の影響と判断した変化は以下のとおりである。

2500ppm群：

- ・雌雄における γ -グルタミルトランスフェラーゼ、総蛋白、グロブリンおよびコレステロールの増加、雄におけるアルブミンの増加。
- ・雌雄におけるアラニンアミノトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼ及び総ビリルビンの減少、雌におけるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの減少

500ppm群：

- ・雌におけるコレステロールの増加
- ・雌雄におけるアルカリホスファターゼ及び総ビリルビンの減少

100ppm群：検体投与による変化はない。

尿検査：血液学的検査と同時期に採取した尿について以下の項目を検査した。

尿量、尿色、濁度、亜硝酸塩、pH、蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビン、潜血、比重、沈渣

尿検査に検体投与の影響はなかった。

眼科学的検査：投与開始前1回雌雄の全動物について、また、投与期間終了直前に対照群及び2500ppm群雌雄の全生存例について眼科学的検査を実施した。

眼科学的検査に検体投与の影響はなかった。

臓器重量；投与終了時の全生存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。

肝臓，腎臓（両側），精巣/卵巣（両側），脳，副腎，甲状腺

統計学的有意差の認められた項目を表 6 に示す。

表 6. 臓器重量

検査項目		投与群 (ppm)					
		雄			雌		
		100	500	2500	100	500	2500
肝	相対重量						↑111
甲状腺	絶対重量			↑116			

表中の数字は対照群に対する変動率

統計学的有意差：↑ $p \leq 0.05$ ；↑↑ $p \leq 0.01$ (Kruskal-Wallis 検定及び Wilcoxon 検定，両側)

2500ppm 群雄で甲状腺の絶対重量が増加し，雌では肝臓の相対重量が増加した。これらの動物の病理組織学的検査において，甲状腺に濾胞細胞過形成及び瀰漫性濾胞細胞肥大が観察され，肝臓には小葉中心性肝細胞肥大が認められた。

500ppm 以下の投与群雌雄の臓器重量に対照群との差はなかった。

肉眼的病理検査；途中死亡，切迫屠殺，試験終了時の全生存動物について剖検した。

表 7 に主な肉眼所見を示す。

表 7. 主な肉眼所見

性 別		雄				雌			
		0	100	500	2500	0	100	500	2500
用量群 (ppm)		0	100	500	2500	0	100	500	2500
臓 器	所見/検査動物数	20	20	20	20	20	20	20	20
精 巣	嚢胞状変化	2	3	2	↑9	-	-	-	-
臓 器	所見/検査動物数	20	20	20	20	20	20	20	20
甲 状 腺	肥大	0	0	1	1	0	0	1	0
	斑点	0	0	1	3	0	1	0	1

統計学的有意差：↑ $p < 0.05$ (Fisher の直接確率計算法，申請者実施)

2500ppm 群の雄に精巣嚢胞状変化が増加した。病理組織学的検査においてこれらの動物には瀰漫性精細管萎縮及び/又は間細胞腫が観察されたが，いずれも本系統老齢雄ラットに通常認められる病変であり，かつ，それらの病変の程度・頻度に対照群との差がなかったところから，本肉眼病変の増加は偶発的変化と判断した。

500及び2500ppm 群雄の数例に甲状腺肥大あるいは斑点が観察された。病理組織学的検査では，500ppm 群の所見は濾胞細胞腺腫に対応し，2500ppm 群の肥大は濾胞細胞腺腫，斑点の1例は濾胞細胞過形成であった。

投与群に観察されたその他の所見は、いずれも本系統老齢ラットに通常認められる変化であり、それらの発生頻度に対照群と投与群間に差は見られなかった。

病理組織学的検査：対照群及び 2500ppm 群の全動物、並びにその他の投与群の試験途中死亡・切迫殺動物を対象として、以下の組織について病理標本を作製し、鏡検した。

全ての肉眼的異常部位、脳、下垂体、甲状腺/上皮上体、胸腺、気管、肺、心臓、大動脈、唾液腺(顎下腺および舌下腺)、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膵臓、精巣/卵巣、子宮、膈、卵管、精巣上体、前立腺、精嚢、皮膚、食道、胃(前胃及び腺胃)、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、リンパ節(腸間膜および顎下)、乳腺(雌)、骨格筋、坐骨神経、胸骨、骨髓(大腿骨)、眼、膝関節、脊髓(頸部、胸部、腰部)

また、100 及び 500ppm 群の全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、鏡検した。

全ての肉眼的異常部位、甲状腺、肺、肝臓、腎臓

[非腫瘍性病変]

肝臓及び甲状腺に検体投与による病変が観察され、表 8 にそれらの頻度を示す。

表 8. 肝臓及び甲状腺における検体投与による病変

性 別		雄				雌				
		0	100	500	2500	0	100	500	2500	
臓 器	用量群 (ppm)	0	100	500	2500	0	100	500	2500	
	所見/検査動物数	20	20	20	20	20	20	20	20	
	肝 臓	小葉中心性肝細胞肥大	0	0	1	↑6	0	0	0	↑16
	好酸性肝細胞小増殖巣	3	4	7	↑9	1	1	2	2	
臓 器	所見/検査動物数	20	20	20	20	20	20	20	20	
	甲 状 腺	瀰漫性濾胞細胞肥大	3	1	3	6	0	1	0	4
	限局性濾胞細胞過形成	1	1	2	4	0	0	0	2	

統計学的有意差：↑ p<0.05, ↑↑ p<0.01 (Fisher の直接確率計算法, 申請者実施)

肝臓において小葉中心性肝細胞肥大が 2500ppm 群雌雄で顕著に増加し、また、好酸性肝細胞小増殖巣が雄の 500 及び 2500ppm 群で増加ないし増加傾向を示した。

甲状腺では対照群に比し有意差はなかったものの、瀰漫性濾胞細胞肥大が 2500ppm 群の雌雄で、限局性濾胞細胞過形成が 2500ppm 群の雄で増加した。

本検体では肝臓における薬物代謝酵素活性の著明な亢進効果がメカニズム試験において明らかにされており(資料 26 参照)、肝臓の所見はその組織学的反応を示すものと考えられる。また、“第 11 相”の抱合系代謝酵素の誘導により甲状腺ホルモン、T3/T4、の異化作用が亢進した結果、下垂体-甲状腺フィードバック機構が活性化し甲状腺濾胞細胞の肥大及び過形成がもたらされたものと考えられる。これら

の結果は、同じ投与用量を用い並行して実施したラット発がん性試験(資料 15)において、肝臓及び甲状腺に同様の病理組織学的変化が認められ、濾胞細胞腺腫が僅かに増加(対照群: 2500ppm 群, 雄 0/50:4/50; 雌 0/50:3/50)したと関連していた。

投与群に観察されたその他の所見は、いずれも本系統老齢ラットに通常認められる変化であり、それらの発生頻度に対照群と投与群間に差は見られなかった。

[腫瘍性病変]

観察された腫瘍性病変を表 9 に示すが、対照群と投与群間で腫瘍発生数、担腫瘍動物数、担良性・悪性腫瘍動物数に差は見られなかった。

甲状腺濾胞細胞腺腫が雄の 500ppm 群に 2 例、2500ppm 群に 1 例認められたが、用量相関性がなかったところから検体投与の影響とは判断しなかった。

以上の結果から、本剤のラットに対する 24 ヶ月間混餌経口慢性毒性試験における毒性影響として、肝臓の薬物代謝酵素活性亢進に起因する変化が、特に 2500ppm 群で認められた。毒性影響として、2500ppm 群では雌雄における γ -グルタミルトランスフェラーゼ、総蛋白、グロブリンおよびコレステロールの増加、雄におけるアルブミンの増加が認められた。甲状腺で、統計学的に有意ではないが、濾胞細胞過形成(雌雄)及び瀰漫性濾胞細胞肥大(雄)を伴い、雄では甲状腺の絶対重量の有意な増加が認められた。又、肝臓では小葉中心性肝細胞肥大(雌雄)及び好酸性肝細胞小増殖巣(雄)の有意な増加を伴い、雌では肝臓の相対重量の増加が認められた。

500ppm 群では、雌雄におけるアルカリホスファターゼ及び総ビリルビンの減少傾向、雌におけるコレステロールの増加、肝臓の好酸性肝細胞小増殖巣(雄)の増加傾向が認められた。100ppm 群では検体の毒性影響と考えられる所見は認められなかった。

従って、本試験における無毒性量(NOEL)は雌雄とも 100ppm(雄 4.4mg/kg/日、雌 5.9 mg/kg/日)と判断される。

表 9. 腫瘍性病変

時期	性 別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	100	500	2500	0	100	500	2500
全 動 物	臓 器	所見/検査例数	20	4	6	20	20	3	7	20
	造血器リンパ系	組織球系細胞肉腫(M)	2	0	0	3	0	1	0	0
	臓 器	所見/検査例数	20	20	20	20	20	20	20	20
	肝 臓	肝細胞腺腫(B)	4	4	3	3	2	0	0	2
		肝細胞癌(M)	0	1	2	0	0	0	0	0
	臓 器	所見/検査例数	20	20	20	20	20	20	20	20
	甲 状 腺	C細胞腺腫(B)	4	2	3	4	3	5	7	4
		濾胞細胞腺腫(B)	0	0	2	1	0	0	1	0
	臓 器	所見/検査例数	20	20	20	18	20	19	20	19
	上皮小体	腺 腫(B)	1	0	0	0	0	0	0	0
	臓 器	所見/検査例数	20	8	9	20	20	17	17	20
	下 垂 体	前葉腺腫(B)	2	3	0	1	13	7	7	9
		前葉腺癌(M)	0	0	0	0	0	0	1	0
	臓 器	所見/検査例数	20	4	6	20	20	5	9	20
	脳	顆粒細胞腫(B)	0	0	1	1	0	0	0	0
		乏神経膠腫, B(M)	0	1	0	1	0	0	0	0
	臓 器	所見/検査例数	20	5	7	20	20	3	8	20
	脾 臓	血管腫(B)	1	0	0	0	0	0	0	0
		血管肉腫(M)	0	0	1	0	0	0	0	1
	臓 器	所見/検査例数	20	5	6	20	20	3	7	20
	脾 臓	島細胞腺癌(M)	1	0	0	0	0	0	0	0
	臓 器	所見/検査例数	19	4	6	19	20	3	7	20
	胸 腺	良性胸腺腫(B)	0	0	1	0	2	1	2	1
		悪性胸腺腫(M)	0	0	0	0	0	0	1	0
	臓 器	所見/検査例数	20	7	10	20	20	3	7	20
	リンパ節 (腸間膜)	血管腫(B)	1	1	2	1	0	0	0	0
	臓 器	所見/検査例数	20	13	15	20	20	18	18	20
	副腎皮質	骨髓脂肪腫(B)	0	0	0	0	0	1	0	0
		腺 腫(B)	0	0	0	0	0	0	1	0
	臓 器	所見/検査例数	20	13	15	20	19	18	18	20
	副腎髓質	良 性 腫(B)	2	3	3	3	0	0	0	0
	臓 器	所見/検査例数	20	4	7	20	20	6	7	20
前 胃	平滑筋肉腫(M)	0	0	0	1	0	0	0	0	
臓 器	所見/検査例数	20	7	7	20	20	3	6	20	
膀 胱	移行上皮乳頭腫(B)	2	0	1	0	0	0	0	0	
臓 器	所見/検査例数	20	14	16	20	-	-	-	-	
精 巢	間細胞腫(B)	7	9	7	10	-	-	-	-	
臓 器	所見/検査例数	20	9	7	20	-	-	-	-	
前立腺	腺 腫(B)	1	1	0	0	-	-	-	-	
臓 器	所見/検査例数	-	-	-	-	20	14	16	20	
卵 巢	性 索 腫(B)	-	-	-	-	2	0	1	1	
	顆粒膜細胞腫(B)	-	-	-	-	2	2	1	2	
	黄 体 腫(B)	-	-	-	-	1	0	0	0	

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

表 9. 腫瘍性病変(つづき)

時期	性 別		雄				雌			
	投与量(ppm)		0	100	500	2500	0	100	500	2500
全動物	臓 器	所見/検査例数	-	-	-	-	20	10	13	20
	子 宮	内膜間質肉腫(M)	-	-	-	-	1	1	2	1
		平滑筋肉腫(M)	-	-	-	-	0	0	1	0
		腺 癌(M)	-	-	-	-	0	0	1	1
	臓 器	所見/検査例数	20	9	12	20	20	3	7	20
	皮膚/皮下	角化棘細胞腫(B)	0	1	0	1	0	0	0	0
		線 維 腫(B)	1	3	0	0	0	0	0	0
		脂 肪 腫(B)	0	0	0	0	0	1	0	0
		神経鞘腫, 良性(B)	0	0	0	1	0	0	0	0
		神経鞘腫, 悪性(M)	0	1	1	0	0	0	0	0
	臓 器	所見/検査例数	-	-	-	-	20	6	9	20
	乳 腺	線維腺腫(B)	-	-	-	-	1	2	1	2
		腺 癌(M)	-	-	-	-	0	1	1	1
	臓 器	所見/検査例数	0	0	0	0	0	0	0	1
	胸 腔	悪性神経鞘腫(M)	0	0	0	0	0	0	0	1
	臓 器	所見/検査例数	0	1	0	0	0	0	0	0
	腹 腔	神経鞘腫, 良性(B)	0	1	0	0	0	0	0	0
臓 器	所見/検査例数	0	2	2	2	0	0	1	1	
脂肪組織	神経鞘腫, 良性(B)	0	0	1	0	0	0	0	0	
合計	検査動物数		20	20	20	20	20	20	20	20
	良性腫瘍数		21	25	22	24	20	18	18	24
	悪性腫瘍数		1	2	2	2	0	2	2	4
	腫瘍総数		22	27	24	26	20	20	20	26
	担良性腫瘍動物数		10	12	11	13	12	12	10	14
	担悪性腫瘍動物数		1	2	2	2	0	2	2	4
	担腫瘍動物数		11	12	11	13	12	12	11	16

7-3) Wistar 系ラットにおける 24 ヶ月間経口発がん性試験

(資料 15)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2001 年

検体純度:

試験動物: Wistar 系 Chbb:THOM ラット, 1 群雌雄各 50 匹, 開始時雄 42 日齢, 雌 43 日齢, 試験開始時体重範囲(雄: 163.5~211.5g, 雌: 128.3~159.9g)

試験期間: 24 ヶ月間(1998 年 2 月 19 日~2000 年 3 月 3 日)

投与方法: 検体を 0, 100, 500, 2500 及び 15000ppm の濃度で飼料に混入し, 24 ヶ月間に亘り随時摂食させた。検体を混入した飼料は毎週調製した。しかし, 15000ppm 群の動物は投与による低体重及び一般状態不良のため 17 ヶ月目に屠殺し, 死後検査を実施しなかった。

投与量設定根拠:

試験項目及び結果:

一般状態及び死亡率: 一般状態及び生死を毎日観察した。さらに週 1 回, 触診を含む詳細な臨床症状を観察した。

15000ppm 群の動物は投与による低体重及び一般状態不良のため 17 ヶ月目に屠殺した。

2500ppm 以下の投与群に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。

2500ppm 群雄の死亡率が高かったが, 死亡動物の多くは最終解剖時直前に観察されたところから, 検体投与との関連は考えられなかった。

2500ppm 群雌及び 500ppm 以下の投与群雌雄の死亡率は対照群と同様であった。

表 1 に各群雌雄の死亡率を示す。

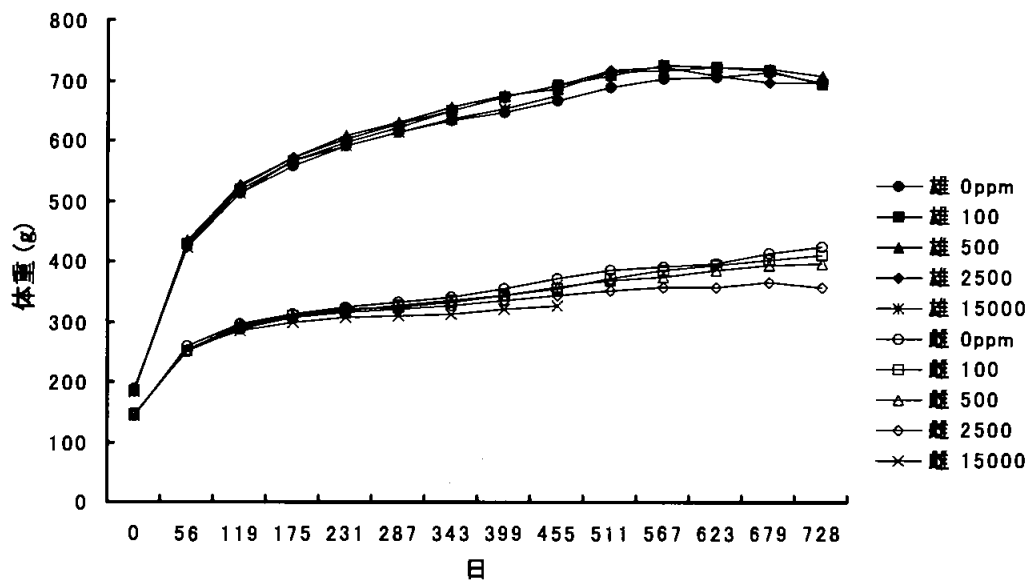
表 1. 死亡率(投与 728 日後)

性 別	雄				雌			
	0	100	500	2500	0	100	500	2500
用量群 (ppm)								
検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50
死亡率 (%)	14	24	22	32	28	16	22	20

体重変化：全動物について、投与開始から 13 週までは毎週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回の頻度で、さらに剖検前に体重を測定した。

体重変化を図 1 に示す。

図 1. 体重変化



15000ppm 群の雌において体重増加抑制が顕著に認められ、投与後 483 日には対照群に比し 13.2%の低値を示し、また、体重増加も 20.9%低下した。この時点で本投与群の試験続行は無意味と判断し投与を中止し、雌雄とも屠殺した。

2500ppm 群雌の体重は投与後 315 日以降有意に減少し、投与終了時には対照群に比し 15.9%の低値を示し、体重増加も 24.2%低下した。

2500ppm 群雄及び 500ppm 以下の投与群雌雄の体重に異常はなかった。

摂餌量及び食餌効率：全動物の摂餌量を投与期間最初の 13 週間は毎週測定し、その後は 4 週毎に測定した。また、食餌効率も算出した。

対照群と比較して統計学的有意差の認められた測定日を表 2 に示す。

表 2. 飼料摂取量

試験日 / 投与群 (ppm)	雄				雌			
	100	500	2500	15000	100	500	2500	15000
投与後 28 日	↑103	↑105	↑103		↓ 94	↓ 93	↓ 94	
投与後 35 日	↑104	↑107	↑106					
投与後 42 日	↑105	↑107	↑107	↑103				
投与後 49 日	↑104	↑106	↑104					
投与後 56 日	↑107	↑108	↑107		↓ 94	↓ 94	↓ 94	
投与後 63 日		↑104	↑104					
投与後 70 日	↑104	↑106	↑105					
投与後 77 日						↓ 96		
投与後 84 日		↑106	↑106			↓ 94		
投与後 91 日					↓ 94	↓ 93	↓ 95	
投与後 119 日						↓ 96		
投与後 147 日						↓ 96		
投与後 175 日						↓ 93		
投与後 203 日					↓ 94	↓ 91	↓ 94	
投与後 231 日								↑104
投与後 259 日					↓ 95	↓ 93	↓ 96	
投与後 371 日		↓ 92				↓ 95		
投与後 399 日						↓ 93		

統計学的有意差：↑↓ $p \leq 0.05$, ↑↓ $p \leq 0.01$ (Anova 及び Dunnett の t 検定, 両側)
 表中の数値は対照群に対する変動率 (%)

雄の投与群では投与開始後約 3 ヶ月間に飼料摂取量の有意な増加が頻繁に認められ、一方、雌では有意な減少が試験前半に多く観察された。しかし、これらの変化に明確な用量依存性が認められなかったところから、偶発的变化と判断した。

また、食餌効率も一部の期間で増減したが、投与の影響と考えられる異常はなかった。

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は次表のとおりであった。

表 3. 1 日あたり平均検体摂取量

投与群	投与濃度 (ppm)	平均検体摂取量, mg/kg 体重/日	
		雄	雌
1	100	4.6	6.0
2	500	23.0	29.7
3	2500	116.1	155.6

平均検体摂取量の計算に供す測定間隔を一定にするため、投与後 7, 35, 63, 91 日並びに 119~707 日までの測定値のみを用いた。

血液学的検査；投与終了時、動物を絶食後麻酔下で断頭により採血し、白血球型別百分率測定用の塗抹標本を作製した。

白血球型別百分率、白血球及び赤血球形態に投与の影響はなかった。

臓器重量；投与終了時の全生存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。

肝臓，副腎（両側），精巣/卵巣（両側），脳，腎臓（両側），甲状腺（両側）

統計学的有意差の認められた項目を表 4 に示す。

表 4. 臓器重量

検査項目		投与群 (ppm)					
		雄			雌		
		100	500	2500	100	500	2500
腎臓	重量					↓ 95	↓ 92
精巣	重量		↑120				
副腎	対体重比		↓ 86				
甲状腺	重量			↑118			
	対体重比			↑117			

表中の数字は対照群に対する変動率 (%)

統計学的有意差：↓ $p \leq 0.05$ ；↑ ↓ $p \leq 0.01$ (Kruskal-Wallis 検定及び Wilcoxon 検定，両側)

2500ppm 群雄で甲状腺の重量及び対体重比が増加した。これらの動物は病理組織学的検査で甲状腺に濾胞細胞過形成と瀰漫性濾胞細胞肥大を伴っていたところから、検体投与の影響と判断した。

その他の有意差の認められた腎臓，精巣又は副腎の重量の変化には用量関連性もなく、絶対重量又は相対重量のみで、これらに対応する病理組織学的所見がないことから偶発的と判断した。

肉眼的病理検査；途中死亡，切迫屠殺，試験終了時の全生存動物について剖検した。

表 5 に投与群において対照群に比し統計学的に有意に変動した肉眼的病理所見を示す。

表 5. 肉眼的病理所見

性 別		雄				雌			
		用量群 (ppm)				用量群 (ppm)			
		0	100	500	2500	0	100	500	2500
臓器	所見/検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50
腺胃	びらん/潰瘍	8	6	12	10	6	↓ 1	6	5
副腎皮質	斑点	16	↑26	23	21	41	40	41	35
下垂体	肥大	2	1	2	2	12	10	↓ 4	9

統計学的有意差：↑ ↓ $p < 0.05$ (Fisher の直接確率計算法，申請者実施)

これらの一部の所見は対照群に比し有意差がみられたが、用量関連性がみられず偶発的变化と判断した。

病理組織学的検査；対照群及び 2500ppm 群の全動物，並びにその他の投与群の試験途中死亡・切迫殺動物を対象として，以下の組織について病理標本を作製し，鏡検した。

全ての肉眼的異常部位，脳，下垂体，甲状腺/上皮上体，胸腺，気管，肺，心臓，大動脈，唾液腺（顎下腺および舌下腺），肝臓，脾臓，腎臓，副腎，膵臓，精巣/卵巣，子宮，膣，卵管，精巣上体，前立腺，精囊，皮膚，食道，胃（前胃及び腺胃），

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Boscalid

十二指腸，空腸，回腸，盲腸，結腸，直腸，膀胱，リンパ節（腸間膜および顎下），
乳腺（雌），骨格筋，坐骨神経，胸骨，骨髓（大腿骨），眼，膝関節，脊髓（頸部，胸
部，腰部）。

また，100 及び 500ppm 群の全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，鏡検した。

全ての肉眼的異常部位，甲状腺，肺，肝臓，腎臓，膀胱

[腫瘍性病変]

対照群に比し投与群で統計学的に有意に増減した腫瘍性病変は、本検体の標的臓器
である甲状腺を含め認められなかった（統計学的検定は申請者が実施した）。しかし、
表 6 に示すように甲状腺濾胞細胞腺腫が雄 500 及び 2500ppm 群、雌 2500ppm 群で
わずかに多い傾向にあった

表 6. 甲状腺濾胞細胞腫瘍の発生頻度

用量群 (ppm)		性 別		雄				雌			
				0	100	500	2500	0	100	500	2500
本試験	濾胞細胞腺腫	0/50	0/50	1/50	4/50	0/50	1/50	0/50	3/50		
	濾胞細胞腺癌	1/50	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50		
	合計	1/50	0/50	1/50	4/50	0/50	1/50	0/50	3/50		
	発生 率%	濾胞細胞腺腫	0	0	2	8	0	2	0	6	
		濾胞細胞腺癌	2	0	0	0	0	0	0	0	
		合計	2	0	2	8	0	2	0	6	
背景データ (%)*	濾胞細胞腺腫	平均 1.0% (範囲 0~6%)				平均 0.7% (範囲 0~10%)					
	濾胞細胞腺癌	平均 0.6% (範囲 0~12%)				平均 0.8% (範囲 0~10%)					
	合計	平均 1.5% (範囲 0~12%)				平均 1.5% (範囲 0~10%)					

*: 混餌投与による 37 試験 (1710 匹) の発生率

その他の腫瘍性病変は表 7 (後出) に示した。

[非腫瘍性病変]

対照群に比し統計学的有意差が認められた非腫瘍性病変を表 8 に示す。

肝臓において小葉中心性肝細胞肥大が 2500ppm 群雌雄で顕著に増加し、また、好酸性肝細胞小増殖巣が雄の 500 及び 2500ppm 群で統計学的に有意ではないが増加傾向を示した。しかし、肝臓腫瘍の発生頻度は対照群と同等であった。

甲状腺では対照群に比し瀰漫性濾胞細胞肥大及び限局性濾胞細胞過形成が 2500ppm 群の雄では増加、雌では統計学的に有意ではないが増加傾向を示した。

表 8. 主要な非腫瘍性病変

臓器	性 別 用量群 (ppm)	雄				雌			
		0	100	500	2500	0	100	500	2500
肝 臓	所見/検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50
	小葉中心性肝細胞肥大	0	0	2	↑27	0	0	0	↑11
	好酸性肝細胞小増殖巣	3	4	8	9	0	0	0	0
	小葉周辺性脂肪浸潤	9	13	13	8	8	6	5	↓1
甲 状 腺	所見/検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50
	瀰漫性濾胞細胞肥大	2	5	6	↑22	2	0	0	4
	限局性濾胞細胞過形成	1	1	1	↑9	2	2	1	7
	瀰漫性 C 細胞過形成	18	↓6	↓6	15	16	16	17	23
腎 臓	所見/検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50
	皮質鉍質沈着					19	↓6	↓8	16
	腎盂炎	3	↑10	6	7	0	0	1	0
卵 巢	所見/検査動物数	-	-	-	-	50	40	34	50
	嚢胞	-	-	-	-	20	28	21	↑31
乳腺(雌)	所見/検査動物数	-	-	-	-	49	26	24	50
	嚢胞	-	-	-	-	2	7	8	↑8

統計学的有意差：↑↓ p<0.05, ↑↓ p<0.01 (Fisher の直接確率計算法, 申請者実施)

本検体では肝薬物代謝酵素活性の顕著な亢進作用が 15000ppm で明らかにされており(資料 26 参照)、肝臓の所見はその組織学的反応を示すものと考えられる。また、第 II 相の抱合系代謝酵素の誘導により甲状腺ホルモン、T3/T4 の分解が促進された結果、下垂体-甲状腺フィードバック機構が活性化し、二次的に甲状腺の機能を刺激し、甲状腺濾胞細胞の肥大及び過形成を生じたものと考えられる。これらと同様の所見が同じ投与用量を用い並行して実施したラット慢性毒性試験(資料 14 参照)においても観察された。

2500ppm 群雌において卵巣及び乳腺に嚢胞が対照群に比し増加したが、いずれも本系統老齢ラットに通常認められる変化であり、かつ、並行して実施したラット慢性毒性試験では増加しなかったところから検体投与の影響とは判断しなかった。

以上の結果から、本剤のラットに対する 24 ヶ月間経口発がん性試験における毒性影響として、2500ppm 群雌に体重増加抑制、肝臓の薬物代謝酵素活性亢進に起因する小葉中心性

肝細胞肥大の増加、甲状腺の機能刺激による甲状腺濾胞細胞の肥大及び過形成の統計学的に有意でない増加傾向、2500ppm 群雄で甲状腺重量の増加、雌と同様に小葉中心性肝細胞肥大並びに甲状腺濾胞細胞肥大及び過形成の増加が認められ、肝臓の好酸性肝細胞小増殖巣及び甲状腺腺腫の統計学的に有意でない増加傾向が見られた。

500ppm 群の雄では肝臓の好酸性肝細胞小増殖巣の統計学的に有意でない増加傾向が見られたが、雌では検体の影響と考えられる変化は認められなかった。

したがって、本試験における無毒性量 (NOAEL) は雄 100ppm (4.6mg/kg/日)、雌 500ppm (29.7mg/kg/日) と判断した。試験した最高用量の 2500ppm で催腫瘍性はないものと判断する。

表 7. 腫瘍性病変

時期	性 別		雄				雌			
			投 与 量 (ppm)		0	100	500	2500	0	100
最終 計 画 殺 動 物	臓 器	所見／検査例数	41	3	0	34	36	1	0	40
	造血器 リンパ系	組織球系細胞肉腫 (M)	0	3	0	0	0	1	0	0
	臓 器	所見／検査例数	41	37	37	34	36	42	39	40
	肝 臓	胆 管 癌 (M)	0	0	1	0	0	0	0	0
		肝細胞腺腫 (B)	9	10	10	11	2	6	3	1
		肝細胞癌 (M)	1	0	2	0	0	0	0	0
	臓 器	所見／検査例数	41	37	37	34	36	42	39	40
	肺	気管支肺胞腺腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0
	臓 器	所見／検査例数	41	37	37	34	36	42	39	40
	甲 状 腺	C 細胞腺腫 (B)	5	3	5	2	7	6	6	5
		濾胞細胞腺腫 (B)	0	0	0	2	0	1	0	3
		C 細胞癌 (M)	0	1	0	1	0	0	1	0
		濾胞細胞腺癌 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0
	臓 器	所見／検査例数	39	37	36	34	36	39	30	37
	上皮小体	腺 腫 (B)	0	0	0	1	0	1	0	1
	臓 器	所見／検査例数	41	13	10	34	36	36	34	40
	下 垂 体	前葉腺腫 (B)	5	8	4	3	21	20	23	21
		前葉腺癌 (M)	0	0	0	0	0	1	1	0
	臓 器	所見／検査例数	41	1	1	34	36	3	15	40
	脳	顆粒細胞腫 (B)	0	0	1	1	0	0	0	0
	臓 器	所見／検査例数	41	3	5	34	36	0	0	40
	眼	ブドウ膜黒肉腫 (M)	0	1	0	0	0	-	-	0
	臓 器	所見／検査例数	41	7	7	34	36	0	0	40
心 臓	心内膜神経鞘腫 (B)	0	1	0	1	0	-	-	0	
臓 器	所見／検査例数	41	0	1	34	36	0	0	40	
顎下腺	良性神経鞘腫 (B)	1	0	0	0	0	-	-	0	
臓 器	所見／検査例数	41	0	1	34	36	0	0	40	
舌下腺	腺 腫 (B)	0	0	0	1	0	-	-	0	

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

表 7. 腫瘍性病変(つづき)

時期	性 別		雄				雌			
	投 与 量 (ppm)		0	100	500	2500	0	100	500	2500
最終 計 画 殺 動 物	臓 器	所見／検査例数	41	10	5	34	36	3	2	40
	脾 臓	血 管 腫 (B)	0	3	1	0	0	0	0	0
		血管肉腫 (M)	0	1	0	0	0	1	0	0
	臓 器	所見／検査例数	41	3	3	34	36	0	0	40
	膵 臓	外分泌腺細胞腺腫 (B)	0	0	0	1	0	-	-	0
		島細胞腺腫 (B)	2	0	1	0	0	-	-	0
	臓 器	所見／検査例数	41	35	35	33	34	41	39	40
	胸 腺	良性胸腺腫 (B)	1	3	2	0	0	4	4	2
		悪性胸腺腫 (M)	0	1	0	0	0	0	0	0
	臓 器	所見／検査例数	41	8	4	34	36	1	0	40
	リンパ節 (腸間膜)	血 管 腫 (B)	2	3	0	4	0	0	-	0
		血管肉腫 (M)	2	1	0	0	0	1	-	0
	臓 器	所見／検査例数	41	0	0	34	36	0	1	40
	リンパ節 (顎下)	血管肉腫 (M)	0	-	-	0	1	0	0	0
	臓 器	所見／検査例数	41	24	21	34	36	38	33	40
	副腎皮質	腺 腫 (B)	0	0	0	0	0	2	1	0
	臓 器	所見／検査例数	41	24	21	34	36	38	32	40
	副腎髄質	脂 肪 腫 (B)	0	0	0	0	1	0	0	0
		良 性 腫 (B)	7	5	2	5	5	2	2	4
		悪 性 腫 (M)	0	1	1	0	0	2	1	1
臓 器	所見／検査例数	41	0	0	34	36	3	1	40	
前 胃	平滑筋肉腫 (M)	0	-	-	0	0	0	1	0	
臓 器	所見／検査例数	41	0	0	34	36	0	0	40	
空 腸	平滑筋肉腫 (M)	0	-	-	0	0	-	-	1	
臓 器	所見／検査例数	41	37	37	34	36	42	39	40	
膀 胱	扁平上皮乳頭腫 (B)	0	0	0	1	0	0	0	0	
	移行上皮乳頭腫 (B)	4	3	2	4	0	0	0	0	
	平滑筋腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	0	
臓 器	所見／検査例数	41	28	26	34	-	-	-	-	
精 巢	間細胞腫 (B)	18	19	20	18	-	-	-	-	

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

表 7. 腫瘍性病変(つづき)

時期	性 別		雄				雌			
	投 与 量 (ppm)		0	100	500	2500	0	100	500	2500
最終 計画 殺動 物	臓 器	所見／検査例数	41	9	9	34	-	-	-	-
	前立腺	腺 腫 (B)	3	1	1	3	-	-	-	-
	臓 器	所見／検査例数	41	2	4	34	-	-	-	-
	精巢上体	中皮腫 (B)	0	0	1	0	-	-	-	-
	臓 器	所見／検査例数	-	-	-	-	36	32	23	40
	卵 巢	性 索 腫 (B)	-	-	-	-	4	2	4	2
		顆粒膜細胞腫 (B)	-	-	-	-	2	1	1	0
		莢 膜 腫 (B)	-	-	-	-	2	3	1	3
		黄 体 腫 (B)	-	-	-	-	1	0	0	1
	臓 器	所見／検査例数	-	-	-	-	36	10	11	40
	子 宮	間質ポリープ (B)	-	-	-	-	4	1	1	3
		内膜ポリープ (B)	-	-	-	-	0	0	0	2
		内膜間質肉腫 (M)	-	-	-	-	0	1	0	1
		平滑筋腫 (B)	-	-	-	-	0	0	0	1
		腺 癌 (M)	-	-	-	-	0	0	0	1
	臓 器	所見／検査例数	41	14	17	34	35	3	11	40
	皮膚/皮下	基底細胞癌 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1
		角化棘細胞腫 (B)	0	0	1	2	0	0	0	0
		扁平上皮乳頭腫 (B)	1	1	0	0	0	0	0	1
		脂 肪 腫 (B)	0	0	1	1	0	0	1	0
線 維 腫 (B)		0	2	4	0	0	1	2	2	
臓 器	所見／検査例数	41	14	27	34	35	3	11	40	
皮 膚	扁平上皮癌 (M)	0	1	1	0	0	0	0	0	
	良性神経鞘腫 (B)	0	0	0	0	1	0	1	0	
	悪性神経鞘腫 (M)	0	0	1	0	0	1	0	0	
臓 器	所見／検査例数	0	0	0	0	35	18	13	40	
乳 腺	線維腺腫 (B)	-	-	-	-	5	7	2	2	
	腺 腫 (B)	-	-	-	-	1	1	0	0	
	腺 癌 (M)	-	-	-	-	0	3	3	4	

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

表 7. 腫瘍性病変(つづき)

時期	性 別		雄				雌			
	投 与 量 (ppm)		0	100	500	2500	0	100	500	2500
最終 計画 殺 動 物	臓 器	所見／検査例数	-	1	-	-	-	-	-	-
	骨	骨肉腫(M)	-	1	-	-	-	-	-	-
	臓 器	所見／検査例数	-	1	2	-	36	-	-	40
	体 腔	中皮腫(B)	-	0	1	-	0	-	-	0
	臓 器	所見／検査例数	14	19	15	10	36	-	-	40
	リンパ節	血管腫(B)	1	0	0	0	0	-	-	0

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

表 7. 腫瘍性病変(つづき)

時期	性 別		雄				雌			
	投 与 量 (ppm)		0	100	500	2500	0	100	500	2500
途中死亡・切迫殺動物	臓 器	所見／検査例数	9	13	13	16	14	8	11	10
	造血器	組織球系細胞肉腫(M)	1	1	2	1	0	2	0	4
	リンパ系	悪性リンパ腫(M)	0	1	0	0	1	0	0	0
	臓 器	所見／検査例数	9	13	13	16	14	8	11	10
	肝 臓	胆管腫(B)	0	0	0	0	0	0	0	1
		胆管癌(M)	1	0	0	0	0	0	0	0
		肝細胞腺腫(B)	2	0	1	1	1	0	0	0
		肝細胞癌(M)	0	1	2	0	0	0	0	0
	臓 器	所見／検査例数	9	13	13	16	14	8	11	10
	腎 臓	腺腫(B)	0	0	0	1	0	0	0	0
		脂肪腫(B)	0	0	0	0	1	0	0	0
		癌(M)	0	0	0	0	0	0	0	1
	臓 器	所見／検査例数	9	13	13	16	14	8	11	10
	甲状腺	C細胞腺腫(B)	0	2	1	1	1	2	1	0
		濾胞細胞腺腫(B)	0	0	1	2	0	0	0	0
		C細胞癌(M)	0	1	0	0	0	0	0	0
	臓 器	所見／検査例数	9	13	13	16	14	8	11	10
	下垂体	前葉腺腫(B)	1	2	4	3	7	7	6	3
		前葉腺癌(M)	0	0	0	0	3	0	1	2
	臓 器	所見／検査例数	9	13	13	16	14	8	11	10
	脳	顆粒細胞腫(B)	0	2	0	1	0	0	0	0
		乏神経膠腫, B型(M)	0	1	0	0	0	0	0	0
	臓 器	所見／検査例数	9	13	13	16	14	8	11	10
脾 臓	血管肉腫(M)	0	0		1	0	0	0	0	
臓 器	所見／検査例数	9	13	13	16	14	8	11	10	
脾 臓	外分泌腺細胞腺癌(M)	0	0	1	0	0	0	0	0	
臓 器	所見／検査例数	9	13	13	16	14	8	11	10	
胸 腺	良性胸腺腫(B)	0	1	0	1	0	0	1	0	
	悪性胸腺腫(M)	0	0	0	0	0	1	0	0	

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

表 7. 腫瘍性病変(つづき)

時期	性 別		雄				雌			
	投 与 量 (ppm)		0	100	500	2500	0	100	500	2500
途 中 死 亡 ・ 切 迫 殺 動 物	臓 器	所見／検査例数	9	13	13	16	14	8	11	10
	リンパ節 (腸間膜)	血 管 腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0
	臓 器	所見／検査例数	9	13	13	16	14	8	11	10
	副腎皮質	腺 腫 (B)	0	0	0	1	0	0	1	0
	臓 器	所見／検査例数	9	13	13	16	14	8	11	10
	副腎髄質	良 性 腫 (B)	1	1	2	4	0	0	1	0
		悪 性 腫 (M)	1	0	0	1	0	0	0	0
	臓 器	所見／検査例数	9	13	13	16	14	8	11	10
	膀 胱	扁平上皮乳頭腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0
		移行上皮乳頭腫 (B)	0	0	1	0	0	0	0	0
	臓 器	所見／検査例数	9	13	13	16	-	-	-	-
	精 巢	間細胞腫 (B)	0	2	3	5	-	-	-	-
	臓 器	所見／検査例数	9	13	13	16	-	-	-	-
	前立腺	腺 腫 (B)	0	0	1	0	-	-	-	-
	臓 器	所見／検査例数	-	-	-	-	14	8	11	10
	卵 巢	黄 体 腫 (B)	-	-	-	-	0	1	0	0
	臓 器	所見／検査例数	-	-	-	-	14	8	11	10
	子 宮	間質ポリープ (B)	-	-	-	-	1	0	0	1
		内膜ポリープ (B)	-	-	-	-	1	0	0	0
		内膜間質肉腫 (M)	-	-	-	-	0	0	1	1
平滑筋腫 (B)		-	-	-	-	0	0	0	1	
腺 癌 (M)		-	-	-	-	0	1	0	0	
	扁平上皮癌 (M)	-	-	-	-	0	1	0	0	
臓 器	所見／検査例数	9	13	13	16	14	8	11	10	
皮膚/皮下	線 維 腫 (B)	0	0	1	1	0	1	0	0	
	扁平上皮癌 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0	
	肉腫, 非定型 (M)	0	1	2	0	0	0	0	0	
臓 器	所見／検査例数	-	-	1	-	14	8	11	10	
乳 腺	線維腺腫 (B)	-	-	1	-	2	1	1	1	
	腺 癌 (M)	-	-	0	-	0	1	1	0	

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

表 7. 腫瘍性病変(つづき)

時 期	性 別		雄				雌			
	投 与 量 (ppm)		0	100	500	2500	0	100	500	2500
途 中 死 亡 動 物	臓 器	所見/検査例数	-	1	-	-	-	-	-	-
	骨	骨 肉 腫 (M)	-	1	-	-	-	-	-	-
	臓 器	所見/検査例数	3	4	5	3	-	-	-	-
	リンパ節	血 管 腫 (B)	1	0	0	0	-	-	-	-

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

表 7. 腫瘍性病変(つづき)

時期	性 別		雄				雌			
	投 与 量 (ppm)		0	100	500	2500	0	100	500	2500
全 動 物	臓 器	所見/検査例数	50	16	13	50	50	9	11	50
	造血器	組織球系細胞肉腫(M)	1	4	2	1	0	3	0	4
	リンパ系	悪性リンパ腫(M)	0	1	0	0	1	0	0	0
	臓 器	所見/検査例数	50	50	50	50	50	50	50	50
	肝 臓	胆 管 腫(B)	0	0	0	0	0	0	0	1
		胆 管 癌(M)	1	0	1	0	0	0	0	0
		肝細胞腺腫(B)	11	10	11	12	3	6	3	1
		肝細胞癌(M)	1	1	4	0	0	0	0	0
	臓 器	所見/検査例数	50	50	50	50	50	50	50	50
	肺	気管支肺胞腺腫(B)	0	1	0	0	0	0	0	0
	臓 器	所見/検査例数	50	50	50	50	50	50	50	50
	腎 臓	腺 腫(B)	0	0	0	1	0	0	0	0
		脂 肪 腫(B)	0	0	0	0	1	0	0	0
		癌(M)	0	0	0	0	0	0	0	1
	臓 器	所見/検査例数	50	50	50	50	50	50	50	50
	甲 状 腺	C細胞腺腫(B)	5	5	6	3	8	8	7	5
		濾胞細胞腺腫(B)	0	0	1	4	0	1	0	3
		C細胞癌(M)	0	2	0	1	0	0	1	0
		濾胞細胞腺癌(M)	1	0	0	0	1	1	1	1
	臓 器	所見/検査例数	48	50	49	50	50	47	41	47
上皮小体	腺 腫(B)	0	0	0	1	0	1	0	1	
臓 器	所見/検査例数	50	26	23	50	50	44	45	50	
下 垂 体	前葉腺腫(B)	6	10	8	6	28	27	29	24	
	前葉腺癌(M)	0	0	0	0	3	1	2	2	
臓 器	所見/検査例数	50	26	23	50	50	11	26	50	
脳	顆粒細胞腫(B)	0	2	1	1	0	0	0	0	
	乏神経膠腫, B型(M)	0	1	0	0	0	0	0	0	
臓 器	所見/検査例数	50	16	18	50	50	0	0	50	
眼	ブドウ膜黒肉腫(M)	0	1	0	0	0	-	-	0	

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

表 7. 腫瘍性病変(つづき)

時期	性 別		雄				雌			
	投 与 量 (ppm)		0	100	500	2500	0	100	500	2500
全 動 物	臓 器	所見／検査例数	50	20	20	50	50	0	0	50
	心 臓	心内膜神経鞘腫(B)	0	1	0	1	0	-	-	0
	臓 器	所見／検査例数	50	13	14	50	50	0	0	50
	顎下腺	良性神経鞘腫(B)	1	0	0	0	0	-	-	0
	臓 器	所見／検査例数	50	13	14	50	50	0	0	50
	舌下腺	腺 腫(B)	0	0	0	1	0	-	-	0
	臓 器	所見／検査例数	50	23	18	50	50	11	13	50
	脾 臓	血管腫(B)	0	3	1	0	0	0	0	0
		血管肉腫(M)	0	1	0	1	0	1	0	0
	臓 器	所見／検査例数	50	16	16	50	50	10	12	50
	膵 臓	外分泌腺細胞腺腫(B)	0	0	0	1	0	0	0	0
		外分泌腺細胞腺癌(M)	0	0	1	0	0	0	0	0
		島細胞腺腫(B)	2	0	1	0	0	0	0	0
	臓 器	所見／検査例数	49	48	48	47	47	48	50	50
	胸 腺	良性胸腺種(B)	1	4	2	1	0	4	5	2
		悪性胸腺腫(M)	0	1	0	0	0	1	0	0
	臓 器	所見／検査例数	50	21	16	50	50	9	11	50
	リンパ ^o 節 (腸間膜)	血管腫(B)	3	3	0	4	0	0	0	0
		血管肉腫(M)	2	1	0	0	0	1	0	0
	臓 器	所見／検査例数	50	19	17	50	50	9	11	50
	リンパ ^o 節 (顎下)	血管肉腫(M)	0	0	0	0	1	0	0	0
	臓 器	所見／検査例数	50	37	35	50	50	46	44	50
	副腎皮質	腺 腫(B)	0	0	0	1	0	2	2	0
	臓 器	所見／検査例数	50	36	34	50	50	46	43	50
	副腎髄質	脂肪腫(B)	0	0	0	0	1	0	0	0
		良 性 腫(B)	8	6	4	9	5	2	3	4
		悪 性 腫(M)	1	1	1	1	0	2	1	1
	臓 器	所見／検査例数	50	0	0	50	50	11	12	50
前 胃	平滑筋肉腫(M)	0	-	-	0	0	0	1	0	
臓 器	所見／検査例数	50	0	0	50	50	8	11	50	
空 腸	平滑筋肉腫(M)	0	-	-	0	0	0	0	1	

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

表 7. 腫瘍性病変(つづき)

時期	性 別		雄				雌			
	投 与 量 (ppm)		0	100	500	2500	0	100	500	2500
全 動 物	臓 器	所見/検査例数	50	50	50	50	50	50	49	49
	膀 胱	扁平上皮乳頭腫(B)	0	1	0	1	0	0	0	0
		移行上皮乳頭腫(B)	4	3	3	4	0	0	0	0
		平滑筋腫(B)	0	0	0	0	0	0	1	0
	臓 器	所見/検査例数	50	41	38	50	-	-	-	-
	精 巢	間細胞腫(B)	18	21	23	23	-	-	-	-
	臓 器	所見/検査例数	50	22	22	50	-	-	-	-
	前立腺	腺腫(B)	3	1	2	3	-	-	-	-
	臓 器	所見/検査例数	50	15	16	50	-	-	-	-
	精巢上体	中皮腫 (B)	0	0	1	0	-	-	-	-
	臓 器	所見/検査例数	-	-	-	-	50	40	34	50
	卵 巢	性索腫(B)	-	-	-	-	4	2	4	2
		顆粒膜細胞腫(B)	-	-	-	-	2	1	1	0
		莢膜腫(B)	-	-	-	-	2	4	1	3
		黄体腫(B)	-	-	-	-	1	0	0	1
	臓 器	所見/検査例数	-	-	-	-	50	18	22	50
	子 宮	間質ポリープ(B)	-	-	-	-	5	1	1	4
		内膜ポリープ(B)	-	-	-	-	1	0	0	2
		内膜間質肉腫(M)	-	-	-	-	0	1	1	2
		平滑筋腫(B)	-	-	-	-	0	0	0	2
		腺癌(M)	-	-	-	-	2	1	1	0
		扁平上皮癌(M)	-	-	-	-	0	1	0	0
	臓 器	所見/検査例数	50	27	30	50	49	11	22	50
皮膚/皮下	基底細胞癌(M)	0	0	0	0	0	0	0	1	
	角化棘細胞腫(B)	0	0	1	2	0	0	0	0	
	扁平上皮乳頭腫(B)	1	1	0	0	0	0	0	1	
	脂肪腫(B)	0	0	1	1	0	0	1	0	
	線維腫(B)	0	2	5	1	0	1	2	2	

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

表 7. 腫瘍性病変(つづき)

時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	100	500	2500	0	100	500	2500
全動物	臓器	所見/検査例数	50	27	30	50	49	11	22	50
	皮膚/ 皮下	線維肉腫(M)	0	0	0	0	0	1	0	0
		扁平上皮癌(M)	1	1	1	0	0	0	0	0
		良性神経鞘腫(B)	0	0	0	0	1	0	1	0
		悪性神経鞘腫(M)	0	0	1	0	0	1	0	0
		肉腫, 非定型(M)	0	1	2	0	0	0	0	0
	臓器	所見/検査例数	-	-	1	-	49	26	24	50
	乳腺	線維腺腫(B)	-	-	0	-	7	8	3	3
		腺腫(B)	-	-	0	-	1	1	0	0
		腺癌(M)	-	-	1	-	0	4	4	4
臓器	所見/検査例数	-	1	-	-	-	-	-	-	
骨	骨肉腫(M)	-	1	-	-	-	-	-	-	
臓器	所見/検査例数	0	1	3	1	-	-	-	-	
体腔	中皮腫(B)	0	0	1	0	-	-	-	-	
臓器	所見/検査例数	14	19	15	10	-	-	-	-	
リンパ節	血管腫(B)	1	0	0	0	-	-	-	-	
合計	検査動物数		50	50	50	50	50	50	50	50
	腫瘍数	良 性	69	79	79	90	71	70	64	61
		悪 性	8	16	14	4	8	17	11	16
	腫瘍総数		77	95	93	94	79	87	75	77
	担腫瘍動物数	良 性	40	44	38	42	41	41	40	38
悪 性		6	15	13	4	8	15	9	15	
担腫瘍動物数		43	48	43	43	45	46	42	42	

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

7-4) マウスにおける 18 ヶ月間経口発がん性試験

(資料 16)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 2001年

検体純度:

試験動物: C57BL/6 j マウス, 1 群雌雄各 50 匹, 開始時雌雄約 7 週齢, 試験開始時体重
範囲(雄; 19.2~22.8g, 雌; 16.4~19.9g)

試験期間: 18 ヶ月間(1998年2月10日~1999年9月8日)

投与方法: 検体を 0, 80, 400, 2000 及び 8000ppm の濃度で飼料に混入し, 18 ヶ月間に亘り
随時摂食させた。検体を混入した飼料は 4 週間毎に調製した。

投与量設定根拠:

試験項目及び結果:

一般状態及び死亡率: 一般状態及び生死を毎日観察した。さらに週 1 回, 触診を含む
詳細な臨床症状を観察した。

検体投与に起因する症状及び死亡率の上昇はなかった。

表 1 に各群雌雄の死亡率を示す。

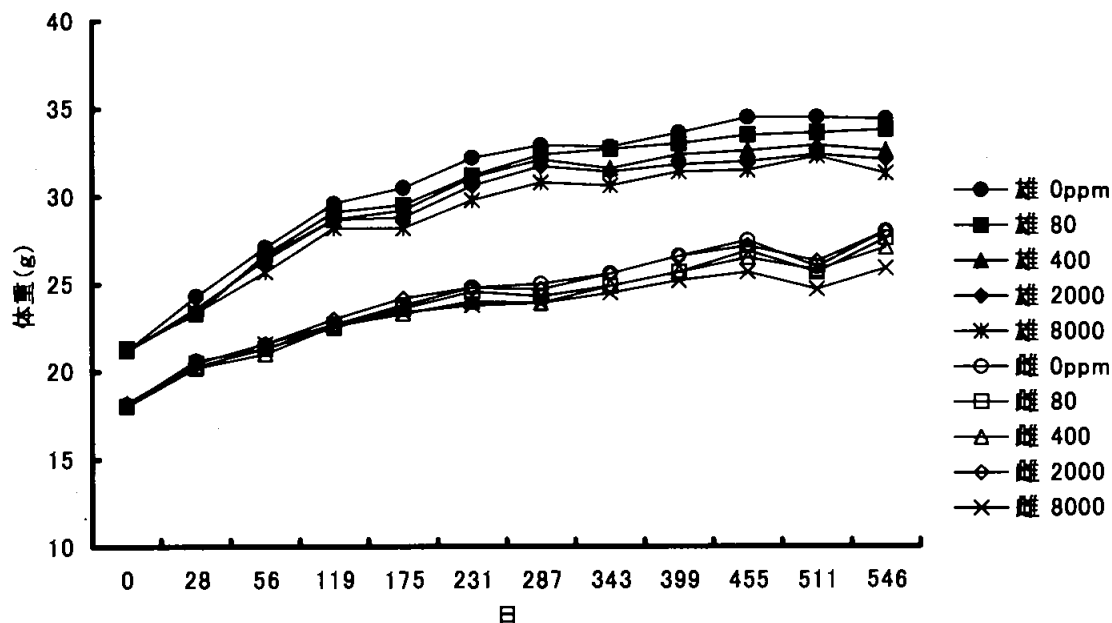
表 1. 死亡率

用量群 (ppm)	雄					雌				
	0	80	400	2000	8000	0	80	400	2000	8000
検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
死亡率 (%)	6	10	8	16	6	8	8	4	4	2

体重変化：全動物について、投与開始から 13 週までは毎週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回の頻度で、さらに剖検前に体重を測定した。

体重変化を図 1 に示す。

図 1. 体重変化



400ppm 以上の投与群の雄において投与期間中体重及び体重増加が有意に低下した。また、雌では 8000ppm において投与期間の数日で体重及び体重増加が有意に低下した。これらの変化は検体投与の影響と判断した。

80ppm 群の雄及び 2000ppm 以下の投与群の雌に異常はなかった。

摂餌量及び食餌効率：全動物の摂餌量を投与期間最初の 13 週間は毎週測定し、その後は 4 週毎に測定した。また、食餌効率も算出した。

対照群と比較して統計学的有意差の認められた測定日を表 2 に示す。

対照群及び投与群間に多くの期間で有意差(大部分が減少、一部で増加)が認められた。しかし、それらは一定の傾向を示さないか、あるいは用量相関性を欠いていた。したがって、偶発的变化と判断した。

表 2. 飼料摂取量

試験日/ 投与群 (ppm)	雄				雌			
	80	400	2000	8000	80	400	2000	8000
投与後 7 日	↓ 88	↓ 90	↓ 88	↓ 86	↓ 84	↓ 82	↓ 84	↓ 88
投与後 14 日	↓ 92	↓ 92	↓ 88	↓ 94	↓ 76	↓ 81	↓ 78	↓ 78
投与後 28 日					↓ 86	↓ 87	↓ 90	↓ 90
投与後 35 日					↓ 88	↓ 86	↓ 86	↓ 78
投与後 42 日	↓ 94	↓ 92	↓ 90	↓ 92	↓ 84	↓ 83	↓ 85	↓ 88
投与後 49 日		↓ 92			↓ 88	↓ 86	↓ 91	↓ 88
投与後 56 日			↓ 93	↓ 90	↓ 78	↓ 76	↓ 80	↓ 84
投与後 70 日	↓ 92	↓ 92		↓ 92	↓ 83	↓ 81	↓ 84	↓ 87
投与後 77 日						↓ 90	↓ 90	
投与後 84 日						↓ 83	↓ 84	
投与後 119 日					↓ 86	↓ 83	↓ 84	↓ 84
投与後 147 日					↓ 85	↓ 85	↓ 89	↓ 87
投与後 175 日					↓ 91	↓ 89	↓ 89	↓ 89
投与後 203 日	↓ 88	↓ 85	↓ 86	↓ 88	↓ 86	↓ 89	↓ 87	↓ 85
投与後 231 日	↑ 110	↑ 108						
投与後 371 日						↓ 90	↓ 90	↓ 88
投与後 399 日					↓ 86			
投与後 427 日	↓ 95	↓ 93	↓ 93	↓ 95	↓ 77	↓ 82	↓ 85	↓ 82
投与後 455 日	↑ 107							
投与後 483 日					↑ 113	↑ 125	↑ 130	↑ 128

統計学的有意差：↓ $p \leq 0.05$, ↑↓ $p \leq 0.01$ (Anova 及び Dunnett の t 検定, 両側)
 表中の数値は対照群に対する変動率(%)

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は次表のとおりであった。

表 3. 1 日あたり平均検体摂取量, mg/kg 体重

投与群	投与濃度 (ppm)	1 日あたり平均検体摂取量	
		雄	雌
1	80	13	18
2	400	65	90
3	2000	331	443
4	8000	1345	1804

平均検体摂取量の計算に供す測定間隔を一定にするため, 投与後 7, 35, 63, 91 日並びに投与後 119 から 539 日までの測定値のみを用いた。

血液学的検査；投与 12 ヶ月目に眼窩静脈叢から穿刺し, また, 投与期間終了後の剖検時に断頭して採血し, 白血球型別百分率測定用に血液塗抹標本を作製した。

白血球型別百分率, 白血球及び赤血球形態に投与の影響はなかった。

臓器重量；投与終了時の全生存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。

肝臓, 腎臓(両側), 副腎(両側), 精巣/卵巣(両側)

統計学的有意差の認められた項目を表 4 に示す。

表 4. 臓器重量

臓器／群 (ppm)		雄				雌			
		80	400	2000	8000	80	400	2000	8000
肝 臓	絶対重量				↑116			↑108	↑111
	対体重比		↑105	↑114	↑128			↑108	↑118
腎 臓	絶対重量			↓ 93	↓ 86		↓ 96		↓ 96
精 巢	対体重比	↑107	↑108	↑114	↑113				
脳	対体重比		↑107	↑109	↑111				↑106
副 腎	絶対重量	↑114	↑117	↑115	↑117				
	対体重比	↑118	↑127	↑127	↑136				↑114

表中の数字は対照群に対する変動率(%)

統計学的有意差：↑ $p \leq 0.05$ ；↑ ↓ $p \leq 0.01$ (Kruskal-Wallis 検定及び Wilcoxon 検定，両側)

肝臓の重量及び対体重比が 2000ppm 群雌並びに 8000ppm 群雌雄で増加したが，これらの変化は病理組織学的に小葉周辺性肝細胞肥大と一致し，検体投与の影響と判断した。肝臓の相対重量が雄の 400 及び 2000ppm 群でも増加したが，肝臓に病理組織学的変化を伴っていなかったため，これらは検体投与の影響とは考えなかった。

腎臓重量の減少が雄の 2000 及び 8000ppm 群，雌の 400 及び 8000ppm 群に認められたが，相対重量に対照群との差がなく，病理組織学的変化を伴っていないので，検体投与の影響とは判断しなかった。

精巣の対体重比が全投与群で増加したが，(絶対)重量に対照群との差がなく，かつ，病理組織学的変化を伴っていないので，検体投与の影響とは判断しなかった。

脳の対体重比が雄の 400ppm 以上の投与群，雌の 8000ppm 群で増加したが，いずれも(絶対)重量に変化がなく，かつ，病理組織学的変化を伴っていないので，検体投与の影響とは判断しなかった。

副腎重量及び対体重比が雄の全投与群で増加し，雌では対体重比が 8000ppm 群でのみ増加した。しかし，表 5 に示すように，雌雄とも背景データの最小値であったことから，これらの重量変化は偶発的と判断した。

表 5. C57/BL 雄マウスにおける副腎重量の背景データとの比較

	雄			雌			
	検査動物数	重量 (mg)	対体重比	検査動物数	重量 (mg)	対体重比	
本試験	0ppm	47	3.532	0.011	46	8.674	0.035
	80ppm	45	4.022	0.013	46	8.413	0.035
	400ppm	46	4.133	0.014	48	8.583	0.036
	2000ppm	42	4.048	0.014	48	8.75	0.035
	8000ppm	47	4.149	0.015	49	9.245	0.04
背景データ ^a	平均		5.017	0.017		9.697	0.037
	最大		6.500	0.024		11.641	0.044
	最小		3.532	0.011		8.674	0.030

^a: 本試験を含む 10 試験 (合計雄 416 匹, 雌 412 匹) のデータである。

肉眼的病理検査: 途中死亡, 切迫屠殺, 試験終了時の全生存動物について剖検した。

剖検所見に検体投与の影響はなかった。

病理組織学的検査: 対照群及び 8000ppm 群の全動物, 並びにその他の投与群の試験途中死亡・切迫殺動物を対象として, 以下の組織について病理標本作製し, 鏡検した。

全ての肉眼的異常部位, 脳, 下垂体, 甲状腺/上皮上体, 胸腺, 気管, 肺, 心臓, 大動脈, 唾液腺(顎下腺および舌下腺), 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 膵臓, 精巣/卵巣, 子宮, 膣, 卵管, 精巣上体, 前立腺, 精嚢, 皮膚, 食道, 胃(前胃及び腺胃), 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸, 膀胱, リンパ節(腸間膜および顎下), 乳腺(雌), 骨格筋, 坐骨神経, 胸骨, 骨髓(大腿骨), 眼, 膝関節, 脊髓(頸部, 胸部, 腰部), 胆嚢。

また, 80, 400 及び 2000ppm 群の全動物を対象として以下の組織について病理標本作製し, 鏡検した。

全ての肉眼的異常部位, 甲状腺, 肺, 肝臓及び腎臓

病変の発生頻度の比較は, 甲状腺, 肺, 肝臓及び腎臓については対照群と全投与群間で行ったが, その他の臓器は対照群と 8000ppm 群との間でのみ実施した。

[腫瘍性病変]

認められた腫瘍性病変を表 7(後出)に示したが, 投与群において対照群に比し発生頻度が有意に増加した腫瘍性病変はなかった。

[非腫瘍性病変]

肝臓において小葉周辺性肝細胞肥大が 2000ppm 群雌及び 8000ppm 群雌雄で増加した。これらの肝細胞の細胞質は好酸性を増し微細顆粒状を呈していた。本変化は臓器重量における肝臓重量増加と関連し検体投与の影響と判断した。

本病変を含め投与群雌雄において対照群に比し発生頻度が統計学的に有意に増減した病変を表 6(後出)に示す。

雌の肝臓では対照群を含め肝細胞の脂肪性空胞化が多くの例で観察されたが、400ppm 以上の投与群では脂肪性空胞化を示す肝細胞の分布が瀰漫性から小葉中心性へ移行していた。これは、2000ppm 以上の投与群では小葉周辺帯肝細胞が肥大していたことと関連していた。400ppm 群には肝臓重量の増加もなく、組織学的に肝細胞肥大もないことから、組織学的に反映されない程度に肝細胞の生理活性が亢進していた結果と考えられ、この変化には毒性学的に意義はないと考えた。

雌の 8000ppm 群で肝臓の卵円形細胞増生(oval cell proliferation)の増加がみられたが、いずれも微小病巣で切片上に単一か数個が散在性にあるにすぎず、かつ、雌雄の発生頻度に用量関連性もなく、雄で有意な増加もなかったことから検体投与の影響とは判断しなかった。

その他の所見の発生頻度は単発性/低頻度で、偶発的又は自然発生的変化であり、検体投与の影響と判断しなかった。

以上の結果から、本剤のマウスに対する 18 ヶ月間経口発がん性試験における毒性影響として、雄の 400ppm 以上の投与群に低体重、2000ppm 群雌及び 8000ppm 群雌雄の肝臓に小葉周辺性肝細胞肥大を伴う重量増加が観察された。また、400ppm 群雌では肝細胞肥大はみられず、肝臓重量の増加もないことから、毒性学的に意義はないと判断した。したがって、本試験における無毒性量(NOEL)は雄 80ppm(13mg/kg/日)、雌 400ppm(90mg/kg/日)と判断した。

催腫瘍性は認められなかった。

表 6. 統計学的有意差を示す非腫瘍性病変

性 別		雄					雌				
病変/投与量 (ppm)		0	80	400	2000	8000	0	80	400	2000	8000
臓 器	所見/検査例数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
肝 臓	リンパ球浸潤	43	↓35	36	↓34	↓34	37	39	38	43	↑45
	限局性 脂肪性空胞化	9	↓1	6	4	↓2	11	↓3	↓3	6	↓2
	小葉中心性肝細胞 脂肪性空胞化	38	39	39	41	37	10	1	↑25	↑25	↑37
	瀰漫性肝細胞 脂肪性空胞化	10	7	7	↓3	10	35	35	↓22	↓23	↓10
	色素沈着	1	2	3	2	6	11	↓2	5	10	11
	卵円形細胞増生	4	2	2	0	6	7	3	2	6	↑15
	小葉周辺性 肝細胞肥大	0	0	0	0	↑29	0	0	0	↑10	↑45
臓 器	所見/検査例数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
肺	リンパ球浸潤	7	6	6	↓1	4	11	14	10	11	
臓 器	所見/検査例数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
腎 臓	リンパ球浸潤	44	39	44	↓36	41	41	40	39	39	39
	慢性腎症	44	42	↓36	39	48	31	39	↑41	↑42	31
臓 器	所見/検査例数	50	6	4	8	50	-	-	-	-	
精巣上体	リンパ球浸潤	20	0	1	1	↓10	-	-	-	-	
精囊	所見/検査例数	50	43	43	40	50	-	-	-	-	
	炎 症	5	1	0	0	↓0	-	-	-	-	
臓 器	所見/検査例数	50	5	4	8	50	50	4	2	2	50
副腎皮質	限局性萎縮	33	0	2	0	↓4	1	0	0	0	1
	限局性被膜 細胞過形成	3	0	1	0	4	5	0	0	0	↓0
臓 器	所見/検査例数	50	5	4	8	50	50	4	2	2	50
胸 骨	骨線維化病変	2	0	0	1	2	20	0	0	0	↓6

統計学的有意差：↑↓ p<0.05, ↑↓ p<0.01 (Fisher の直接確率計算法, 申請者実施)

表 7. 腫瘍性病変

時期	性別		雄					雌				
	投与量 (ppm)		0	80	400	2000	8000	0	80	400	2000	8000
最終 計画 殺動 物	臓器	所見/検査例数	47	0	0	1	47	46	0	1	1	49
	前胃	扁平上皮乳頭腫 (B)	0	-	-	1	0	0	-	0	0	1
	臓器	所見/検査例数	47	2	0	2	47	46	0	2	3	49
	腺胃	腺腫 (B)	0	2	-	0	0	0	-	0	1	0
	臓器	所見/検査例数	47	0	0	0	47	46	0	1	0	49
	十二指腸	腺腫 (B)	0	-	-	-	1	0	-	1	-	0
		腺癌 (M)	1	-	-	-	0	0	-	0	-	0
	臓器	所見/検査例数	47	1	1	1	47	46	4	0	5	49
	空腸	腺癌 (M)	0	0	0	0	1	0	0	-	0	0
	臓器	所見/検査例数	47	45	46	42	47	46	46	48	48	49
	肝臓	肝細胞腺腫 (B)	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2
		肝細胞癌 (M)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
		血管腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	臓器	所見/検査例数	47	45	46	42	47	46	46	48	48	49
	肺	気管支肺胞腺腫 (B)	6	3	↓0	1	↓0	1	0	0	0	1
		気管支肺胞癌 (M)	2	4	0	0	0	0	0	0	1	0
	臓器	所見/検査例数	47	45	46	42	47	46	46	48	48	49
	腎臓	血管肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	臓器	所見/検査例数	-	-	-	-	-	46	18	16	12	49
	卵巣	嚢胞腺腫 (B)	-	-	-	-	-	0	0	1	0	0
		血管腫 (B)	-	-	-	-	-	0	0	1	0	0
	臓器	所見/検査例数	-	-	-	-	-	46	16	16	12	49
	卵管	乳頭腫 (B)	-	-	-	-	-	0	0	0	0	1
	臓器	所見/検査例数	-	-	-	-	-	46	13	20	20	49
	子宮	間質ポリープ (B)	-	-	-	-	-	1	0	0	0	0
		腺様ポリープ (B)	-	-	-	-	-	1	0	0	0	0
		平滑筋腫 (B)	-	-	-	-	-	0	0	0	0	1
	臓器	所見/検査例数	-	-	-	-	-	46	4	10	6	49
膣	脂腺様腺腫 (B)	-	-	-	-	-	0	0	1	0	0	
臓器	所見/検査例数	47	2	3	1	47	46	7	4	6	49	
脾臓	血管腫 (B)	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

統計学的有意差 : ↓ $p < 0.05$ (Fisher の直接確率計算法, 申請者実施)

表 7. 腫瘍性病変(つづき)

時期	性 別		雄					雌				
	投与量 (ppm)		0	80	400	2000	8000	0	80	400	2000	8000
最終計画殺動物	臓器	所見/検査例数	47	3	2	2	47	46	9	7	9	49
	血管/ リンパ系	悪性リンパ腫(M)	4	3	2	2	2	5	7	3	4	6
		組織球系細胞肉腫(M)	1	0	0	0	2	6	2	4	5	4
	臓器	所見/検査例数	1	1	1	2	1	0	0	0	0	0
	ハタ-腺	腺腫(B)	1	1	1	2	1	-	-	-	-	-
	臓器	所見/検査例数	47	0	0	0	47	46	0	0	0	49
	副腎皮質	腺腫(B)	1	-	-	-	0	0	-	-	-	0
	臓器	所見/検査例数	47	0	1	0	46	46	14	14	21	48
	下垂体	前葉腺腫(B)	1	-	0	-	1	16	8	12	17	15
		中間葉腺腫(B)	0	-	0	-	0	1	0	0	0	0

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

表 7. 腫瘍性病変(つづき)

時期	性 別		雄					雌				
	投与量 (ppm)		0	80	400	2000	8000	0	80	400	2000	8000
途中死亡・ 切迫殺動物	臓器											
	肺	所見/検査例数	3	5	4	8	3	4	4	2	2	1
		気管支肺胞腺腫(B)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	乳腺	所見/検査例数	0	0	0	0	0	4	4	2	2	1
		平滑筋肉腫(M)	-	-	-	-	-	0	1	0	0	0
	血管/ リンパ系	所見/検査例数	3	5	4	8	3	4	4	2	2	1
		悪性リンパ腫(M)	0	0	0	0	0	2	0	2	1	0
		組織球系細胞肉腫(M)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	骨格筋	所見/検査例数	3	5	4	8	3	4	4	2	2	1
		肉腫(M)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

表 7. 腫瘍性病変(つづき)

時期	性 別		雄					雌				
	投与量 (ppm)		0	80	400	2000	8000	0	80	400	2000	8000
全 動 物	臓 器	所見/検査例数	50	5	4	9	50	50	4	3	3	50
	前 胃	扁平上皮乳頭腫(B)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	臓 器	所見/検査例数	50	7	4	10	50	50	4	4	5	50
	腺 胃	腺 腫(B)	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0
	臓 器	所見/検査例数	50	5	4	8	50	50	4	3	2	50
	十二指腸	腺 腫(B)	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
		腺 癌(M)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	臓 器	所見/検査例数	50	6	5	9	50	50	8	2	7	50
	空 腸	腺 癌(M)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	臓 器	所見/検査例数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	肝 臓	肝細胞腺腫(B)	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2
		肝細胞癌(M)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
		血管腫(B)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	臓 器	所見/検査例数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	肺	気管支肺胞腺腫(B)	6	3	↓0	2	↓0	1	0	0	0	1
		気管支肺胞癌(M)	2	4	0	0	0	0	0	0	1	0
	臓 器	所見/検査例数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	腎 臓	血管肉腫(M)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	臓 器	所見/検査例数	-	-	-	-	-	50	22	18	13	50
	卵 巢	嚢胞腺腫(B)	-	-	-	-	-	0	0	1	0	0
		血管腫(B)	-	-	-	-	-	0	0	1	0	0
	臓 器	所見/検査例数	-	-	-	-	-	50	20	18	14	50
	卵 管	乳 頭 腫(B)	-	-	-	-	-	0	0	0	0	1
	臓 器	所見/検査例数	-	-	-	-	-	50	17	22	22	50
	子 宮	間質ポリープ(B)	-	-	-	-	-	1	0	0	0	0
		腺様ポリープ(B)	-	-	-	-	-	1	0	0	0	0
		平滑筋腫(B)	-	-	-	-	-	0	0	0	0	1
	臓 器	所見/検査例数	-	-	-	-	-	50	8	12	8	50
膣	脂腺様腺腫(B)	-	-	-	-	-	0	0	1	0	0	
臓 器	所見/検査例数	-	-	-	-	-	50	4	1	2	50	
乳 腺	平滑筋肉腫(M)	-	-	-	-	-	0	1	0	0	0	

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

統計学的有意差 : $\downarrow p < 0.05$ (Fisher の直接確率計算法, 申請者実施)

表 7. 腫瘍性病変(つづき)

時期	性 別 投与量 (ppm)		雄					雌				
			0	80	400	2000	8000	0	80	400	2000	8000
全 動 物	臓 器	所見/検査例数	50	7	7	9	50	50	11	6	8	50
	脾 臓	血管腫 (B)	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
	臓 器	所見/検査例数	50	8	6	10	50	50	13	9	11	50
	血管/ リンパ系	悪性リンパ腫 (M)	4	3	2	2	2	7	7	5	5	6
		組織球系細胞肉腫 (M)	1	0	0	0	2	6	3	4	5	4
	臓 器	所見/検査例数	1	1	1	2	1	0	0	0	0	0
	ハ-タ-腺	腺 腫 (B)	1	1	1	2	1	-	-	-	-	-
	臓 器	所見/検査例数	50	0	0	0	50	50	4	2	2	50
	副腎皮質	腺 腫 (B)	1	-	-	-	0	0	0	0	0	0
	臓 器	所見/検査例数	49	4	5	7	49	50	18	15	23	49
	下垂体	前葉腺腫 (B)	1	-	0	-	1	16	8	12	17	15
		中間葉腺腫 (B)	0	-	0	-	0	1	0	0	0	0
	臓 器	所見/検査例数	50	5	4	8	50	50	4	2	2	50
	骨格筋	肉 腫 (M)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
合 計	検査動物数		50	50	50	50	50	50	50	50	50	
	腫 瘍 数	良 性	9	8	1	5	4	21	8	17	18	21
		悪 性	8	7	3	3	5	13	11	9	12	10
	腫瘍総数		17	15	4	8	9	34	19	26	30	31
	担腫瘍動物数	良 性	9	7	1	4	4	20	8	14	18	19
		悪 性	8	7	3	3	5	13	11	9	11	10
担腫瘍動物数		14	14	4	7	7	29	18	22	27	24	

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

8) 繁殖毒性試験及び催奇形性試験

8-1) ラットを用いた繁殖毒性試験

(資料 17)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：2001年

検体純度：

試験動物：Wistar系(Chbb=THOM(SPF))ラット，1群雄25匹，雌25匹，投与開始時5週齢

投与期間：F0世代：投与開始からF1児離乳後の剖検までの約19週間

F1世代：離乳時からF2児離乳後の剖検までの約21週間

(動物試験期間，1998年9月8日～1999年6月7日)

投与方法：検体を0，100，1000または10000ppmの濃度で混合した飼料を自由に摂取させた。なお，対照群の動物には基礎飼料のみを同様に摂取させた。

用量設定根拠：

方法及び試験項目：概要を次頁の表にまとめた。

試験の概要

世代	期間(週)	作業手順	試験項目
F0	育成(10)	一般状態及び死亡の有無の観察(投与期間中毎日) 体重及び摂餌量測定(投与期間中原則として毎週)	一般状態, 死亡 体重, 体重増加, 摂餌量, 検体摂取量
	交配(1) 妊娠(3) 出産 哺育(3) 離乳	性周期観察(交配前少なくとも3週間) 雌雄1対1で1晩同居交配, 翌朝腔垢中の精子で交尾を確認(妊娠0日) 出産状況の観察(出産後0日) 出産児の生死, 性, 外表所見, 生存(生後0, 4, 7, 14, 21日)の観察, 体重測定(生後1, 4, 7, 14, 21日), 死亡児の剖検 同腹児数調整(生後4日, 原則として雌雄各4匹) 選抜しなかった4日齢児の剖検 生後21日	性周期 交尾率 授精率, 妊娠率 出産率, 妊娠期間 児の一般状態, 生死, 産児数, 生存児出産率, 性比, 生存率, 体重, 体 重増加, 剖検所見, 哺育 率
F1	育成(10)	F1親動物の選抜(各腹各性1匹または2匹を選抜) 選抜しなかったF1離乳児の剖検	剖検所見, 臓器重量 精子の数, 運動率及び 形態, 着床数, 着床後 胚死亡率, 剖検所見, 臓器重量, 病理組織学的 所見(卵胞数を含む)
	交配(2) 妊娠(3) 出産 哺育(3) 離乳	F0親動物の精子検査, 剖検, 臓器重量測定, 病理組織学的検査(卵胞の計数を含む) 性成熟(雄, 包皮分離; 雌, 腔開口)の観察 (兄妹交配は避けた) (F0親動物及びF1児動物に準ずる)	性成熟 (F0親動物及びF1児 動物に準ずる)
F2			

親動物:

一般状態及び死亡: 全動物の一般状態と死亡の有無を試験期間中毎日観察した。

体重: 雄は投与開始時とそれ以降毎週, 雌は投与開始時とそれ以降交配前期間中毎週及び妊娠0日, 7日, 14日, 20日と出産後1日, 4日, 7日, 14日, 21日に測定した。

摂餌量；雌雄とも交配前期間中毎週，さらに雌は妊娠後 0～7 日，7～14 日，14～20 日及び出産後 1～4 日，4～7 日，7～14 日について測定した。

検体摂取量；雌雄とも交配前期間中，また雌は妊娠及び哺育期間中について，体重，摂餌量及び飼料中の設定検体濃度から 1 日当り，体重 1kg 当りの検体摂取量 (mg/kg/日) を算出した。

交配及び妊娠の確認；交配は雌雄 1 対 1 で同居させ，翌日膣垢中の精子により交尾を確認し，妊娠 0 日とした。妊娠は出産及び剖検時に子宮内の着床痕の有無を調べて確認した。兄妹交配を避けた。

繁殖性に関する指標；育成，交配，妊娠及び哺育の各期間と剖検時に以下の指標について調べた。

性成熟；雄の包皮分離と雌の膣開口の日齢 (F1 動物についてのみ)

性周期；交配前に少なくとも 3 週間性周期を観察し，性周期の平均日数を算出
交尾成立までの期間；雌雄を同居後，雌の膣垢中に精子が確認されるまでの日数
交尾率 (%) = (交尾を認めた雄 (雌) 数 / 交配に用いた雄 (雌) 数) × 100

授精率 (%) = (雌を妊娠させた雄数 / 交配に用いた雄数) × 100

精子；運動率 (自動性を示す精子の百分率)，形態 (正常及び異常形態精子の百分率) 及び数

(精巢の精子細胞数及び精巢上体尾部の精子頭部数) (形態と数は対照群と高用量群のみ)

妊娠率 (%) = (妊娠雌数 / 交尾を認めた雌数) × 100

出産率 (%) = (生存児を出産した雌数 / 妊娠雌数) × 100

妊娠期間；交尾を認めた日 (妊娠 0 日) から出産完了日までの日数

着床数；子宮内の着床痕の数

着床後胚損失率 (%) = [(着床数 - 産児数) / 着床数] × 100

類別卵胞数；対照群と高用量群の全 F1 雌親動物ならびに妊娠しなかった F0 及び F1 雌親動物について，卵巢の連続組織切片を顕微鏡で観察し，Plow-chalk らによる定義に従って，原始卵胞，発育卵胞，原始卵胞と発育卵胞の合計及びグラフ卵胞を計数した。

病理学的検査；

剖検所見；すべての F0 及び F1 親動物の外表及び内臓・組織の肉眼による病理学的変化を記録した。

臓器重量；最終剖検時まで生存したすべての F0 及び F1 親動物の脳，下垂体，胸腺，肝臓，脾臓，副腎，腎臓，卵巣，子宮（頸部と卵管を含む），精巣，精巣上体（全体及び尾部），精嚢（凝固腺と分泌物を含む）及び前立腺の重量を測定した。臓器重量は，絶対重量と相対重量（最終体重に対する比，%）で表わした。

病理組織学的検査；対照群と高用量群の全 F0 及び F1 親動物ならびに低用量群と中間用量群において児の得られなかった雌雄の生殖器官（卵巣，卵管，子宮，子宮頸，膣または左精巣，左精巣上体，精嚢，凝固腺，前立腺），下垂体及び副腎，全群の全 F0 及び F1 親動物の肝臓，対照群と高用量群の全 F0 及び F1 親動物の腎臓，全群の全 F0 雄親動物及び対照群と高用量群の全 F1 親動物の脾臓，さらにすべての肉眼的異常部位について，それぞれ病理組織学的に検査した。

児動物；

一般状態及び死亡；全動物の一般状態と死亡の有無を哺育期間中毎日観察した。死亡児は，発見後速やかに剖検して所見を記録した。

産児数；出生日（生後 0 日）における生存児と死亡児の合計

$$\text{平均産児数} = \text{総産児数} / \text{生存児を出産した母動物数}$$

生存児出産率 (%) = (出産時生存児数 / 産児数) × 100

性比；生後 0 日と 21 日における生存児（雄 + 雌）に対する雄または雌の割合 (%)

生存率 (%) = (調整前生後 4 日の生存児数 / 出生日の生存児数) × 100

哺育率 (%) = (生後 21 日の生存児数 / 調整後生後 4 日の生存児数) × 100

体重；生後 1 日，4 日（調整前），7 日，14 日及び 21 日に個体別に測定し，各腹の雌雄別平均体重を基にして，各群の雌雄別平均体重を求めた。

体重増加；生後 1-4 日，4-7 日，7-14 日，14-21 日及び 4-21 日について，各腹の雌雄別平均体重増加を基にして，各群の雌雄別平均体重増加を求めた。

剖検所見；計画殺した全ての F1 児（生後 4 日の調整時の屠殺児，次世代として選抜しなかった児）及び F2 児動物の外表及び内臓の肉眼的検査を行った。異常所見のある児動物については，Dawson 法に従って詳細に検査した。

死産児及び離乳までの死亡児も外表及び内臓の肉眼的検査を行った。

臓器重量；離乳後の剖検時まで生存したF1及びF2児動物の中から、各腹雌雄それぞれ1または2匹を選抜して脳、胸腺及び脾臓の重量を測定し、対体重比を算出した。

結果：概要をに示す。

世代		親：F0 児：F1				親：F1 児：F2				
投与量 (ppm)		0	100	1000	10000	0	100	1000	10000	
動物数	雄	25	25	25	25	25	25	25	25	
	雌	25	25	25	25	25	25	25	25	
親動物	一般状態	検体投与に起因する異常は認められなかった								
	死亡数	雄	0	0	0	0	0	0	0	0
		雌	0	0	0	0	0	0	0	0
	体重 ^a	雄：生育時								91 ↓
		雌：生育時								
		妊娠時								
		哺育時								
	体重増加 ^a	雄：生育時								91 ↓
		雌：生育時								
		妊娠時				89 ↓				
哺育時				154 ↑	162 ↑			187 ↑	204 ↑	
摂餌量 ^a	雄：生育時									
	雌：生育時									
	妊娠時									
	哺育時									
検体摂取量	雄：生育時 ^b	0	10.1	101.2	1034.5	0	12.3	123.9	1295.4	
	雌：生育時 ^b	0	10.7	106.8	1062.0	0	12.5	124.7	1299.6	
	妊娠時	0	8.7	88.7	907.4	0	9.2	94.2	952.9	
	哺育時	0	14.8	149.4	1456.7	0	14.8	155.2	1456.1	

^a：表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値である。統計学的に有意な場合のみ示した。

^b：交配前第0-10週の平均mg/kg/日

Dunnett検定：体重、体重増加、摂餌量

↑ ↓：P ≤ 0.05, ↑ ↓ ↓：P ≤ 0.01で対照群と比較して統計学的に有意差あり。

結 果(続き) :

世 代		親 : F0 児 : F1				親 : F1 児 : F2					
投与量 (ppm)		0	100	1000	10000	0	100	1000	10000		
親 動 物	臓器重量 ^b	肝 臓	雄 A (g)	16.638	16.237	16.586	17.127	17.768	18.338	17.732	18.093
			R (%)	3.613	3.495	3.657	3.756	3.526	3.787	3.683	↑3.97
			雌 A (g)	9.857	9.748	10.082	↑11.459	10.405	10.48	10.514	↑12.61
			R (%)	3.602	3.649	3.787	↑4.354	3.682	3.773	3.827	↑4.47
		脾 臓	雄 A (g)	0.872	0.856	↓0.774	↓0.714	0.901	0.866	↓0.757	↓0.708
			R (%)	0.19	0.185	↓0.172	↓0.157	0.18	0.179	↓0.158	↓0.155
			雌 A (g)	0.608	0.585	0.563	0.546	0.633	0.61	↓0.578	↓0.57
			R (%)	0.222	0.219	0.212	0.209	0.224	0.22	0.211	↓0.202
	腎 臓	雄 A (g)	2.988	2.942	2.847	2.868	3.056	3.005	2.958	↓2.738	
		R (%)	0.651	0.637	0.632	0.632	0.61	0.624	0.613	0.602	
		雌 A (g)	2.08	↓1.978	2.01	↓1.927	1.993	1.926	1.942	↓1.855	
		R (%)	0.762	0.742	0.755	0.732	0.705	0.693	0.707	↓0.657	
	卵 巢	雌 A (mg)	141.6	134.52	142.4	143.24	151.24	↓135.12	140.64	137.76	
		R (%)	0.052	0.05	0.054	0.055	0.053	↓0.049	0.051	0.049	
	脳	雄 A (g)	2.095	2.087	2.072	2.073	2.123	2.131	2.114	↓2.063	
		R (%)	0.459	0.453	0.46	0.459	0.428	0.443	0.442	0.455	
		雌 A (g)	1.932	1.936	1.974	1.9	1.948	1.934	↑2.006	1.963	
		R (%)	0.709	0.728	0.743	0.724	0.691	0.697	↑0.733	0.698	
	原始卵胞 ^c		—	—	—	—	100	—	—	118	
	発育卵胞 ^c		—	—	—	—	49	—	—	48	
	原始卵胞 + 発育卵胞 ^c		—	—	—	—	149	—	—	166	
	グラフ卵胞 ^c		—	—	—	—	6.8	—	—	7.4	
	剖検所見		検体投与に起因する異常は認められなかった								
	病理組織学的所見										
肝細胞肥大(小葉中心性)											
雄		0/25	0/25	↑9/25	↑25/25	1/25	0/25	↑10/25	↑25/25		
雌		0/25	0/25	↑6/25	↑25/25	0/25	0/25	↑8/25	↑25/25		
肝細胞脂肪変性(小葉中心性)											
雄		0/25	1/25	0/25	3/25	0/25	0/25	0/25	↑8/25		
雌		0/25	0/25	0/25	1/25	0/25	0/25	0/25	0/25		

b: A 平均絶対重量, R 平均相対重量(体重比), c: 平均数

Kruskal-Wallis H 検定及び Wilcoxon 検定: 臓器重量

Wilcoxon 検定: 卵胞数, 剖検所見

Fisher の直接確率計算法: 病理組織学的所見

↑ ↓: P ≤ 0.05, ↑ ↓: P ≤ 0.01 で対照群と比較して統計学的に有意差あり.

結 果(続き) :

世 代		親 : F0 児 : F1				親 : F1 児 : F2				
投与量 (ppm)		0	100	1000	10000	0	100	1000	10000	
親 動 物	繁殖能力									
	雄	交尾率	25/25	25/25	25/25	25/25	25/25	25/25	25/25	23/25
		授精率	25/25	25/25	22/25	25/25	25/25	25/25	23/25	22/25
		精子数 ($\times 10^6$) ^{a, b}	100	—	—	98	87	—	—	85
			671	—	—	662	705	—	—	679
		運動精子率 (%) ^a	89	86	83	89	89	88	87	↓ 83
		正常形態 精子 (%) ^a	95.6	—	—	96.0	97.3	95.7	95.8	94.7
	異常形態 精子 (%) ^a	4.4	—	—	4.0	2.7	4.3	4.2	5.3	
	雌	性周期 ^a (発情日数)	5.2	5.2	5.2	5.3	5.6	5.2	5.4	5.5
		交尾成立 までの日数 ^a	2.8	2.2	2.4	2.5	2.3	2.1	2.7	2.9
		交尾率	25/25	25/25	25/25	25/25	25/25	25/25	25/25	23/25
		妊娠率	25/25	25/25	22/25	25/25	25/25	25/25	23/25	22/23
		出産率	24/25	25/25	22/22	24/25	25/25	25/25	23/23	22/22
		妊娠期間 (日) ^a	21.8	21.8	21.9	21.8	22.0	22.0	↓ 21.7	21.8
着床数 ^a		17.4	↓ 15.6	16.3	↓ 15.2	15.4	15.1	17.1	15.2	
着床後胚 損失率 (%) ^a		12.8	14.7	13.7	18.6	7.0	10.8	9.1	↑ 15.4	

a: 平均, b: 上段は精巢 1 g 当りの総精子細胞数, 下段は精巢上体尾部 1 g 当りの総精子数

Dunnett 検定: 性周期, 交尾成立までの日数, 妊娠期間, 着床数, 着床後胚損失率

Fisher の直接確率計算法: 交尾率, 授精率, 妊娠率, 出産率

Wilcoxon 検定: 精子数, 正常形態精子, 異常形態精子

Wilcoxon 検定 (Bonferoni-Holm の補正付): 運動精子率

↑ ↓: $P \leq 0.05$, ↑ ↓: $P \leq 0.01$ で対照群と比較して統計学的に有意差あり.

結果(続き):

世代		親: F0 児: F1				親: F1 児: F2			
投与量(ppm)		0	100	1000	10000	0	100	1000	10000
一般状態		検体投与に起因する異常は認められなかった							
出産児数 ^a		15.8	↓13.2	14.2	↓13.0	14.2	13.4	15.5	13.0
生存児出産率(%)		96	99	96	99	97	99	97	97
性比%(雄/雄+雌)									
哺育0日		48.9	51.1	50.2	47.2	47.7	53.3	50.9	47.5
哺育21日		49.5	51.8	50.0	47.2	49.2	53.0	48.9	50.6
生存率(%)		95	93	92	94	93	91	97	↓86
哺育率(%)		99	100	99	99	100	100	100	99
包皮分離(日齢)		44.5	44.1	44.0	44.5	—	—	—	—
腔開口(日齢)		30.6	31.0	30.7	31.6	—	—	—	—
体重(g) ^a									
雄	生後1日	6.2	6.4	6.3	6.4	6.5	6.4	6.2	6.3
	生後4日 ^b	8.7	9.0	8.8	8.8	9.5	9.3	↓8.6	9.1
	生後7日	14.2	14.7	14.5	13.7	15.4	14.7	↓13.9	↓13.9
	生後14日	30.5	30.8	31.0	29.0	32.7	31.6	30.9	↓29.1
	生後21日	50.3	50.6	51.8	↓46.7	54.6	52.4	↓50.8	↓47.0
雌	生後1日	5.9	6.0	6.0	6.1	6.2	6.2	5.9	6.0
	生後4日 ^b	8.3	8.5	8.7	8.6	9.0	9.0	8.3	8.7
	生後7日	13.7	13.9	14.1	13.4	14.7	14.7	13.6	13.5
	生後14日	30.0	29.7	30.5	28.4	31.5	31.1	30.4	↓28.4
	生後21日	48.7	48.0	49.3	↓45.2	51.6	50.8	49.3	↓45.5
体重増加(g) ^a									
雄	生後1-4日	2.5	2.6	2.5	2.3	2.9	2.9	2.4	2.7
	生後4-7日	5.4	5.5	5.5	4.9	5.9	5.4	↓5.2	↓4.8
	生後7-14日	16.4	16.1	16.5	↓15.4	17.3	16.8	17.0	↓15.2
	生後14-21日	19.8	19.8	20.8	17.6	21.9	20.9	↓19.8	↓17.9
	生後4-21日	41.7	41.6	43.0	↓37.9	45.2	43.1	↓42.2	↓37.9
雌	生後1-4日	2.3	2.5	2.6	2.5	2.9	2.8	2.4	2.7
	生後4-7日	5.3	5.2	5.3	↓4.8	5.6	5.5	5.1	↓4.7
	生後7-14日	16.3	15.8	16.2	↓15.1	16.9	16.4	16.8	↓14.9
	生後14-21日	18.7	18.3	18.7	↓16.7	20.0	19.7	19.0	↓17.1
	生後4-21日	40.4	39.4	40.5	↓36.6	42.5	41.6	41.0	↓36.8
臓器重量	雄 A(g)	1.459	1.464	1.461	1.430	1.489	1.461	1.469	1.462
	R(%)	2.899	2.888	2.784	↑3.048	2.710	2.837	↑2.970	↑3.123
	雌 A(g)	1.409	1.423	1.433	1.410	1.435	1.426	1.430	1.413
	R(%)	2.848	2.924	2.956	↑3.095	2.838	2.772	2.942	↑3.107
	雄 A(g)	0.175	0.175	0.179	0.164	0.200	↓0.166	↓0.176	↓0.162
	R(%)	0.343	0.342	0.343	0.348	0.363	↓0.316	0.353	0.345
	雌 A(g)	0.180	0.174	0.193	↓0.162	0.193	0.181	0.195	0.175
	R(%)	0.362	0.353	0.394	0.355	0.382	↓0.349	0.398	0.380
	雄 A(g)	0.222	0.213	0.222	0.201	0.260	0.242	↓0.215	↓0.189
	R(%)	0.431	0.409	0.424	0.423	0.467	0.459	0.429	↓0.397
雌 A(g)	0.232	0.211	0.220	0.199	0.238	0.237	0.218	↓0.196	
R(%)	0.461	0.426	0.448	0.436	0.468	0.456	0.443	0.422	
剖検所見		検体投与に起因する異常は認められなかった							

a: 平均, b: 児数調整前, c: A 平均絶対重量, R 平均相対重量(体重比) - : 検査せず

Dunnett 検定: 産児数, 体重, 体重増加, 包皮分離, 腔開口

Fisher の直接確率計算法: 生存児出産率, 性比, 生存率, 哺育率

Kruskal-Wallis 検定及び Wilcoxon 検定: 臓器重量 Wilcoxon 検定: 剖検所見

↑ ↓: P ≤ 0.05, ↑ ↓: P ≤ 0.01 で対照群と比較して統計学的に有意差あり。

親動物

10000ppm群で、F0雌の体重増加は一過性の低値が散見され、生育6~7週と妊娠期間中に有意に減少したが、哺育期間中に体重が増加し、対照群と同等になった。F1雌で体重増加に対照群との差はほとんどなかったが、哺育期間中に増加が認められた。雄ではF1のみ体重の有意な減少が認められた。

摂餌量に有意な差は認められなかった。

肝臓重量(F0及びF1雌、雄はF1の相対重量のみ)が有意に増加し、これに関連して、小葉中心性肝細胞肥大が全例に、さらに小葉中心性肝細胞脂肪変性も雄で増加傾向(F0)あるいは増加(F1)が認められた。これら体重及び肝臓の変化は検体の投与に起因する変化と考えられる。一方、脾臓、腎臓及び脳の絶対あるいは相対重量に有意な低値がみられたが、いずれも病理組織学的に異常が認められなかったことから、検体投与との関連はないと考えられる。

1000ppm群では、F0及びF1雌雄とも体重及び体重増加に一過性の低値または高値が散見され、哺育期間中に体重の増加がみられた。

摂餌量は対照とほぼ同じであった。

脾臓及び脳の絶対あるいは相対重量の増加あるいは減少がみられたが、いずれも病理組織学的に異常が認められない、または高用量では変化がみられていないことから、検体投与とは関連のない偶発的なものと考えられる。一方、肝臓重量の変化はみられなかったが、小葉中心性肝細胞肥大がF0及びF1の多数例で認められた。

100ppm群では、体重増加または摂餌量に有意な一過性の低値または高値が散見されたが、検体投与とは関連のない偶発的なものと考えられる。また、F0雌の腎臓の絶対重量及びF1雌の卵巣重量に有意な低値がみられたが、病理組織学的に異常が認められない、または高用量では変化がみられていないことから、検体投与との関連はないと考えられる。

繁殖能力については、F0及びF1とも検査したいずれの指標にも検体投与に関連すると思われる影響は何ら認められなかった。100ppm群と10000ppm群でF0雌の着床数(対照の17.4に対してそれぞれ15.6と15.2)、1000ppm群でF1雌の妊娠期間(対照の22.0に対し21.7)にそれぞれ統計学的に有意な低値がみられたが、いずれも背景対照データの範囲内(着床数:11.1~16.4、妊娠期間:21.1~22.5)にあることから、検体投与に関連のない偶発的なものと考えられる。また、10000ppm群のF1雌で着床後胚損失率(15.4%)が有意に高かったが、産児数は背景データの範囲内にあることから偶発的な変動と考えられる。

また、10000ppm群でF1雄の運動精子率の有意な低下がみられた。異常精子率および正常精子率に有意な差はみられなかった。次表に示すように、これらのいずれも背景データの範囲内にあることから検体投与に関連のない偶発的なものと考えられる。

背景データとの比較

世 代		親 : F0 児 : F1				親 : F1 児 : F2			
投与量 (ppm)		0	100	1000	10000	0	100	1000	10000
運動精子率	本試験	89	86	83	89	89	88	87	83
	背景データ, 平均(範囲)	90 (65~99)							
正常形態精子	本試験	95.6	—	—	96.0	97.3	95.7	95.8	94.7
	背景データ, 平均(範囲)	97.3 (81.5~100.0)							
異常形態精子	本試験	4.4	—	—	4.0	2.7	4.3	4.2	5.3
	背景データ, 平均(範囲)	2.7 (0.0~18.5)							

児動物

10000ppm群において、F0産児数に有意な低値(対照の15.8に対して13.0)がみられたが、背景データの範囲内(11.1~16.4)にあることから、検体投与との関連は考えられなかった。F1及びF2児の雌雄とも体重及び体重増加が統計学的に有意に減少した。F2児では生後0~4日の生存率が有意に減少したが、背景データの範囲(83~99%)内にあるものの、F1親への影響があることから投与に関連がある可能性がある。

臓器重量において、絶対あるいは相対重量の両方に同じ影響があり、また用量反応関係がある場合に投与の関連が考えられることから、F1及びF2児動物でみられた臓器重量の変化のうち、F2児雄の脾臓重量の有意な減少のみに投与の影響が考えられた。これは体重の減少の直接的影響と考えられ、その他の変動は他の投与群を含め偶発的で毒性学的に関連がないものと考えられた。

1000ppm群では、F1児に検体投与の影響はみられなかったが、F2雄児の体重が有意に減少した。

100ppm群では、F1及びF2児とも検体投与に関連のある影響は何ら認められなかった。F0産児数の有意な低値は、上記のように背景データの範囲内にあることから、検体投与との関連は考えられなかった。

以上の結果から、2世代にわたって本剤を飼料に混入して投与した場合、10000ppm群では親動物に体重の変動、小葉中心性肝細胞肥大及び肝細胞脂肪変性を伴う肝臓重量の増加が、児動物において体重の減少が認められた。

1000ppm群において、親動物で小葉中心性肝細胞肥大が、児動物でF2児に体重の減少が認められた。

100ppm群では親及び児動物とも本剤の投与の影響は認められなかった。

従って、無毒性量は親及び児動物とも100ppm(F0 : 雄10.1mg/kg/日, 雌10.7mg/kg/日, F1 : 雄12.3mg/kg/日, 雌12.5mg/kg/日)と判断される。繁殖については10000ppmでも影響は認められなかった。

8-2) ラットを用いた催奇形性試験

(資料 18)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：2000年

検体純度：

供試動物：Wistarラット [Chbb:THOM(SPF)], 1群当り交尾確認雌25匹,

妊娠0日：10~11週齢, 平均体重 215g

なお, 100及び1000mg/kg群は誤投与により, 妊娠7~9日にそれぞれ3匹死亡した
ので, 妊娠動物を20匹以上得るために, 3匹ずつ追加した。

試験期間：30日間(1998年10月27日~1998年11月25日)

投与方法：検体を賦形剤(再蒸留水中の0.5% Tylose CB 30.000)に懸濁し, 0, 100, 300
及び1000 mg/kg/日の投与用量で, 妊娠6~19日まで(着床から出産予定日の1日前
まで)の14日間毎日1回ほぼ同時刻(午前中)に, 10mL/kg体重の容量で強制経口投与し
た(陰垢中に精子を確認した日を妊娠0日とした)。なお, 対照群の動物には賦形剤の
み同様に投与した。

用量設定根拠：

観察・検査項目：

母動物：一般状態及び生死を毎日観察した。体重は妊娠0, 1, 3, 6, 8, 10, 13, 15,
17, 19及び20日, 摂餌量は妊娠0日を除き体重測定日と同日に測定した。妊娠20日に帝
王切開して, 肉眼的病理検査を行い, ついで黄体数, 妊娠子宮重量, 着床数, 死亡胚(早
期吸収胚, 後期吸収胚, 死亡胎児)数, 生存胎児数及び胎盤重量を検査した。

胎児：性別, 体重及び外表の観察を行った。各同腹児群の1/2の胎児については骨格
標本を作製し, 骨格異常の有無を検査し, 残りの胎児については内臓異常の有無を検
査した。

試験結果：結果の概要を以下の表に示す。

母動物：

投与量(mg/kg/日)	対照(0)	100	300	1000	
1群当り雌動物数	25	28 ^c	25	28 ^c	
死亡動物数(誤投与)	0	3	0	3	
不妊動物数	3	5	3	4	
妊娠雌動物数(%)	22/25(88)	23/28(82)	22/25(88)	24/28(86)	
妊娠雌動物数	22	20	22	21	
一般状態	検体投与に起因する異常は認められなかった				
体重	—	影響なし	影響なし	影響なし	
体重増加	—	影響なし	影響なし	影響なし	
摂餌量	—	影響なし	影響なし	影響なし	
剖検所見	検体投与に起因する異常は認められなかった				
妊娠子宮重量 ^a (g)	83.8±14.24	70.1±26.75	84.8±16.74	78.8±17.39	
補正体重増加 ^{a,d}	38.1±9.67	36.2±10.83	39.5±8.30	39.6±7.83	
カーカス重量 ^{a,e}	282.1±17.74	279.9±11.48	287.0±16.93	284.4±12.97	
着床所見	黄体数 ^a	16.8±1.77	15.4±2.39	17.0±1.65	15.9±2.10
	着床数 ^a	16.1±2.52	13.9±4.15	16.0±3.19	14.6±3.53
	着床前胚死亡率(%) ^b	4.1	9.6	6.5	8.6
	着床後胚損失率(%) ^b	9.7	17.8	5.3	6.2
	総胚吸収数(%) ^b	1.6(9.7)	1.6(17.8)	0.9(5.3)	0.9(6.2)
	早期胚吸収数(%) ^b	1.5(9.4)	1.4(16.4)	0.9(5.3)	0.8(5.6)
	後期胚吸収数(%) ^b	0.0(0.3)	0.3(1.4)	0.0(0.0)	0.1(0.6)
	死亡胎児数	0	0	0	0
	全胚吸収の腹数	0	2	0	0
生存胎児を有する腹数	22	18	22	21	

a：平均±標準偏差

b：平均

c：誤投与により各3匹が100mg/kg群では妊娠7および8日、1000mg/kg群では妊娠8、9日に死亡したため、さらに交尾確認雌各3匹を追加

d：補正体重増加＝最終体重－(妊娠子宮重量+妊娠6日の体重)

e：カーカス重量＝最終体重－妊娠子宮重量

Dunnett検定：体重、体重増加、摂餌量、妊娠子宮重量、補正体重増加、カーカス重量、黄体数、着床数、着床前(後)胚死亡率、胚吸収数(率)

胎 児；

投与量 (mg/kg/日)	対照 (0)	100	300	1000
生存胎児のある腹数	22	18	22	21
生存胎児数 ^a 雄雌合計	14.5±2.61	13.7±2.22	15.1±3.18	13.7±3.45
雄	8.0±2.50	7.1±2.45	7.6±2.75	6.8±2.02
雌	6.5±2.46	6.6±2.15	7.5±2.20	6.9±2.99
性 比 (%) 雄	55.5	52.0	50.5	49.8
雌	44.5	48.0	49.5	50.2
体 重 ^a (g) 雄	4.0±0.20	3.9±0.39	3.8±0.20	4.0±0.26
雌	3.8±0.26	3.7±0.30	3.6±0.22	3.8±0.26
胎盤重量 ^a (g)	0.45±0.06 2	0.45±0.077	0.44±0.049	0.44±0.03 6
検査胎児(腹)数	319(22)	246(18)	333(22)	287(21)
全 奇 形				
胎 児 数(腹数)	4(4)	4(1)	1(1)	0(0)
腹当り平均発生率 (%)	1.6	1.7	0.3	0.0
全 変 異				
胎 児 数(腹数)	163(22)	132(18)	182(22)	160(21)
腹当り平均発生率 (%)	51.2	53.7	54.9↑	56.2↑
外表異常				
検査胎児(腹)数	319(22)	246(18)	333(22)	287(21)
奇形:無眼球症		2(1)		
未分類異常:胎盤癒合	2(2)	2(1)		
内臓異常				
検査胎児(腹)数	155(22)	118(18)	159(22)	139(21)
奇形:食道背側大動脈弓	1(1)	1(1)		
心室肥大	1(1)			
変異:腎盂拡張	18(12)	20(10)	22(12)	27(15)
脳室拡張		1(1)		1(1)
尿管拡張	2(2)	1(1)	6(5)	3(3)
骨格異常				
検査胎児(腹)数	164(22)	128(18)	174(22)	148(21)
奇形:胸骨分節位置異常/二分	2(2)			
変異:上後頭骨有窓	85(21)	60(18)	93(21)	75(20)
胸椎体不完全骨化	5(3)	4(3)	3(2)	14(10↑)
(軟骨異常なし)				
発生率%(腹あたり)	3	3.4	1.6	9.2↑
仙骨弓不完全骨化	16(9)	10(5)	15(8)	21(10)
(軟骨異常なし)				
胸骨未骨化(軟骨異常なし)	14(10)	14(8)	21(10)	8(4)
胸骨不完全骨化	52(17)	38(16)	50(17)	39(15)
(軟骨異常なし)				
胸骨変形(軟骨異常なし)	94(22)	63(18)	86(20)	62(18)
13肋骨短小(軟骨なし)	23(10)	23(10)	23(12)	25(12)
変異合計	145(22)	111(18)	160(22)	132(21)
その他軟骨の未分類異常				
肋軟骨分岐	2(1)	3(3)	8(5)	3(3)
発生率%(腹あたり)	1.1	2.3	4.6↑	2.2
未分類異常合計	57(19)	54(17)	61(18)	56(17)

↑: p ≤ 0.05で対照群と比較して統計的に有意差あり

空欄は0(0)である

Dunnett検定: 生存胎児数, 胎児体重, 胎盤重量

Fisherの直接確立検定: 胎児所見のある腹数

Wilcoxon検定: 腹当りの奇形及び(または)変異胎児の発生率

母動物

検体投与の影響は1000mg/kgの用量まで着床所見を含めいずれの指標についてもみられなかった(統計学的有意差は、低用量群における妊娠15~17日にみられた摂餌量の低値のみであった)。

胎児動物

外表異常及び内臓異常に検体投与の影響は認められなかった。

骨格異状において、検体投与による奇形は認められなかった。

変異において、胸椎体不完全骨化が1000mg/kg群で、また全ての変異を有する胎児の腹あたり発生率が300(発生率54.9%)及び1000mg/kg(発生率56.2%)で有意に増加したが、下表に示すようにいずれも背景データの範囲内にあった。この胸椎体不完全骨化の軟骨部分には変化が認められず、また他の脊柱の部分にも骨化障害を示す所見は認められず、全ての変異を有する胎児の発生率にも対照群との差がなかった。従って、これらの変異の統計学的有意差は検体投与に関連のない偶発的なものと判断される。

胸椎体不完全骨化及び全ての変異を有する胎児の発生率(%)の背景データとの比較

骨格変異/全変異所見	本試験		背景データ ^a	
	対照(0)	1000 mg/kg	平均	範囲
胸椎体不完全骨化(軟骨異常なし)				
胎児あたり発生率	5/164(3.0)	14/148(9.5)	35/876(4.0)	1.3~9.8
腹あたり発生率	3/22(14)	10/21(48) ↑	26/122(21.3)	9.5~40.0
腹あたり異常を有する胎児の発生率	3.0	9.2 ↑	4.1	1.4~9.7
全ての変異を有する胎児の発生率				
胎児あたり発生率	163/319(51)	160/287(56)	860/1693(50.8)	44.7~58.0
腹あたり発生率	22/22(100)	21/21(100)	122/122(100)	100
腹あたり異常を有する胎児の発生率	51.2	56.2 ↑	50.9	44.9~57.4

^a: 6試験, 腹数122, 検査胎児数1693のデータ

以上の結果より、本剤を妊娠ラットに投与したときの母動物及び胎児に対する無毒性量は1000mg/kg/日であった。また、最高用量の1000mg/kg/日でも胎児に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。

8-3) ウサギを用いた催奇形性試験

(資料 19)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：2000年

検体純度：

供試動物：Himalayanウサギ[Chbb:HM(アウトブレッド)]、1群当り人工授精雌25匹
授精後0日：34～36週齢、平均体重 2713g

試験期間：39日間(1998年9月14日～1998年10月22日)

投与方法：検体を賦形剤(再蒸留水中の0.5% Tylose CB 30.000)に懸濁し、0、100、300及び1000mg/kg/日の投与用量で、妊娠7～28日まで(着床から出産予定日の1日前まで)の22日間毎日1回、10mL/kg体重の容量で強制経口投与した(人工授精を行った日を妊娠0日とした)。なお、対照群の動物には賦形剤のみ同様に投与した。

用量設定根拠：

観察・検査項目：

母動物：一般状態及び生死を毎日観察した。体重は妊娠0、2、4、7、9、11、14、16、19、21、23、25、28及び29日に、摂餌量は毎日測定した。妊娠29日に帝王切開して、肉眼的病理検査を行い、ついで黄体数、妊娠子宮重量、着床数、死亡胚(早期吸収胚、後期吸収胚、死亡胎児)数、生存胎児数及び胎盤重量を検査した。

胎児：性別、体重及び外表の観察を行った。全胎児の胸腔及び腹腔内臓器の異常(各腹約半数の胎児の頭部をWilson法に従って頭部断面を検査した)の有無を検査した。さらに、残りの胎児の頭部を含む全胎児の骨格異常の有無を検査した。

試験結果：結果の概要を次頁の表に示す。

母動物；

投与量 (mg/kg/日)	対照 (0)	100	300	1000	
1群当り雌動物数	25	25	25	25	
妊娠雌動物数 (%)	25/25 (100)	24/25 (96)	25/25 (100)	25/25 (100)	
死亡動物数 (誤投与)	1 (妊娠22日)	0	1 (妊娠19日)	0	
流産	0	0	1 (妊娠26日)	3 (妊娠27, 29日)	
早産	0	0	0	1 (妊娠29日)	
終了時妊娠雌動物数	24	24	23	21	
一般状態					
変色便	0	0	0	1	
排便の減少	0	0	1	1	
体重 ^a (g)					
妊娠28日	2873±206.4	2878±173.7	2880±216.5	2734±146.1↓	
妊娠29日	2889±203.8	2891±170.0	2895±219.2	2752±141.7↓	
体重増加 ^a (g)					
妊娠0~7日	11.0±60.18	53.9±58.94↑	31.6±57.74	41.5±49.42	
妊娠7~28日	146.8±120.93	125.5±96.34	115.0±114.67	27.8±182.27↓	
妊娠0~29日	174.7±139.83	193.0±129.00	170.4±131.45	96.1±147.99	
摂餌量 ^a (g)					
妊娠7~8日	85.1±19.37	89.5±24.21	76.1±25.60	50.6±20.68↓	
妊娠8~9日	86.0±21.35	88.0±19.78	81.7±21.43	66.8±20.67↓	
妊娠11~12日	86.2±11.99	86.1±19.12	77.5±28.80	70.3±17.42↓	
妊娠12~13日	83.1±14.42	81.6±19.40	76.4±31.58	68.2±16.25↓	
妊娠14~15日	67.9±24.47	58.3±29.35	62.7±38.03	43.9±30.01↓	
妊娠15~16日	67.1±23.61	52.3±28.32	59.4±38.89	35.0±30.88↓	
妊娠16~17日	73.6±21.76	55.8±30.68	60.1±36.02	40.7±29.78↓	
妊娠17~18日	78.6±16.86	61.0±29.09	59.1±31.56↓	50.5±32.03↓	
妊娠18~19日	76.3±22.72	60.8±28.78	63.7±37.58	54.9±27.46↓	
妊娠21~22日	72.3±17.78	54.3±21.43↓	60.0±23.09	46.9±25.49↓	
妊娠22~23日	69.8±14.40	56.8±18.62	55.1±21.96	49.7±27.19↓	
妊娠23~24日	68.2±17.58	59.4±17.45	53.0±25.25	50.6±28.04↓	
妊娠27~28日	75.5±21.04	72.3±16.83	77.2±19.50	59.9±25.19↓	
剖検所見	検体投与に起因する異常は認められなかった				
妊娠子宮重量 ^a (g)	288.1±117.90	359.7±63.88↑	320.5±110.21	298.4±87.87	
補正体重増加 ^{a, c}	-125.3±91.57	-220.6±88.89↓	-190.3±100.93	-233.3±141.90↓	
カーカス重量 ^{a, d}	2601.1±194.63	2531.6±153.30	2574.4±232.93	2453.8±138.15↓	
着床所見	黄体数 ^a	8.7±1.68	9.2±1.58	8.6±2.00	9.1±1.49
	着床数 ^a	6.8±2.28	8.3±1.65↑	7.7±2.22	7.3±2.10
	着床前胚死亡率 (%) ^b	22.5	9.5↓	9.9↓	20.2
	着床後胚損失率 (%) ^b	19.9	7.7	16.8	14.2
	総胚吸収数 (%) ^b	1.2 (19.9)	0.7 (7.7)	1.4 (16.8)	0.8 (14.2)
	早期胚吸収数 (%) ^b	0.9 (16.7)	0.6 (6.8)	1.1 (13.5)	0.5 (9.6)
	後期胚吸収数 (%) ^b	0.3 (3.3)	0.1 (0.9)	0.3 (3.4)	0.3 (4.6)
	死亡胎児数	0	0	0	0
	全胚吸収の腹数	1	0	1	0
	生存胎児を有する腹数	23	24	22	21

a 平均±標準偏差

b 平均

c: 補正体重増加=最終体重-(妊娠子宮重量+妊娠6日の体重)

d: カーカス重量=最終体重-妊娠子宮重量

↑↓: p≤0.05, ↓: p≤0.01で対照群と比較して統計学的に有意差あり

Dunnett検定: 体重, 体重増加, 摂餌量, 妊娠子宮重量, 補正体重増加, カーカス重量

Fisherの直接確立検定: 妊娠率

胎 児；

投与量 (mg/kg/日)	対照 (0)	100	300	1000
生存胎児を有する腹数	23	24	22	21
生存胎児数 ^a				
雄雌合計	5.9±2.26	7.6±1.56↑	6.6±2.13	6.5±2.46
雄	2.7±1.76	4.0±1.10↑	3.0±1.45	2.8±1.25
雌	3.1±1.63	3.6±1.61	3.6±1.92	3.7±1.98
性 比 (%)				
雄	46.7	52.5	45.5	43.4
雌	53.3	47.5	54.5	56.6
体 重 ^a (g)				
雄	36.2±3.94	34.8±3.72	37.2±3.93	34.9±6.54
雌	36.4±3.88	35.0±4.73	36.6±3.98	34.4±6.19
胎盤重量 ^a (g)	4.2±0.92	4.1±0.52	4.3±0.70	4.0±0.99
検査胎児(腹)数	135 (23)	183 (24)	145 (22)	136 (21)
全 奇 形				
胎 児 数(腹数)	7 (6)	11 (7)	7 (5)	2 (2)
腹当り平均発生率 (%)	4.5	6.5	3.8	1.9
全 変 異				
胎 児 数(腹数)	86 (21)	134 (24)	92 (22)	89 (19)
腹当り平均発生率 (%)	62.2	71.6	63.9	59.6

a 平均±標準偏差

↑ : p ≤ 0.05, ↑↑ : p ≤ 0.01で対照群と比較して統計学的に有意差あり

Dunnett検定 : 生存胎児数, 胎児体重, 胎盤重量

Fisherの直接確立検定 : 胎児所見のある腹数

Wilcoxon検定 : 腹当りの奇形及び(または)変異胎児の発生率

胎児（数値は、括弧外は検査/異常発生胎児数、括弧内は検査/異常胎児を有する腹数、空欄は発生なし）

投与量(mg/kg/日)	対照(0)	100	300	1000
検査胎児(腹)数	135(23)	183(24)	145(22)	136(21)
外表異常				
奇形：胎児数(腹数)		1(1)	2(2)	
腹当り平均発生率(%)		0.7	1.0	
髄膜脳瘤			1(1)	
小頭症			1(1)	
二分脊椎		1(1)		
糸状尾			1(1)	
変異：胎児数(腹数)	5(4)	4(3)	4(4)	2(2)
腹当り平均発生率(%)	3.2	2.2	2.5	1.0
内臓異常				
奇形：胎児数(腹数)	5(4)	5(5)	3(2)	
腹当り平均発生率(%)	3.3	3.5	1.8	
動脈幹遺残	1(1)			
肺動脈位置異常	1(1)		1(1)	
肺動脈幹狭小			1(1)	
大動脈位置異常	1(1)			
筋性心室中隔欠損	4(3)	3(3)	1(1)	
膜性心室中隔欠損	1(1)		1(1)	
心臓：小型心室	1(1)			
胆嚢欠損		1(1)	1(1)	
腎臓欠損		1(1)		
尿管欠損		1(1)		
卵巣欠損		1(1)	1(1)	
子宮角欠損		1(1)		
変異：胎児数(腹数)	7(6)	15(9)	9(4)	12(9)
腹当り平均発生率(%)	5.3	7.3	6.1	7.5
骨格異常				
奇形：胎児数(腹数)	2(2)	5(3)	5(4)	2(2)
腹当り平均発生率(%)	1.2	2.3	2.6	1.9
重度奇形頭蓋			1(1)	
胸椎体、椎弓と対応する肋骨の欠損	1(1)			
重度奇形頸椎			1(1)	
奇形頸椎		1(1)		
奇形胸椎	1(1)			
腰椎欠損		2(2)		1(1)
尾椎欠損			1(1)	
奇形尾椎			1(1)	
奇形肩甲骨		1(1)	1(1)	1(1)
骨板(胸骨分節重度癒合)	1(1)		2(2)	
胸骨分節配列不整		1(1)		
肋骨癒合		1(1)	1(1)	
変異：胎児数(腹数)	82(21)	127(24)	86(21)	84(19)
腹当り平均発生率(%)	59.7	68.2	59.8	56.5
舌骨不完全骨化：胎児数(腹数)	18(13)	38(20↑)	30(12)	21(12)
腹当り平均発生率(%)	11.6	20.7	17.9	15.1
頭頂骨有窓：胎児数(腹数)		2(2)	4(4↑)	1(1)
腹当り平均発生率(%)		1.1	2.5↑	0.6
胸椎椎体不完全骨化：胎児数(腹数)	1(1)	4(4)	6(3)	16(7↑)
腹当り平均発生率(%)	0.7	1.8	2.9	8.3↑

変異については、統計学的に有意差のみられたものだけを示した。

↑：p≤0.05, ↑↑：p≤0.01で対照群と比較して統計学的に有意差あり

Fisherの直接確立検定：胎児所見のある腹数

Wilcoxon検定：腹当りの奇形及び(または)変異胎児の発生率

母動物

1000mg/kg群では4例が流産/早産し、その1例には流産前の数日間変色便及び脱糞の減少が観察された。投与期間の殆どの時期で有意な摂餌量の減少を伴い、体重及び体重増加の明らかな低下が認められた。着床所見に検体投与の影響は認められなかった。

300mg/kg群では流産1例と、この雌には流産前の数日間に脱糞の減少が認められた。

100mg/kg群では、検体投与の影響は何ら認められなかった。

胎児動物

外表異常及び内臓異常に検体投与の影響は認められなかった。

骨格異状において、検体投与による奇形は認められなかったが、変異を有する胎児の発生率に有意な増加がみられた。

変異である胸椎体不完全骨化の発生率が1000mg/kg群で有意に増加したが、脊柱の他の部分に関連の所見がみられないこと、また骨格変異胎児を有する腹の発生率(1000mg/kg群90%対対照群91%)及び腹当りの骨格変異胎児の平均発生率(1000mg/kg群56.5%対対照群59.7%)とも対照群より低かった。また、次表に示すように、胸椎体不完全骨化の腹あたり発生率及び腹あたり異常を有する胎児の発生率も背景データの範囲内にあるので、この所見は偶発的なものと判断される。

300mg/kg群で頭頂骨有窓及び100mg/kg群で舌骨不完全骨化が有意に増加していたが、いずれも高用量で認められず、用量関連性がないことから検体投与とは関連のない偶発的なものと判断される。

胸椎体不完全骨化の発生率(%)の背景データとの比較

骨格変異/全変異所見	本試験		背景データ ^o	
	対照(0)	1000 mg/kg	平均	範囲
胸椎体不完全骨化(軟骨異常なし)				
胎児あたり発生率	1/135(0.7)	16/136(12)	28/1353(2.1)	0.0~18.3
腹あたり発生率	1/23(4.3)	7/21(33)↑	19/204(9.3)	0.0~73.3
腹あたり異常を有する胎児の発生率	0.7	8.3↑	1.8	0.0~17.3

^o: 骨化異常を奇形、変異、遅延に分類した13試験、腹数204、検査胎児数1353のデータである。本試験の胸椎体不完全骨化は旧用語の「胸椎体骨化遅延」に相当するので、これを引用した。

以上の結果より、本剤を妊娠ウサギに投与したときの母動物及び胎児に対する無毒性量はそれぞれ100及び1000mg/kg/日であった。また、最高用量の1000mg/kg/日でも胎児に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。