

MPP のラットを用いた混餌投与による 1 年間反復経口投与毒性/発がん性併合試験
(毒性資料 No. 原体-16)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：

検体の純度： %

試験動物：フィッシャー 344 [CDF (F-344) / Cr1 / Br] 系ラット

[試験開始時；約 6 週齢(平均体重；雄 114g, 雌 96g)]

主群/1 群雌雄各 50 匹(2 年間反復経口投与)；対照群及び全投与用量群

衛生群/1 群雌雄各 20 匹(1 年間反復経口投与)；対照群及び最高用量群

投与期間：2 年間

試験方法：

検体を 0(対照群)、5、20、100ppm となるように粉末飼料(1%のコーン油添加)に混ぜ、1 年間あるいは 2 年間ラットに投与した。検体を混入した飼料は週毎に調製した。給餌回数は週 2 回とした。

観察・検査項目及び結果：

1. 臨床症状

動物を少なくとも 1 日 2 回(週末と休日は 1 回)観察し、臨床症状と異常を記録した。各個体の詳細な身体検査および組織塊のための触診は週 1 回実施した。

臨床症状は主に 100ppm で認められ、尿の着色を示す動物数の増加、脱毛、背弯姿勢、軟便、粗毛であった。

2. 死亡(表 1)

死亡数、死亡の発生の時期などに本検体の投与による影響は認められなかった。

表 1 死亡数(50 匹中)

投与量(ppm)	0	5	20	100
雄				
死亡数	4	2	4	4
切迫屠殺動物	17	19	21	15
平均死亡時期(日)	689	696	677	706
雌				
死亡数	6	5	1	8
切迫屠殺動物	9	9	16	13
平均死亡時期(日)	697	704	701	644

3. 体重(図 1a, 図 1b)

個体ごとに毎週測定した。

更に、臓器の対体重比の計算のため、計画屠殺直前に体重を測定した。

100ppm 群雌雄において、体重増加抑制が認められ、雄では 30 週、雌では 50 週頃からその傾向が明らかとなった。

図 1a. 体重(雄)－主群

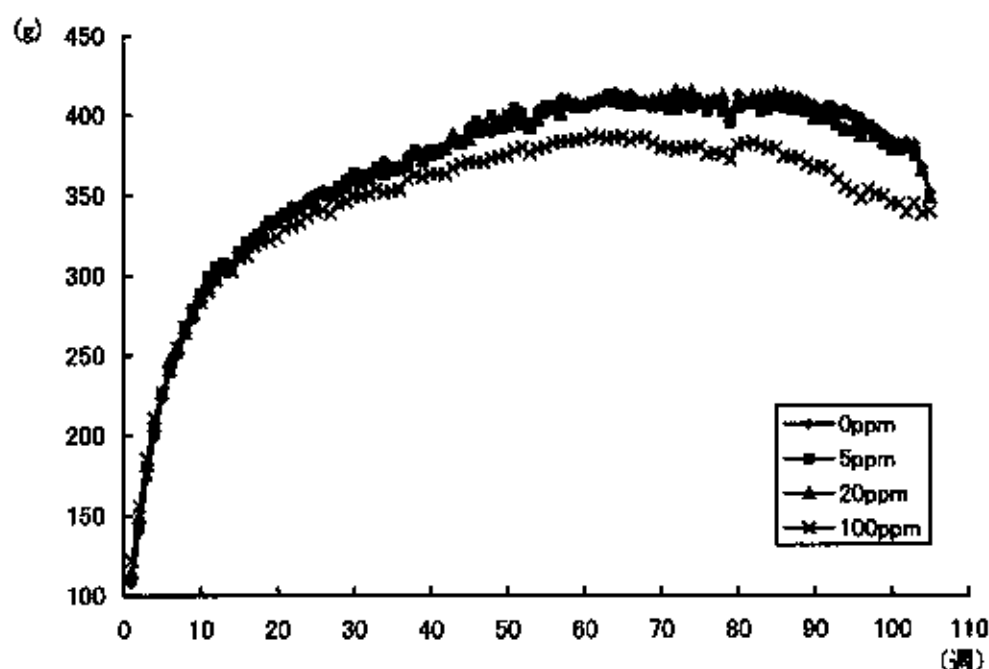
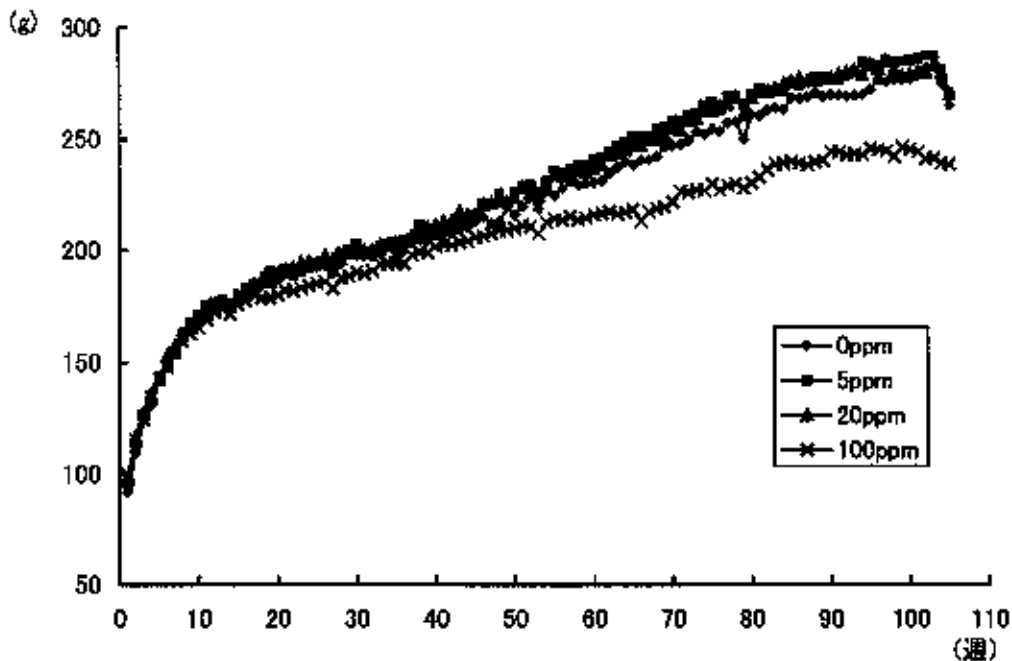


図 1b. 体重(雌) - 主群



4. 摂餌量及び検体摂取量(表 2)

摂餌量を全例について毎週 1 回測定しこれを基に検体摂取量を算定した。
 投与群の雌雄の平均摂餌量は対照群と比較して顕著な差がなかった。

表 2 検体摂取量(mg/kg 体重/日)

投与量(ppm)		5	20	100
検体摂取量	雄	0.2	0.8	5.2
	雌	0.3	1.3	7.3

5. 眼科学的検査

投与開始前および試験終了時に眼科学的検査をすべてのラットで行った。散瞳させる前に瞳孔反射、結膜、角膜、虹彩について検査した。散瞳剤(Mydriacyl 1%)を用いて散瞳させた後、水晶体、硝子体液および網膜について調べた。

100ppm 雌雄において、試験終了時に以下の眼科学的所見がみられた。

雌では網膜変性を示す例の頻度の増加がみられた(用量昇順; 0, 1, 0, 26)。後囊下白内障の形成もまた 100ppm の雌で増加した(用量昇順; 1, 1, 1, 14)。限局性の角膜の傷(角膜変性)(用量昇順; 雄 16, 16, 22, 31, 雌 23, 29, 29, 31)は F344 のラットでは珍しい所見ではないが、雌雄ともに 100ppm で増加した。角膜の病理組織検査において、角膜変性を示唆する所見(角膜の血管新生および/あるいは鉾質沈着)が 100ppm の雌雄で統計学的に有意な頻度で増加していることから、100ppm で認め

られた眼科学的所見は、生物学的に意味のある変化と考えられた。

衛生群については、100ppmの雄で角膜に多数のくぼみを呈した小さな斑点を示す例がわずかに増加した。この所見はほとんどの場合片眼のみでみられ、角膜刺激性を調べるためフルオレセインで染色を行った動物において結果は陰性で、また病理組織学的検査において角膜損傷を示唆する所見が認められなかったため、生物学的に意味のある所見とは考えられなかった。

網膜変性、白内障、および/あるいは角膜変性から、眼科学的な NOEL は雌雄ともに 20ppm であった。

6. 網膜電位図測定

主群の雌雄各群少なくとも 10 匹について試験 75 週と試験終了時に網膜電位図測定を行った。衛星群については実施しなかった。

全群の雄及び 5ppm 及び対照群の雌では正常な網膜電位図が得られた。20ppm 群以上の雌では網膜電位図は横ばい状態あるいは抑制状態を示した。

従って、網膜電位図の NOEL は雄では 100ppm、雌では 5ppm であった。

7. 臨床生化学検査

主群では任意に選抜した各群 20 匹の動物について、3、6、12、18、24 ヶ月目に血液一般検査、血液生化学的検査、尿検査を行った。白血球分画を求めるための血液スメアは可能な限り、切迫屠殺動物および試験最終時に生存した動物について作成した。

採血は眼窩静脈叢で行い、全ての動物を採血前に絶食させた。

衛生群では、投与終了時に生存した動物について血液学的検査および臨床生化学検査を行った。

7-1. 血液学的検査

白血球分画、赤血球形態、赤血球数、白血球数、ヘモグロビン濃度(HB)、ヘマトクリット値(HCT)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)、平均赤血球容積(MCV)、血小板数(THRO)を測定又は算定した。

血液学的検査で、雌雄ともに、対照群と投与群の間に統計学的に有意な差は認められなかった。

7-2. 血液生化学的検査 (表 3)

アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALAT)、アルカリホスファターゼ(ALP)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT)、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ(GGTP)、クレアチンホスフォキナーゼ(CPK)、乳酸脱水素酵素(LDH)、脳コリンエステラーゼ(最終時のみ,BCHE)、赤血球コリンエステラーゼ(RCHE)、

Confidential

血漿コリンエステラーゼ(PCHE)、アルブミン(ALB)、総ビリルビン(TBIL)、コレステロール(CHOL)、クレアチニン(CREA)、総蛋白(PROT)、トリグリセリド(TRIGL)、尿素窒素(BUN)、グルコース(GLUC)、尿酸(URIC)、グロブリン(GLOB)、クロリド(CL)、カルシウム(Ca)、無機リン(P)、カリウム(K)、ナトリウム(Na)

統計学的な有意差が各測定項目でいくつもみられたが、コリンエステラーゼ活性を除き、いずれの項目についても用量に依存したり、時間的経過に関連した変化は認められなかった。

コリンエステラーゼ活性については、雌雄ともに血漿、赤血球、脳コリンエステラーゼ阻害に用量に依存した阻害がみられた。血漿コリンエステラーゼの阻害は毒性学的に意味のあるものとはみなさなかつた。赤血球コリンエステラーゼおよび脳コリンエステラーゼの阻害については、対照群に比較して 20%以上の阻害が認められた場合を毒性学的に有意とした。この評価基準から、5ppm がコリンエステラーゼ阻害に基づく NOAEL であった。

表 3-1 血液生化学的検査 - 雄 - (有意差の認められた項目)

投与量	5ppm					20ppm					100ppm					
	14	27	53	79	105	14	27	53	79	105	14	27	52#	53	79	105
ASAT											↑110					
ALP													↓74			
LDH		↓54								↑311	↑168					↑195
GGTP*			↑4	↓2	↓1					↓3	↑3				↓1	↓2
CPK										↑183	↑142					
GLUC	↑106			↓92				↓94		↓85	↑106				↓93	
TBIL**						↑0.1	↑0.2	↓0.0		↑0.1	↑0.2	↑0.1		↓0.1	↓0.0	↓0.0
CHOL											↓92	↓89	↓96			
TRIG			↓74					↓81					↓66	↓60		
PROT		↓96						↓95	↓97				↓93	↓93	↓96	
BUN			↓94	↓89		↓94			↓89		↓94		↑108	↓88	↓83	
CREA								↓83						↓83	↓100	
URIC		↓67			↓17	↑120	↓83				↑120				↓75	↓83
ALBU		↓97					↓97					↓97	↑103	↓94	↓93	
GLOB	↑106	↓95					↓95					↓90	↓86	↓95		↑107
CL			↑103					↑101	↑101		↑102		↓99	↑102	↓98	
Na		↑101	↑103			↑101	↓99					↓97		↑103		
K				↑106						↑106	↑112			↑106		↑110
Ca		↓97	↓97		↑103		↓96	↓95				↓96	↓95	↓96		
P								↓91	↓89		↑112		↓90			
PCHE	↓87	↓84	↓93	↓81	↓72	↓72	↓66	↓69	↓52	↓42	↓58	↓51	↓54	↓54	↓36	↓31
RCHE	↓90	↓93		↓84		↓69	↓67	↓72	↓64	↓84	↓50	↓50	↓47	↓47	↓42	↓62
BCHE	-	-	-	-	↓87	-	-	-	-	↓61	-	-	-	-	-	↓24

#52 週は：衛生群、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

*：GGTP は実測値を記載(対照群の値：14 週 1 IU/L、53 週 2 IU/L、79、105 週 4 IU/L)

**：TBIL は実測値を記載(対照群の値：14、27 週 0.0mg/dL、53、79 週 0.1mg/dL、105 週 0.2mg/dL)

↑ ↓：P<0.05 (ANOVA+Duncan 多重範囲検定)

表 3-2 血液生化学的検査 - 雌 - (有意差の認められた項目)

投与量	5ppm					20ppm					100ppm					
	14	27	53	79	105	14	27	53	79	105	14	27	52#	53	79	105
ALAT													↑152		↑117	
ALP	↓88					↓88					↓92			↑129	↑151	
LDH		↓30			↓66	↑173					↑234	↑159				
GGTP*			↑6		↓0					↓2	↑4					
CPK		↓49	↑160			↑138					↑163	↑153				
GLUC						↓92		↓94			↓86	↓90		↓94	↓93	
TBIL**		↑0.0				↑0.2	↑0.1	↓0.0	↓0.0		↑0.1	↑0.1	↑0.1		↓0.0	↓0.0
TRIG				↑127		↓85				↑145	↑162				↓49	↓53
PROT	↓97					↓97	↓97				↓93	↓90	↓91	↓94	↓96	
BUN	↓94					↓94	↓88				↓94		↑113			
CREA								↓71						↓71		
URIC	↓86	↓75	↓78		↓17		↓88	↓89								
ALBU	↓94					↓97					↓94	↓91	↓95	↓89	↓91	
GLOB							↓95				↓88	↓90	↓86	↓95		
CL		↓99	↑101	↓98		↓99	↓98				↑102	↓99	↓99	↑101	↓97	
Na			↑101	↓99	↓97		↓96	↓99	↓99	↓97		↓98	↓98			↓99
K											↑109				↑108	↑119
Ca				↑103				↓97				↓95	↓93	↓97		↑103
P					↑112						↑121		↑110			↑119
PCHE	↓59	↓62	↓65	↓63	↓69	↓32	↓32	↓34	↓34	↓33	↓21	↓21	↓20	↓21	↓21	↓22
RCHE	↓88	↓92	↓91	↓81	↓93	↓65	↓66	↓65	↓60	↓72	↓55	↓52	↓47	↓47	↓45	↓59
BCHE	-	-	-	-	↓86	-	-	-	-	↓57	-	-	-	-	-	↓22

#52週は；衛生群

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

*；GGTPは実測値を記載(対照群の値；14週2 IU/L, 53週4 IU/L, 105週3 IU/L)

**；TBILは実測値を記載(対照群の値；14、27、52週0.0mg/dL, 53週0.1mg/dL, 79、105週0.2mg/dL)

↓；P<0.05(ANOVA+Duncan 多重範囲検定)。

7-3. 尿検査

外観(色、透明度)、潜血、ビリルビン、糖、ケトン体、pH、蛋白、沈渣、比重、ウロビリノーゲンを測定した。

いずれの項目についても投与に起因する影響を示さなかった。

尿沈渣は雌雄とも異常を示さなかった。

8. 臓器重量 (表 4)

試験最終屠殺例について、剖検時に体重、脳、心、肝、肺、脾、腎、副腎、精巣及び卵巣の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

衛生群(1年間投与)では、100ppmにおいて、対照群に比べて低体重であることに起因して、いくつかの臓器に有意差が認められた。

2年間においても100ppmでは、低体重を示したことによって、いくつかの臓器に

Confidential

有意差がみられたが、いずれも低体重に起因にした影響であり、直接的な検体の影響とは考えられなかった。また 20ppm 雄群において、脳実重量のわずかな増加、肺実重量の減少がみられたが、いずれも背景データ範囲内にあり、対体重比で統計学的な有意差は認められず、また病理組織学的検査においても脳、肺に関連した所見が認められなかったことから、投与との関連性は偶発的な変化と考えられた。

表 4 臓器重量-主群 (有意差の認められた項目)

	雄				雌			
	2年			1年	2年			1年
	5	20	100	100	5	20	100	100
最終体重			↓93	↓94			↓88	↓95
脳/実重量		↑102	↑102					
脳/対体重比			↑110	↑108			↑116	↑106
心/対体重比				↑104				
肝/実重量			↓89	↓94			↓92	↓93
肺/実重量		↓85	↓82					↓94
肺/対体重比			↑109	↑105			↑111	
腎/実重量				↓95			↓95	
腎/対体重比							↑108	↑104
副腎/対体重比							↑114	
脾/実重量				↓92				↓92
精巣/実重量				↓95				

↑ ↓ : P<0.05 (ANOVA+Dunnett's test (2年), Mann/Whitney U-test (1年))

9. 剖検

衛生群については1年後に、主群については2年後に全生存例について剖検した。また途中死亡例については、発見時に剖検した。

主群、衛生群ともに、20、100ppmの雌雄で剖検時、湿って着色した部位や毛羽立った部位が被毛にみられた。また下垂体に組織塊の頻度の増加が最終計画殺動物の投与群の雌においてみられたが、用量相関性は認められず、いずれの投与群においても対照群に比べ統計学的有意差は認められなかったため、投与との関連性はないものと考えられた。

他の肉眼所見はすべて各群に均一に分布していた。

10. 病理組織学的検査

主群、衛生群については投与期間終了時に、二酸化炭素によって屠殺し、下記の表に示す臓器及び組織を全体または部分的に採取し、10%緩衝ホルマリンで固定した。

副腎、大動脈、大腿骨、肋骨、肋軟骨、胸骨、骨髓、頭蓋骨、脳(大脳-中脳、小

Confidential

脳、橋/延髄)、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、精巣上体、食道、眼、ハーダー氏腺、心臓、膝関節、腎臓、喉頭、肝臓、肺、頸部リンパ節、腸間膜リンパ節、乳腺、筋肉。視神経、坐骨神経、卵巣、膵臓、下垂体、前立腺、唾液腺、精のう、皮膚、脊髄(頸部、胸部、腰部)、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、上皮小体、気管、膀胱、子宮、個体識別部位(入れ墨尾)、異常部位

個体識別部位を除き、スライドを作製し、ヘマトキシリン染色を施した。また雌雄各群5匹(主群40匹、衛生群8匹)を無作為に抽出し、それらのスライドと、また全ての腫瘍性病変、全ての標的と考えられた組織および臓器(肺、胃、精巣上体、眼、視神経、涙鼻管、尾、足、海馬領域*)について外部によるピアレビューを行った。

*以前に海馬領域に形態変化が認められたとの報告があったため、今回ピアレビューの項目に加えた。その結果、海馬領域に形態学的な変化は何ら認められなかった。

10-1. 非腫瘍性病変

検体投与に関連したと考えられる所見を表5に示した。

衛生群(1年計画屠殺)

100ppmにおいて以下の所見の頻度の増加がみられた。精巣上体の空胞変性、涙鼻管の空胞変性(雌雄)、後肢及び尾の皮膚の病変(慢性炎症、角化亢進等)(雌雄)、角膜血管新生(雌)がみられ、これらの所見は2年間計画屠殺動物でも認められたため、検体の影響と考えられた。

主群(2年計画屠殺)

検体に関連したと考えられる所見が、眼、視神経、肺、涙鼻管、胃、精巣上体、尾や足の皮膚に認められた。

眼では100ppmで雌雄共に角膜で血管新生を示す例の増加がみられた。網膜の萎縮の頻度の増加が100ppmの雌で認められ、40例中39例が両側での変化を示し、加えて雌20ppmの1例両側での変化が認められたため、これらは検体の影響と考えられた。雄および雌の上記1例を除く20ppm以下で認められた網膜萎縮は、片側の眼のみで認められた変化であるため、眼窩静脈叢からの血液採取に伴う二次的なものと考えられ、検体の直接的な変化とは考えられなかった。角膜の血管新生の頻度の増加が100ppmの雌雄でみられた。視神経の萎縮も100ppm群の雌雄で統計学的に有意に増加した。この変化は雄では片側のみであり、雌では15例中10例が片側のみであった。この片側でみられた変化は、上記に示した同様、眼窩静脈叢からの血液採取に伴う二次的なものと考えられ、検体の直接的な変化とは考えられなかった。呼吸器系への作用として、涙鼻管の空胞変性の頻度の増加が100ppm群の雌雄および20ppm群の雌で認められた。また肉芽腫性肺炎の頻度の増

Confidential

加が 100ppm 群の雌雄および 20ppm 群の雄で認められた。これらの呼吸器系での変化は、飼育環境下における異物の存在に加え、二次的な要因としてコリンエステラーゼ阻害による鼻汁分泌物の亢進も関連しているものと考えられた。胃では筋層または漿膜で鉍質沈着の増加が 100ppm の雌雄で認められた。精巣上体では、100ppm 群で体部において細胞質でび漫性の空胞の増加が認められた。この変化はび漫性に認められ、通常加齢性病変として認められる大きな空胞とともに、微細な空胞も認められた。更に、頭部の上皮においても、100ppm 群の雄で微細な空胞を示す動物数の増加がみられた。尾は足の皮膚で扁平上皮の肥厚を特徴とする慢性活動性皮膚炎の頻度の増加が 100ppm 群の雌雄で認められた。この変化は、コリンエステラーゼ阻害による付属腺からの分泌亢進に伴い、動物がなめたり、毛づくろいを頻繁に行うことによって生じた変化と考えられた。

10-2. 腫瘍性病変

腫瘍の種類、発現率、良悪、部位について分類し、表 6 に示した。

全ての腫瘍性病変の腫瘍の種類、発現率、臓器分布は投与群と対照群のラットの間で有意な差を示さないかあるいは偶発的な変化と考えられた。また用量群別及び雌雄別における良性及び悪性腫瘍を担う動物の数についても、投与群と対照群との間に差は認められなかった。従って本検体には発がん性は認められなかった。

以上、本剤のラットに対する 2 年間飼料混入投与による反復経口毒性試験における本剤の影響として、100ppm の雌雄で一般症状の悪化がみられ、体重増加抑制も認められた。また眼科学的検査において、100ppm 雌雄で角膜変性を示す例の増加がみられた。さらに 100ppm の雌では網膜変性を示す頻度の増加がみられ、網膜電位図測定では 20ppm 以上の雌、で異常がみられた。20ppm 以上の雌雄で血球および脳のコリンエステラーゼ活性の低下が認められた。

検体投与に起因したと考えられる腫瘍性病変も認められなかった。

従って、本試験条件下における MPP の雌雄ラットに対する無毒性量 (NOEL) は、飼料中濃度が雌雄ともに 5ppm (雄 ; 0.2mg/kg 体重/日, 雌 ; 0.3mg/kg 体重/日) であった。

表 5. 主な非腫瘍性病変

	性別	雄				雌			
		0	5	20	100	0	5	20	100
	用量 (ppm)								
	所見/検査数	20	-	-	20	20	-	-	20
中間層殺動物・一年間	眼	20	-	-	20	20	-	-	20
	角膜血管新生	0	-	-	0	0	-	-	4
	視神経	19	-	-	20	20	-	-	19
	片側萎縮	1	-	-	2	0	-	-	2
	両側萎縮	0	-	-	0	0	-	-	0
	涙鼻管	20	-	-	20	20	-	-	20
	空胞変性	0	-	-	19	0	-	-	20
	肺	20	-	-	20	20	-	-	20
	肉芽腫性肺炎	0	-	-	1	0	-	-	1
	胃	20	-	-	20	20	-	-	20
	鉍質沈着	6	-	-	2	0	-	-	0
	精巣上体	20	-	-	20	/	/	/	/
	空胞変性	0	-	-	20	/	/	/	/
	皮膚 四肢	0	-	-	1	0	-	-	1
	角化症	0	-	-	0	0	-	-	1
	慢性炎症	0	-	-	1	0	-	-	0
皮膚 尾	0	-	-	10	0	-	-	2	
角化症	0	-	-	7	0	-	-	2	
慢性炎症	0	-	-	1	0	-	-	0	
最終計画層殺動物	眼	50	50	50	50	50	50	50	50
	角膜血管新生	4	2	4	13*	4	3	7	29*
	網膜萎縮	6	6	5	7	5	3	5	40*
	視神経	46	48	49	46	47	48	47	46
	片側萎縮	3	3	6	11	6	6	3	10
	両側萎縮	0	0	0	0	0	0	0	5**
	合計	3	3	6	11**	6	6	3	15*
	涙鼻管	50	50	50	50	50	50	50	50
	空胞変性	3	2	5	37*	3	7	26*	44*
	肺	50	50	50	50	50	50	50	50
	肉芽腫性肺炎	8	14	16*	22*	2	0	3	18*
	胃(筋層または漿膜)	50	50	50	50	50	50	50	50
	鉍質沈着	1	2	5	32*	2	2	1	27*
	精巣上体	50	50	50	50	/	/	/	/
	空胞変性	41	47	41	48	/	/	/	/
	体部; 空胞(微細)変性	0	0	0	35*	/	/	/	/
頭部; 空胞(微細)変性	0	0	4	43*	/	/	/	/	
足	50	50	50	50	50	50	50	50	
慢性活動性皮膚炎	5	8	9	26*	0	0	1	8*	
尾	50	50	50	50	50	50	50	50	
慢性活動性皮膚炎	14	16	22	43*	3	4	4	34*	

*: P<0.05(カイ二乗検定および Fisher 検定(片側)) *: 片側に限られていたため、統計学的に有意な増加がみられたが、血液採取に起因した変化と考えられ検体の影響とは考えられなかった。

表 6-1. 腫瘍性病変

性別	用量 (ppm)	雄				雌			
		0	5	20	100	0	5	20	100
中 間 屠 殺 動 物 ・ 一 年 間	下垂体	20	-	-	20	20	-	-	20
	腺腫 b	0	-	-	1	3	-	-	2
	副腎	20			20	20	-	-	20
	褐色細胞腫 b	1			0	0			0
	膵臓	20			20	50	50	50	50
	腺腫 b	0			1	0	3	2	0
	子宮	/	/	/	/	20	-	-	20
	子宮内膜間質ポリープ b	/	/	/	/	3	-	-	1
	精巣	20	-	-	20	/	/	/	/
	間質細胞腫 b	0			2	/	/	/	/
	皮膚(耳)	0	-	-	1	0	-	-	1
	線維腫 b	0	-	-	1	0	-	-	0
	線維肉腫 m	0	0	0	0	0	-	-	1

(b); 良性, (m); 悪性

Fisher 検定(片側)を実施

表 6-2. 腫瘍性病変

性別	用量 (ppm)	雄				雌			
		0	5	20	100	0	5	20	100
脳		21	21	25	19	15	14	17	21
星状膠細胞腫	m	0	0	0	0	2	0	0	0
下垂体		21	21	25	19	15	14	17	21
腺腫	b	7	6	11	8	4	11	8	6
腺癌	m	0	1	0	0	0	1	1	0
気管		21	21	25	19	15	14	17	21
線維肉腫	m	0	0	0	0	0	1	0	0
甲状腺		21	21	25	19	15	14	17	21
のう胞腺腫	b	0	0	1	1	0	0	0	0
C-細胞腺腫	b	6	0	4	0	1	0	1	1
ろ胞細胞腺腫	b	1	0	0	0	0	0	0	0
ろ胞細胞癌	m	0	0	1	0	0	0	0	0
線維肉腫	m	0	0	0	0	0	1	0	0
上皮小体		21	20	24	18	15	14	16	21
腺腫	b	0	0	0	0	0	0	1	0
喉頭		21	21	25	19	15	14	17	21
線維肉腫	m	0	0	0	0	0	1	0	0
唾液腺		21	21	25	19	15	14	17	21
線維肉腫	m	0	0	0	0	0	1	0	0
心臓		21	21	25	19	15	14	17	21
肉腫	m	0	1	0	0	0	0	0	0
肺		21	21	25	19	15	14	17	21
腺腫	b	0	1	0	0	0	0	0	0
細気管支・肺胞腺腫	b	1	0	0	0	0	0	1	0
細気管支・肺胞腺癌	m	0	0	0	0	0	0	0	1
肝臓		21	21	25	19	15	14	17	21
肝細胞腺腫	b	1	1	0	2	0	0	0	0
腎臓		21	21	25	19	15	14	17	21
癌	m	1	0	0	0	0	0	0	0
副腎		21	21	24	19	15	14	17	21
褐色細胞腫	b	2	1	3	1	0	1	0	1
悪性褐色細胞腫	m	0	0	0	0	1	0	0	0
膵臓		21	21	25	19	15	14	17	21
腺腫	b	0	4	1	0	0	0	0	0
癌	m	0	0	1	0	0	0	0	0
脾臓		21	21	25	19	15	14	17	21
線維肉腫	m	1	1	0	0	0	0	0	0
血管肉腫	m	0	0	0	0	1	0	0	0
膀胱		21	21	25	19	15	14	17	21
乳頭腫	b	0	0	1	0	0	0	0	0

b=良性, m=悪性,

表 6-3. 腫瘍性病変

性別	用量 (ppm)	雄				雌			
		0	5	20	100	0	5	20	100
小腸		21	21	25	19	15	14	17	21
腺癌	m	0	0	0	0	0	0	1	0
癌	m	0	0	0	0	0	0	1	0
リンパ節, 頸部		21	21	25	19	15	14	17	21
線維肉腫	m	0	0	0	0	0	1	0	0
乳腺		21	21	24	19	15	14	17	20
腺腫	b	0	1	0	0	1	2	0	0
線維腺腫	b	0	0	1	0	0	1	1	0
脂肪腫	b	0	1	0	0	0	0	0	0
のう胞腺腫	b	0	0	0	0	0	1	1	0
粘液腫	b	0	1	0	0	0	0	0	0
腺癌	m	0	0	1	0	0	0	0	0
子宮頸部		/	/	/	/	15	14	17	21
ポリープ	b	/	/	/	/	1	0	0	0
子宮内膜間質ポリープ	b	/	/	/	/	0	0	1	0
線維肉腫	m	/	/	/	/	0	1	0	0
子宮		/	/	/	/	15	14	17	21
子宮内膜間質ポリープ	b	/	/	/	/	6	2	4	6
途 卵巣		/	/	/	/	15	14	17	21
中 良性卵胞膜腫	b	/	/	/	/	0	1	0	0
死 悪性卵胞膜腫	m	/	/	/	/	0	0	0	1
亡 精巣		21	21	25	19	/	/	/	/
動物 血管腫	b	0	1	0	0	/	/	/	/
間質細胞腫	b	18	18	21	16	/	/	/	/
動脈		21	21	25	19	15	14	17	21
肉腫	m	1	0	0	0	0	0	0	0
頭蓋骨		21	21	25	19	15	14	17	21
線維腫	b	0	0	0	0	0	0	1	0
腺癌	m	0	0	1	0	0	0	0	0
扁平上皮癌	m	0	1	1	0	0	0	1	0
線維肉腫	m	0	0	0	0	0	1	0	0
脊髓		21	21	25	19	15	14	17	21
星状膠細胞腫	m	0	0	0	0	0	0	1	0
大腿骨		21	21	25	19	15	14	17	19
骨肉腫	m	0	1	0	0	0	0	0	0
筋肉(大腿筋以外)		4	0	2	0	0	1	0	0
線維腫	b	0	0	1	0	0	0	0	0
肉腫	m	1	0	0	0	0	0	0	0
線維肉腫	m	0	0	0	0	0	1	0	0
骨原性肉腫	m	0	0	1	0	0	0	0	0
皮膚(耳)		0	1	0	1	0	0	0	0
腺癌	m	0	1	0	0	0	0	0	0

b=良性, m=悪性

表 6-4. 腫瘍性病変

性別	用量(ppm)	雄				雌				
		0	5	20	100	0	5	20	100	
途中死亡動物	皮膚(その他)	5	3	2	4	1	4	8	5	
	乳頭腫	b	1	0	1	0	0	0	0	
	扁平上皮癌	m	0	0	1	0	0	0	0	
	耳		0	0	1	0	0	0	0	
	腺癌	m	0	0	1	0	0	0	0	
	陰核腺		/	/	/	/	0	1	1	0
	のう胞腺腫		/	/	/	/	1	0	1	0
	包皮腺		1	1	1	0	/	/	/	/
	腺腫	b	0	1	0	0	/	/	/	/
	腺癌	m	0	0	0	0	/	/	/	/
	陰茎包皮		0	0	0	2	/	/	/	/
	腺腫	b	0	0	0	1	/	/	/	/
	全身性腫瘍		21	21	25	19	15	14	17	21
	中皮腫	m	3	0	0	0	0	0	0	0
	悪性リンパ腫	m	2	0	2	0	2	2	2	0
	単核球性白血病	m	10	10	11	6	5	2	4	3
	組織球肉腫	m	1	0	0	0	0	0	0	0
	悪性線維性組織球腫	m	0	0	0	0	1	0	0	0
	最終屠殺動物	脳		29	29	25	31	35	36	33
脳室上衣腫		b	0	1	0	0	0	0	0	0
下垂体			29	28	25	31	35	36	33	29
腺腫		b	11	11	11	17	19	25	20	20
癌		m	0	0	1	0	0	0	0	0
甲状腺			29	29	25	31	35	36	33	29
のう胞腺腫		b	0	0	1	0	0	0	0	0
C-細胞腺腫		b	2	4	5	6	1	2	2	1
ろ胞細胞腺腫		b	0	1	0	1	0	1	1	0
C-細胞癌		m	1	0	0	0	0	1	0	0
上皮小体			29	29	25	31	34	33	33	28
腺腫		b	2	0	0	1	0	0	1	0
心臓			29	29	25	31	35	36	33	29
線維腫		b	0	0	0	1	0	0	0	0
神経鞘腫		b	0	0	0	0	0	0	0	1
神経線維腫		m	0	0	0	1	0	0	0	0
肝臓			29	29	25	31	35	36	33	29
肝細胞腺腫		b	5	2	0	1	0	0	0	0
肝細胞癌		m	1	2	1	0	0	0	0	0
腎臓		29	29	25	31	35	36	33	29	
移行上皮癌	m	0	1	0	0	0	0	0	0	

b=良性, m=悪性

表 6-5. 腫瘍性病変

性別	用量 (ppm)	雄				雌			
		0	5	20	100	0	5	20	100
副腎		29	29	25	31	35	36	33	29
腺腫/皮質	b	0	0	0	1	0	0	0	0
褐色細胞腫	b	2	5	3	4	4	1	0	0
悪性褐色細胞腫	m	1	0	1	0	0	0	0	0
脾臓		29	29	25	31	35	36	33	29
腺腫	b	5	2	2	6	0	3	2	0
癌	m	0	0	1	0	0	0	0	0
肉腫	m	1	0	0	0	0	0	0	0
脾臓		29	29	25	31	35	36	33	29
線維肉腫	m	2	0	0	0	0	0	0	0
膀胱		29	29	25	31	35	36	33	28
乳頭腫	b	0	1	0	0	0	0	0	0
胃		29	29	25	31	35	36	33	29
血管腫	b	0	0	0	0	0	0	0	1
小腸		29	29	25	31	35	36	33	29
腺癌	m	0	0	0	0	1	0	0	0
線維肉腫	m	0	1	0	0	0	0	0	0
直腸		28	29	25	30	32	35	32	28
線維肉腫	m	0	0	0	0	0	1	0	0
リンパ節, 腸間膜		29	29	25	31	35	36	33	29
血管腫	b	0	0	0	0	0	1	0	0
乳腺		29	29	25	31	35	36	33	29
ポリープ	b	0	1	0	0	0	0	0	0
腺腫	b	0	2	0	0	3	1	4	0
線維腺腫	b	1	3	1	0	4	5	2	0
線維腫	b	0	0	1	0	0	1	0	0
のう胞腺腫	b	0	0	0	0	1	0	0	1
腺癌	m	0	0	0	0	0	0	1	0
子宮頸部		/	/	/	/	35	36	33	29
線維腫	b	/	/	/	/	0	0	1	0
子宮		/	/	/	/	35	36	33	29
子宮内膜間質ポリープ	b	/	/	/	/	13	16	8	7
腺癌	m	/	/	/	/	0	0	0	1
血管肉腫	m	/	/	/	/	0	1	0	0
子宮内膜間質肉腫	m	/	/	/	/	2	1	1	0
卵巣		/	/	/	/	35	36	33	29
顆粒膜細胞腫	b	/	/	/	/	1	0	0	0
精巣		29	29	25	31	/	/	/	/
間質細胞腫	b	28	29	25	30	/	/	/	/

b=良性, m=悪性

表 6-6. 腫瘍性病変

性別	用量 (ppm)	雄				雌			
		0	5	20	100	0	5	20	100
動脈		29	29	24	31	35	36	33	29
肉腫	m	1	0	0	0	0	0	0	0
頭蓋骨		29	29	25	31	35	36	33	29
線維腫	b	0	0	0	0	0	1	0	0
角化上皮腫	b	0	1	0	0	0	0	0	0
歯牙腫	b	0	0	0	0	1	0	0	0
乳頭腫	b	0	0	0	0	1	0	0	0
骨肉腫	m	0	0	0	0	0	0	0	1
骨髓		29	29	25	31	35	36	33	29
骨肉腫	m	1	0	0	0	0	0	1	0
骨髓		29	29	25	31	35	36	33	29
骨肉腫	m	0	0	0	0	0	0	0	1
皮膚(後肢)		4	6	4	14	0	0	0	0
線維腫	b	0	1	1	0	0	0	0	0
皮膚(耳)		1	1	0	1	0	1	0	0
腺腫	b	1	0	0	0	0	0	0	0
乳頭腫	b	0	1	0	0	0	0	0	0
線維肉腫	m	0	0	0	1	0	0	0	0
皮膚(その他)		5	2	2	8	4	7	5	7
角化上皮腫	b	0	0	0	1	0	0	0	0
線維腫		1	0	0	2	0	0	0	0
乳頭腫	b	0	0	0	2	0	0	0	0
基底細胞癌	m	0	1	0	0	0	0	0	0
陰核腺		/	/	/	/	1	0	2	0
腺腫	b	/	/	/	/	0	0	1	0
のう胞腺腫	b	/	/	/	/	0	0	1	0
包皮腺		0	2	2	2	/	/	/	/
腺腫	b	0	0	0	1	/	/	/	/
腺癌	m	0	0	2	1	/	/	/	/
全身性腫瘍		29	29	25	31	35	36	33	29
中皮腫	m	0	1	0	2	0	0	0	0
悪性リンパ腫	m	0	1	0	1	0	0	0	0
単核球性白血病	m	12	8	3	4	6	9	5	0
組織球肉腫	m	0	0	0	0	0	0	0	3
悪性線維性組織球腫	m	0	0	0	0	1	0	0	0

b=良性, m=悪性

表 6-7. 腫瘍性病変

性別	用量(ppm)	雄				雌			
		0	5	20	100	0	5	20	100
脳		50	50	50	50	50	50	50	50
脳室上衣腫	b	0	1	0	0	0	0	0	0
星状膠細胞腫	m	0	0	0	0	2	0	0	0
下垂体		50	49	50	50	50	50	50	50
腺腫	b	18	17	22	25	23	36	28	26
腺癌	m	0	1	0	0	0	1	1	0
癌	m	0	0	1	0	0	0	0	0
気管		50	50	50	50	50	50	50	50
線維肉腫	m	0	0	0	0	0	1	0	0
甲状腺		50	50	50	50	50	50	50	50
のう胞腺腫	b	0	0	2	1	0	0	0	0
C-細胞腺腫	b	8	4	9	6	2	2	3	2
ろ胞細胞腺腫	b	1	1	0	1	0	1	1	0
C-細胞癌	m	1	0	0	0	0	1	0	0
ろ胞細胞癌	m	0	0	1	0	0	0	0	0
線維肉腫	m	0	0	0	0	0	1	0	0
上皮小体		50	49	49	49	49	47	49	49
腺腫	b	2	0	0	1	0	0	2	0
喉頭		50	50	50	50	50	50	50	50
線維肉腫	m	0	0	0	0	0	1	0	0
唾液腺		50	50	50	50	50	50	50	50
線維肉腫	m	0	0	0	0	0	1	0	0
心臓		50	50	50	50	50	50	50	50
線維腫	b	0	0	0	1	0	0	0	0
神経鞘腫	b	0	0	0	0	0	0	0	1
神経線維腫	m	0	0	0	1	0	0	0	0
肉腫	m	0	1	0	0	0	0	0	0
肺		50	50	50	50	50	50	50	50
腺腫	b	0	1	0	0	0	0	0	0
細気管支・肺胞腺腫	b	1	0	0	0	0	0	1	0
細気管支・肺胞腺癌	m	0	0	0	0	0	0	0	1
肝臓		50	50	50	50	50	50	50	50
肝細胞腺腫	b	6	3	0	3	0	0	0	0
肝細胞癌	m	1	2	1	0	0	0	0	0
腎臓		50	50	50	50	50	50	50	50
癌	m	1	0	0	0	0	0	0	0
移行上皮癌	m	0	1	0	0	0	0	0	0

b=良性, m=悪性, Fisher 検定(片側)を実施

表 6-8. 腫瘍性病変

性別	用量 (ppm)	雄				雌			
		0	5	20	100	0	5	20	100
副腎		50	50	49	50	50	50	50	50
腺腫/皮質	b	0	0	0	1	0	0	0	0
褐色細胞腫	b	4	6	6	5	4	2	0	1
悪性褐色細胞腫	m	1	0	1	0	1	0	0	0
脾臓		50	50	50	50	50	50	50	50
腺腫	b	5	6	3	6	0	3	2	0
癌	m	0	0	2	0	0	0	0	0
肉腫	m	1	0	0	0	0	0	0	0
脾臓		50	50	50	50	50	50	50	50
線維肉腫	m	3	0	0	0	1	0	0	0
血管肉腫	m	0	0	0	0	1	0	0	0
膀胱		50	50	50	50	50	50	50	49
乳頭腫	b	0	1	1	0	0	0	0	0
胃		50	50	50	50	50	50	50	50
血管腫	b	0	0	0	0	0	0	0	1
小腸		50	50	50	50	50	50	50	50
腺癌	m	0	0	0	0	1	0	1	0
癌	m	0	0	0	0	0	0	1	0
線維肉腫	m	0	1	0	0	0	0	0	0
直腸		49	49	50	49	47	48	49	49
線維肉腫	m	0	0	0	0	0	1	0	0
リンパ節, 頸部		50	50	50	50	50	50	50	50
線維肉腫	m	0	0	0	0	0	1	0	0
リンパ節, 腸間膜		50	50	50	50	50	50	50	50
血管腫	b	0	0	0	0	0	1	0	0
乳腺		50	50	49	50	50	50	50	49
ポリープ	b	0	1	0	0	0	0	0	0
腺腫	b	0	3	0	0	4	3	4	0
線維腺腫	b	1	3	2	0	4	6	3	0
線維腫	b	0	0	3	1	0	1	0	0
脂肪腫	b	0	1	0	0	0	0	0	0
のう胞腺腫	b	0	0	0	0	1	1	1	1
粘液腫	b	0	1	0	0	0	0	0	0
腺癌	m	0	0	1	0	0	0	1	0
子宮頸部		/	/	/	/	50	50	50	50
線維腫	b	/	/	/	/	0	0	1	0
ポリープ	b	/	/	/	/	1	0	0	0
子宮内膜間質ポリープ	b	/	/	/	/	0	0	1	0
線維肉腫	m	/	/	/	/	0	1	0	0

b=良性, m=悪性, Fisher 検定(片側)を実施

表 6-9. 腫瘍性病変

性別	用量(ppm)	雄				雌			
		0	5	20	100	0	5	20	100
子宮		/	/	/	/	50	50	50	50
子宮内膜間質ポリープ	b	/	/	/	/	19	18	12	13
腺癌	m	/	/	/	/	0	0	0	1
血管肉腫	m	/	/	/	/	0	1	0	0
子宮内膜間質肉腫	m	/	/	/	/	2	1	1	0
卵巣		/	/	/	/	50	50	50	50
顆粒膜細胞腫	b	/	/	/	/	1	0	0	0
良性卵胞膜腫	b	/	/	/	/	0	1	0	0
悪性卵胞膜腫	m	/	/	/	/	0	0	0	1
精巣		50	50	50	50	/	/	/	/
血管腫	b	0	1	0	0	/	/	/	/
間質細胞腫	b	46	47	46	46	/	/	/	/
動脈		50	50	49	50	50	50	50	50
肉腫	m	2	0	0	0	0	0	0	0
頭蓋骨		50	50	50	50	50	50	50	50
線維腫	b	0	0	0	0	0	1	1	0
角化上皮腫	b	0	1	0	0	0	0	0	0
歯牙腫	b	0	0	0	0	1	0	0	0
乳頭腫	b	0	0	0	0	1	0	0	0
腺癌	m	0	0	1	0	0	0	0	0
扁平上皮癌	m	0	1	1	1	0	0	1	0
線維肉腫	m	0	0	0	0	0	1	0	0
骨肉腫	m	0	0	0	0	0	0	0	1
腎髓		50	50	50	50	50	50	50	50
星状膠細胞腫	m	0	0	0	0	0	0	1	0
骨肉腫	m	1	0	0	0	0	0	1	0
骨髓		50	50	50	50	50	50	50	50
骨肉腫	m	0	0	0	0	0	0	0	1
大腿骨		50	50	50	50	50	50	50	48
骨肉腫	m	0	1	0	0	0	0	0	0
筋肉(大腿筋以外)		4	1	2	1	0	1	0	0
線維腫	b	0	0	1	0	0	0	0	0
肉腫	m	1	0	0	0	0	0	0	0
線維肉腫	m	0	0	0	0	0	1	0	0
骨原性肉腫	m	0	0	1	0	0	0	0	0
皮膚(後肢)		5	9	10	27	0	0	1	9
線維腫	b	0	1	1	0	0	0	0	0

b=良性, m=悪性, Fisher 検定(片側)を実施

表 6-10. 腫瘍性病変

性別	雄				雌				
	0	5	20	100	0	5	20	100	
用量 (ppm)									
皮膚(耳)	1	2	0	2	0	1	0	0	
腺腫	b	1	0	0	0	0	0	0	
乳頭腫	b	0	1	0	0	0	0	0	
腺癌	m	0	1	0	0	0	0	0	
線維肉腫	m	0	0	0	1	0	0	0	
皮膚(その他)	10	5	4	12	5	11	13	12	
角化上皮腫	b	0	0	0	1	0	0	0	
線維腫	b	1	0	0	2	0	0	0	
乳頭腫	b	1	0	1	2	0	0	0	
基底細胞癌	m	0	1	0	0	0	0	0	
扁平上皮癌	m	0	0	1	0	0	0	0	
耳	0	0	1	0	0	0	0	0	
全動物									
腺癌	m	0	0	1	0	0	0	0	
陰核腺	/	/	/	/	1	1	3	0	
腺腫	b	/	/	/	0	0	1	0	
のう胞腺腫	b	/	/	/	1	0	2	0	
包皮腺	1	3	3	2	/	/	/	/	
腺腫	b	0	1	0	1	/	/	/	
腺癌	m	0	0	2	1	/	/	/	
陰茎包皮	0	0	0	3	/	/	/	/	
腺腫	b	0	0	0	1	/	/	/	
全身性腫瘍	50	50	50	50	50	50	50	50	
中皮腫	m	3	1	0	2	0	0	0	
悪性リンパ腫	m	2	1	2	1	2	2	0	
単核球性白血病	m	22	18	14	10	11	11	9	
組織球肉腫	m	1	0	0	0	0	0	0	
悪性線維性組織球腫	m	0	0	0	0	2	0	0	
検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50	
腫瘍数	良性	95	101	95	107	65	78	65	46
	悪性	38	29	28	17	22	26	19	15
腫瘍総数	133	130	123	124	87	104	84	61	
担腫瘍動物数	良性のみ	19	24	23	34	27	28	24	23
	悪性のみ	2	0	1	0	7	2	4	3
担腫瘍動物総数	50	50	49	49	48	46	42	35	

b=良性, m=悪性, Fisher 検定(片側)を実施

MPP のイヌにおける 2 年間反復経口毒性試験

(毒性資料 No. 原体-17)

試験機関：

報告書作成年月日：

検体の純度：工業用原体

試験 動物：ビーグル犬 1 群雌雄各 4 匹 開始時 19～21 歳

投与 期間：24 ヶ月

投与 方法：検体を Wessalon S と混ぜ 50% プレミックスにして粉末飼料中に 0、3、10、30～60ppm* (以下 30ppm と記載) の濃度に混合し、1 群雌雄各 4 匹のイヌに 24 ヶ月間投与した。

*1 週から 64 週までは 30ppm、65 週目から 67 週までは 50ppm、68 週目から 104 週目までは 60ppm を投与。

検査項目および結果：

1. 外観および行動

投与期間中、毎日イヌの全身状態と行動を観察した。

その結果、64 週までは全ての群のイヌの全身状態、行動に異常は認められなかった。なお、最高用量群では投与濃度を増加した結果、軟便のみが認められた。

2. 体温および反射反応

体温と反射反応 (瞳孔反射、膝蓋反射、屈筋反射、伸筋反射) を投与開始前およびその後 3 ヶ月ごとに検査した。

その結果、検体投与に起因した変化は何ら認められなかった。

3. 死亡率

投与期間中全ての群に死亡例は認められなかった。

4. 摂餌量、飲水量および検体摂取量

投与期間中毎日、残餌量と飲水量を観察した。

投与期間中の各群のイヌにおいて、飼料を完全に摂取しない例がみられ、摂餌量に変動が多かったが、検体投与は摂餌量に影響しなかった。また、飲水量にも影響は見られなかった。

各群の投与期間中の平均摂餌量 (g/匹/日) および検体摂取量 (mg/kg/日) を下表に示す。

表：平均摂餌量および検体摂取量

用量群 (ppm)	平均摂餌量 (g/匹/日)		検体摂取量 (mg/kg/日)	
	雄	雌	雄	雌
0 (対照群)	342	347	0	0
3	345	342	0.09	0.10
10	342	347	0.31	0.33
30	347	312	1.23	1.25

*検体摂取量はmg/匹/日で算出された検体摂取総量を52週時の平均体重で除した値

5. 体重

動物の体重を投与開始後52週までは毎週、その後は2週ごとに測定した。

その結果、各投与群の体重に検体投与の影響は認められなかった。

6. 検眼、心電図検査

投与開始前および以降3ヶ月ごとに検眼および心電図検査を実施した。

その結果、眼および心電図所見になんらの異常は認められなかった。

7. 血液学的検査

投与開始前および以降3ヶ月ごとに頸静脈から採血し、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数、白血球数、網状赤血球数、血小板数、平均赤血球ヘモグロビン濃度、白血球分画比、プロトロンビン時間を測定した。

その結果、血液検査結果に投与による影響は認められなかった。

8. 生化学的検査

投与開始前および以降3ヶ月ごとに採血した頸静脈血の血漿を用い、血糖、尿素、クレアチニン、総たんぱく質、GOT、GPT、アルカリフォスファターゼ、ビリルビン、コレステロールを測定した。

その結果、いずれの検査項目にも検体投与の影響は認められなかった。

9. コリンエステラーゼ (ChE) 活性

血漿および血球 ChE 活性は頸静脈血をもちいて、投与開始前と開始後3、5、7、9、11、13、26、39、48、52、62、78、92 および104週に測定した。脳 ChE は剖検時に測定した。

その結果、血漿 ChE は10ppm以上の雌雄投与群で有意に低下した。また、血球 ChE は30ppmでは雌雄ともに有意に低下した。脳 ChE は雌雄共に30ppm群で低下した。尚、10ppmにおいて雄では血球 ChE に20%以上の低下が、また雌では脳 ChE に10%以上の低下がみられ、生物学的に意味のある低下と考えられた。

表：ChE 検査結果（対照群と比べ有意差の認められた項目）
（52 週）

用量 (ppm)	雄			雌		
	3	10	30	3	10	30
血漿 ChE			↓49			↓34
血球 ChE			↓59			↓79

（104 週）

用量 (ppm)	雄			雌		
	3	10	30	3	10	30
血漿 ChE		↓64	↓29		↓67	↓40
血球 ChE		↓71	↓21			↓39
脳 ChE			↓60		↓81	↓71

↑ ↓ : P<0.05, ↓ : P<0.01 (Bartlett の後に Dunnett、申請者により実施)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示したもの。

10. 尿検査

投与開始前および以降 3 ヶ月ごとに代謝ケージを用いて採尿し、アルブミン、糖、潜血、pH、尿量、比重、尿沈渣を調べた。

その結果、いずれの検査項目には検体投与の影響は認められなかった。

11. 剖検および臓器重量

投与終了時に全動物を屠殺し、肉眼的観察を実施した。また、脳、心、肺、肝、脾、腎、下垂体、甲状腺、副腎、精巣、前立腺、卵巣および脾の重量を測定した。

その結果、いずれの動物にも投与に起因すると考えられる肉眼的異常は認められなかった。また、臓器重量にも変化は認められなかった。

12. 病理組織学的検査

剖検後、全動物の心、肝、脾、腎、副腎、下垂体、甲状腺、精巣、精巣上部、前立腺、卵巣、子宮を病理組織学的に検索した。さらに、対照群および最高用量群では耳下腺、膵、胸腺、食道、胃、腸管(十二指腸、空腸、回腸、結腸)、腸間膜リンパ節、膀胱、胆嚢、脳、眼、視神経、坐骨神経、大動脈、骨格筋、骨髄も検査した。

その結果、いずれの臓器、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。

表：主な病理組織学的変化

組織/動物数・病変	雄 (ppm)				雌 (ppm)			
	0	3	10	30	0	3	10	30
肺	4	4	4	4	4	4	4	4
炎症性細胞浸潤	3	3	2	0	1	0	1	1
肺胞拡張	1	2	1	0	1	0	0	0
肝	4	4	4	4	4	4	4	4
炎症性細胞浸潤	0	1	0	0	0	0	0	0
腎	4	4	4	4	4	4	4	4
炎症性細胞浸潤	2	1	0	0	1	0	2	0
副腎	4	4	4	4	4	4	4	4
炎症性細胞浸潤	0	1	1	0	0	0	0	0
甲状腺	4	4	4	4	4	4	4	4
炎症性細胞浸潤	1	0	1	0	0	1	1	0
精巣	4	4	4	4	/	/	/	/
低形成	1	0	0	0	/	/	/	/
前立腺	4	4	4	4	/	/	/	/
炎症性細胞浸潤	1	1	0	1	/	/	/	/
卵巣	/	/	/	/	4	4	4	4
のう胞	/	/	/	/	0	1	1	0
子宮	/	/	/	/	4	4	4	4
のう胞	/	/	/	/	0	1	1	0
上皮増生	/	/	/	/	0	1	2	0
眼球	4	0	0	4	4	0	0	4
炎症性細胞浸潤	0	0	0	0	2	0	0	0

以上のように、検体をイヌに2年間にわたって投与した結果、血漿コリンエステラーゼ(ChE)は雌雄10ppm以上、血球ChEは雌が30ppm、雄が10ppm以上、さらに脳ChEは雌が10ppm以上、雄が30ppmで阻害された。

[申請者註]

1995年のJMPRの評価において、赤血球ChE(20%以上の阻害)および脳ChE(10%以上の阻害)の影響を指標として、対照群に比べ、赤血球ChEの阻害が20%以上みられた雄の10ppm以上、また脳ChEの阻害が10%以上の阻害がみられた雌の10ppmをもとに、無毒性量が3ppmと評価されており、申請者はこれを採用する。

従って、これらの結果から本試験における無毒性量は雌雄ともに3ppm(雄：0.09mg/kg/日、雌：0.10mg/kg/日)と判断した。

MPP のイヌにおける 1 年間反復経口投与毒性試験

(毒性資料 No. 原体-18)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：

検体の純度 : %
試験動物 : ビーグル犬、1 群雌雄各 4 匹
投与開始時 ; 9 ヶ月齢以下 平均体重 ; 雄 7.5kg 雌 6.5kg
投与期間 : 12 ヶ月
投与方法 :

検体を 0 (対照群)、2、10、50ppm となるように飼料と混和し、12 ヶ月間雌雄各 4 匹のイヌに投与した。飼料には飼料の重量の 1% に相当するコーンオイルを添加した。水は自由に摂取させた。検体を添加した飼料は、1 週間に 1 回調製した。雌雄ともに全群で同じ日から 1 日 1 回与えた。

検体を 0 (対照群)、50、400、4000ppm となるように飼料と混和し、12 ヶ月間雌雄各 4 匹のイヌに投与した。

試験項目及び結果：

1. 臨床症状

全動物の臨床症状及び生死を少なくとも1日2回(週末と休日は1回)観察した。
臨床症状などに関する詳細な身体検査は週に1回実施した
検体に起因すると考えられる所見は認められなかった。

2. 死亡率

全試験期間を通じて死亡例は認められなかった。

3. 体重

週1回体重を測定した。

平均体重変化は雌の全投与群ならびに雄の低および中用量群では、対照群と同程度であった。しかし、高用量群雄は、試験全体を通して対照群に比べて高い体重増加を示した。

図1. 体重(雄)

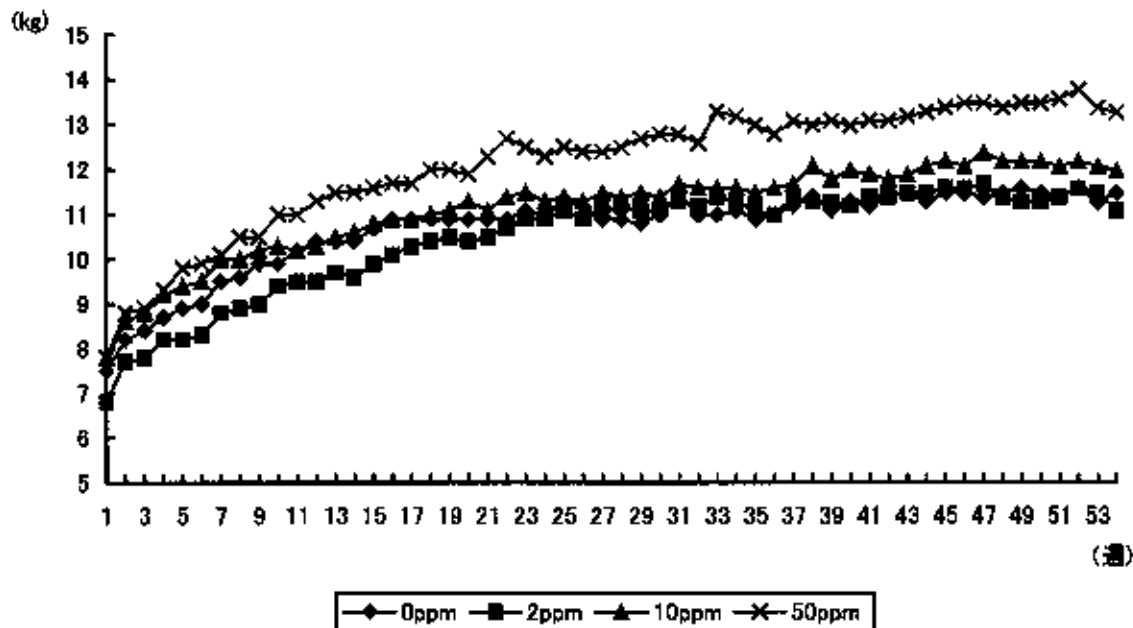
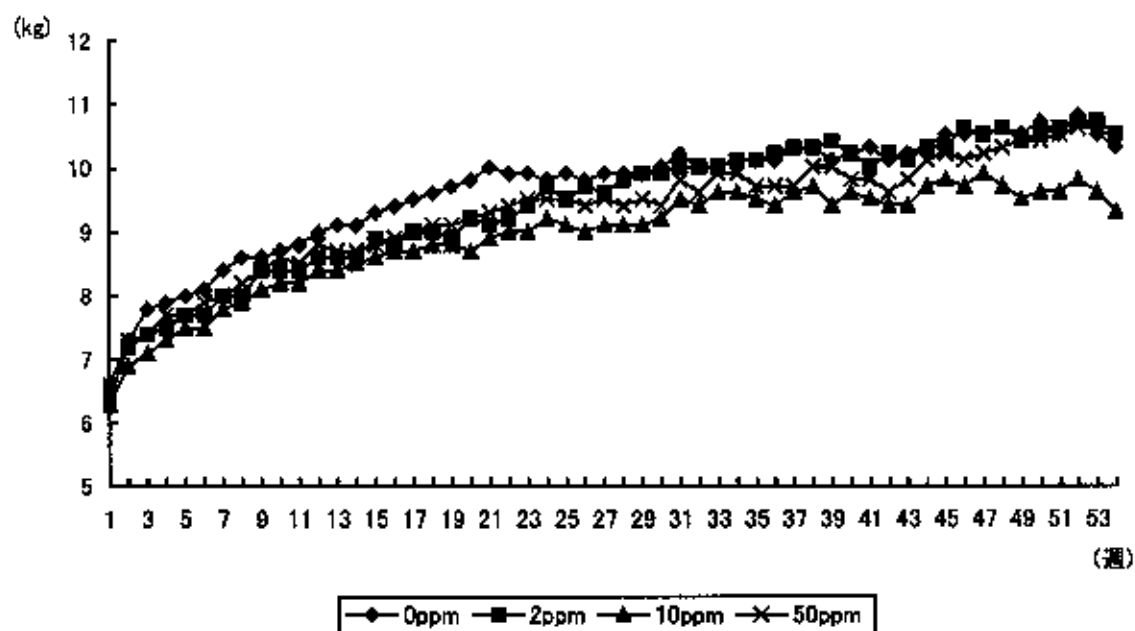


図 1. 体重(雌)



4. 摂餌量及び検体採取量 (表 1)

毎日、摂餌量を測定した。

投与期間中の雌雄ともに摂餌量に对照群と用量群間に差は認められなかった。

投与期間中の平均検体採取量 (mg/kg/日) は以下のとおりであった。

表 1 検体採取量 (mg/kg/日)

投与用量 (ppm)		2	10	50
検体採取量	雄	0.056	0.258	1.228
	雌	0.056	0.262	1.182

5. 眼科学的検査

投与開始前および屠殺前、全動物で眼科学的検査を行った。最初に瞳孔反射、結膜、角膜および虹彩を調べた後、散瞳薬 (Mydriacyl 1%) により瞳孔を散大させた。散瞳後、水晶体、硝子体液および網膜を検査した。検査の際には、両眼網膜の眼底カメラによる撮影も行った。

検体投与に関連していると考えられる所見は認められなかった。

6. 血液学的検査 (表 2)

試験開始前及び試験 3、6、9、12ヶ月目に、血液を静脈穿刺により採取した。

以下の項目の測定を行った。

白血球数, 赤血球数, ヘモグロビン量(Hb), ヘマトクリット値(Ht), 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(THRO), 白血球百分率, 赤血球形態

表 2 血液学的検査 (有意差の認められた項目)・雌・

用量	2ppm					10ppm					50ppm				
	直前*	3	6	9	12	直前	3	6	9	12	直前	3	6	9	12
MCV	↑107	↑106				↑105	↑103					↑104			
MCH	↑107					↑106									

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。

↑↓: $p \leq 0.05$, ▲▼: $p \leq 0.01$ (SAS: ANOVA+Duncan 多重比較)

*検査時期(月)

血液学的検査における統計学的に有意な変化(表 2)は、投与開始前における 2 および 10ppm 群雌での MCV および MCH の上昇、ならびに、3ヶ月目における全投与群雌での MCV の上昇のみであった。MCH については投与開始前であったこと、MCV については、有意差が認められたのは 3ヶ月時の一測定時にとどまり、その後の検査において有意差が認められず、また用量に関連した上昇は認められなかったため、これらの変化は本検体の影響ではないものと考えられた。

従って、血液学的検査項目において、本検体の影響と考えられる項目は認められなかったものと判断した。

7. 血液生化学的検査 (表 3)

試験開始前及び試験 3、6、9、12ヶ月目に、全動物を一晚絶食させ静脈穿刺により血液サンプルを採取した。

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(ALAT), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT), アルカリホスファターゼ, 乳酸脱水素酵素(LDH), γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(γ -GTP), クレアチンホスフォキナーゼ(CPK), 総ビリルビン, トリグリセリド, 総コレステロール, 総タンパク, アルブミン(Alub), グロブリン, グルコース, 尿素窒素(BUN), クレアチニン, リン, カリウム, ナトリウム(Na), カルシウム, クロリド(CL), 尿酸(URIC), 血漿コリンエステラーゼ(PChE), 赤血球コリンエステラーゼ(RChE), 脳コリンエステラーゼ(BChE)(終了時のみ)

表 3 血液学的検査（有意差の認められた項目）

用量	2ppm					10ppm					50ppm				
	直前	3	6	9	12	直前	3	6	9	12	直前	3	6	9	12
項目	雄														
LDH															↑334
γ-GTP															↑300
CPK				↑141											↓73
URIC															↑150
Na		↓99											↓98		
PChE							↓69	↓65	↓73	↓61		↓41	↓50	↓48	↓46
RChE		↑126	↑114	↑120	↑117					↓85		↓44	↓47	↓48	↓45
BChE															(70)
	雌														
LDH														↑191	
Alub							↓93								
Glu				↓85											
CL					↑105					↑103					
PChE			↓75				↓66	↓59	↓59	↓61		↓23	↓39	↓47	↓38
RChE												↓49	↓47	↓48	↓44
BChE															↓56

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。

↑↓: $p \leq 0.05$, ◆◆: $p \leq 0.01$ (SAS: ANOVA+Duncan 多重比較), (): 統計学的に有意差なし

●検査時期(月)

コリンエステラーゼ以外で統計学的に有意な差が認められた項目は、以下の理由から検体投与に関連した変化ではないものと考えられた。

- 1) 用量に関連した変化が認められなかったこと。
- 2) 経時的に関連した変化ではなかったこと。
- 3) 対照値との差がわずかであったこと。
- 4) 投与開始前の測定値における有意差であること。

申請者註) 試験終了時に 50ppm 群の雄で認められた LDH、γ-GTP の上昇は、背景データ範囲内 (LDH: 20.57-289.43 IU/L, γ-GTP: 0-36.66 IU/L) であることが確認されている。報告書では、50ppm の尿酸値についても背景データ範囲内にあるとされているが、そのデータについては報告書に記載されていなかったため、確認はできなかった。しかし、対照群 0.4mg/dL に対し、50ppm 群は 0.6mg/dL とその差はわずかであり、検体の影響とは考えられなかった。

コリンエステラーゼの血液生化学検査パラメータ (PChE、RChE、BChE) を分析すると、対照群と比較して統計学的にも生物学的にも有意な差が認められた。

血漿コリンエステラーゼ (PChE) は、10 および 50ppm の雌雄において、いずれの時点でも統計学のおよび生物学的 (>20% の阻害) に有意に低下した。

RChE 値は 50ppm 雌雄において全サンプリング時点で統計学のおよび生物学的 (>20%の阻害)に有意な低下を示した。10ppm 雄では試験終了時に、統計学的有意に、ただし生物学的には有意でない程度に対照を下回った。同群雌では影響は認められなかった。2ppm 雄では全サンプリング時点において RChE 値が統計学的に有意な上昇を示したが、生物学的に有意とは考えられなかった。

BChE 値については、50ppm 雌雄で生物学的に有意 (>10%の阻害)な低下が認められた。統計学的な有意差が認められたのは 50ppm 雌だけであった。

コリンエステラーゼに関する無影響量(NOEL)は 2ppm と評価された。

申請者注)コリンエステラーゼに関する無毒性量(NOEL)は、雌雄ともに 10ppm と考えられた。

8. 尿検査

試験開始前及び試験 3、6、9、12ヶ月目に、全ての動物について尿検査を行った。項目は以下のとおりであった。

外観(色および透明度)、比重、pH、糖、蛋白、潜血、ビリルビン、ケトン体、ウロビリノーゲン及び尿沈渣について尿検査を実施した。

尿検査の結果、いずれの項目にも検体投与に関連した変動は認められなかった。

9. 剖検

試験終了時に、全生存動物について剖検した。剖検では各動物の全身状態、開口部、外表、内臓および組織を体系的に肉眼で調べた。

検体の影響と考えられる剖検所見は認められなかった。

10. 臓器重量

剖検の際には、最終体重および以下の臓器重量を測定した。

副腎、脳幹全体を含む脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、卵巣、下垂体、脾臓、上皮小体を含む甲状腺、精巣。また最終体重から各臓器の体重比を算出した。

最終体重は雌雄とも対照群に比べ統計学的に有意な差はなかった。

雌雄とも、各臓器の実重量および対体重比に統計学的に有意な差は認められなかった。

11. 病理組織学的検査 (表 4)

以下の臓器および組織について病理標本を作成し、検鏡した。

副腎, 大動脈, 骨 (大腿骨), 肋骨/肋骨軟骨接合部, 胸骨, 骨髓, 脳 (大脳-中脳, 小脳および延髄/脳橋), 盲腸, 頸部, 結腸, 食道, 胆嚢, 肉眼的病変部, 心臓, 大腿骨/脛骨関節, 腎臓, 喉頭, 肝臓, 肺, 腸間膜リンパ節, 頸部リンパ節, 乳腺, 筋肉, 座骨神経, 膵臓, 上皮小体, 下垂体, 前立腺, 直腸, 唾液腺, 皮膚, 小腸 (十二指腸, 空腸, 回腸), 脊髄 (頸髄, 胸髄, 腰髄), 脾臓, 胃, 胸腺, 甲状腺, 気管, 膀胱, 子宮, 眼, 視神経, 瞬膜/涙腺, 卵巣, 精巣, 精巣上体

認められた所見には用量に関連した頻度の増加が認められず、検体に起因したと考えられる病変は認められなかった。

表 4 主要な病理組織学的所見

性別	雄				雌					
	項目	用量 (ppm)	0	2	10	50	0	2	10	50
検査動物			4	4	4	4	4	4	4	4
副腎			4	4	4	4	4	4	4	4
副副腎			1	1	2	2	0	0	0	0
空胞化			1	1	2	1	4	4	2	4
血管拡張			2	3	2	2	0	0	0	0
肝臓			4	4	4	4	4	4	4	4
空胞変性			4	2	3	4	1	3	1	4
腎臓			4	4	4	4	4	4	4	4
鉍質沈着			2	2	3	2	3	3	4	3
上皮小体			4	4	4	4	4	4	4	4
のう胞			1	0	0	1	3	1	0	1
甲状腺			4	4	4	4	4	4	4	4
C細胞過形成			2	2	0	0	0	0	1	1
下垂体			4	4	4	4	4	4	4	4
のう胞			2	0	2	1	3	2	2	3
卵巣			/	/	/	/	4	4	4	4
のう胞			/	/	/	/	0	2	0	0
脂肪組織			0	1	0	0	0	0	0	0
脂肪腫			-	1	-	-	-	-	-	-

(Fisher 検定 (片側) ; 申請者により実施)

Confidential

以上の結果から、イヌを用いた1年間反復経口投与毒性試験における本剤の影響としてみられた所見は、50ppm 雌雄群で認められた脳コリンエステラーゼおよび血球コリンエステラーゼの阻害が認められた。

従って、本試験条件下における無毒性量 (NOAEL) は、10ppm (雄 ; 0.258mg/kg/日、雌 ; 0.262mg/kg/日) であると判断した。

MPP のサルに対する安全性評価

(毒性資料 No. 原体-19)

試験機関：

報告書作成年月：

検体の純度 : %
試験動物 : リーサスサル(Macaca mulatta)、1 群雌雄各 5 匹
投与期間 : 2 年間
投与方法 : 検体をコーン油に溶解し、1 日当たり 0(対照群)、0.02、0.07 及び
0.2mg/kg を 24 ヶ月間強制経口投与した。

試験項目及び結果：

1) 一般症状

外観、縮瞳、流涎、振せん、糞の状態について毎日観察した。

全てのサルの健康状態、外観が共に良好で異常は認められなかった。

2) 眼検査

水晶体の混濁について、投与開始前 2 回、その後月に 1 回検査した。

試験中、全ての動物共に正常で、混濁は認められなかった。

3) 体重

試験開始前とその後月に 1 回測定した。

各投与群の体重増加率は、対照群と全く差はなかった。

4) 生化学的検査

試験開始前 1 回、以後 1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月、18 ヶ月、23 ヶ月後の投与期間中に尿素窒素、Na⁺、K⁺、総蛋白、GPT、CL⁻、クレアチニン、カルシウム、クレアチンリン酸キナーゼ、オルニチンカルバミルトランスフェラーゼを測定し、血漿と赤血球コリンエステラーゼ(ChE)活性は試験開始前 1 回と最初の 4 週間は毎週、その後 1 ヶ月ごとに測定した。脳 ChE 活性は投与後約 8 ヶ月後に高用量群と対照群雌雄 1 匹を屠殺し測定した。

その結果、ChE 値を除く生化学的検査値に対照群と検体投与群に差はなかった。血漿 ChE 値は、0.2mg/kg 群の雌雄でほとんどの時期で対照群に比べ低下がみられたが、この血漿 ChE 値の低下を毒性学的に有意な指標としては考えなかった。一方、赤血球 ChE は、0.2mg/kg 雌雄で、散発的に対照群に比べ 20%以上の阻害を示した。脳 ChE 活性の阻害は認められなかった。

5) 血液学的検査

試験開始前1回、以後1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月、18ヶ月、23ヶ月後の投与期間中にHb値、Ht値、赤血球数、白血球数、白血球分画について測定した。
その結果、検体に起因する変化は何ら認められなかった。

6) 尿検査

試験開始前1回、以後1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月、18ヶ月、23ヶ月後の投与期間中に比重、pH、糖、蛋白質、沈渣について測定した。
その結果、検体に起因する変化は何ら認められなかった。

7) 肝の生検

後述の8ヶ月後に屠殺(対照群雌雄各1匹、0.2mg/kg群雌雄各1匹)した動物を除く全ての動物で、試験開始前と試験終了時に肝の生検を行った。
その結果、検体に起因する組織変化は何ら認められなかった。

8) 剖検および臓器重量

試験開始8ヶ月後に対照群雌雄各1匹、0.2mg/kg群雌雄各1匹を屠殺し、剖検を行い、臓器重量を肝、腎、副腎、脾、精巣、卵巣、胸腺、心、甲状腺、下垂体、脳について測定した。
その結果、検体投与に起因したと考えられる異常は認められなかった。

9) 病理組織学的検査

前記4匹の屠殺動物について、心、肺、リンパ節、胸腺、脾、唾液腺、肝、膵、腎、膀胱、卵巣、精巣、子宮、胃、回腸、結腸中間部、副腎、眼、下垂体、脳(延髄、小脳、大脳)と異常臓器について検査した。
検体に起因する組織学的変化は認められなかった。

以上のことから、サルに対する検体の影響は0.2mg/kg/日で赤血球ChE活性の阻害を認めた。

[申請者註]

1995年のJMPRの評価において、0.2mg/kg/日で時折赤血球ChEの阻害(>20%の阻害)がみられたため、0.07mg/kg/日を無毒性量として評価しており、申請者はこれを採用する。

MPP のマウスを用いた発がん性試験

(毒性資料 No. 原体-20)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：

検体の純度： %

試験動物 : B₆C₃F₁ マウス(搬入時；4~7 週齢, 体重 18~20g)

1 群雌雄各 60 匹(主群)+雌雄各 20 匹 (51 週後の中間検査用および脳の
コリンエステラーゼ活性測定用)

投与期間：24 ヶ月間

投与方法 : 検体を 0, 0.1, 1, 5 および 25ppm となるように粉末飼料に混ぜ、24 ヶ月
間投与した。

試験項目および結果：

1) 臨床症状

動物は毎日、最低 2 回(週末と休日は 1 回)、臨床症状を記録した。個体毎の詳細な
検査は週に 1 回実施した。

その結果、健康状態や一般行動への検体による影響は認められなかった。82 週目に
25ppm の 1 例の雄で伸展性痙攣がコリン作動性を示唆する症状として観察された。し
かし、この痙攣は他の観察時期および他の動物で観察されなかったため、偶発的で検
体に起因しないと判断した。

2) 死亡率

試験期間中の動物の死亡率を次表に示した。

その結果、死亡率に投与に起因する増加は認められなかった。

3) 体重

体重は毎週測定した。

その結果、雌雄の体重増加は、0.1ppm と 1ppm 群で対照群と同等であった。5ppm 群の雄で 16 週以降、雌で 20 週以降の体重が対照群と比較して有意に増加した。しかし、対照群との差はわずかで生物学的な変動の範囲にあったため、偶発的な変動で、投与による影響ではないものと判断した。25ppm 群雌雄では明らかに有意な増加(雄で 15%、雌で 14%)が認められた。

4) 摂餌量および検体摂取量(表 1)

試験開始から 7 週目までは個体毎に週 1 回、その後は群ごとに週に 1 回摂餌量を測定した。

25ppm 群まで摂餌量に対照群との差は認められなかった。

各用量群の試験期間中の平均検体摂取量 (mg/kg/日) を以下に示した。

表 1: 検体摂取量 (mg/kg/日)

投与用量 ppm	雄		雌	
	5 週間*	全期間	5 週間*	全期間
0.1	0.03	0.03	0.03	0.03
1	0.46	0.40	0.55	0.47
5	2.29	1.95	2.86	2.25
25	11.82	9.42	14.87	10.63

*米国 EPA の要求により投与開始 5 週間までの検体摂取量を調べ報告した(1992 年 11 月 3 日補遺)

5) 飲水量

試験開始から 102 週目までは毎週群毎に飲水量を測定した。

動物当たりの 1 日の飲水量は全ての投与群で対照群と差はなかった。5ppm 以上の群では体重が重かったために、体重あたりの飲水量は対照群と比較してわずかに低下した。

6) 臨床検査

血液サンプルに基づく臨床検査は、各群から最大 10 匹を用いて 27/28、53/54、79、

103/104 週時に実施した。脳のコリンエステラーゼ活性の測定は 51 週の間屠殺時と 105 週の最終屠殺時に各群とも最大 10 匹で行った。この検査に供した動物は本試験用に作成された無作為表に基づいて選択した。

6-1) 血液学的検査(表 2)

上記した検査時に眼窩静脈叢より血液をとり、白血球分画、赤血球形態、赤血球数、血液ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット、白血球数、平均血球血色素量(MCH)、平均血球血色素濃度(MCHC)、平均血球容積(MCV)、血小板数を測定した。

27、53、103 週目の血液学的検査から、投与に起因した変化および造血臓器の影響は認められなかった。検査されたパラメータ(例えば 25ppm 群の雌の赤血球、白血球、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値等)に対照群との間に統計的に有意な差が散見されたが、いずれも背景データの範囲内であって、用量相関性や時期的な傾向が見られず、ランダムに分布していた。白血球分画では、5ppm 以上の群の雄で 27 週にリンパ球の増加と分葉核好中球の減少、1ppm、5ppm、25ppm 群の雄の 53 週で分葉核好中球の有意な減少と単球の増加がみられ、5ppm と 25ppm 群の単球の平均値は背景値の上限よりもわずかに大きかった。これらの結果と対照群との差は極めてわずかであり、時間的な傾向も観察されなかったことから、偶発的で投与に起因しないものと考えられた。

6-2) 血液生化学的検査(表 3)

上記した検査時に眼窩静脈叢より血液をとり、アルカリホスファターゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALAT)、ビリルビン、コレステロール、総蛋白、尿素、クレアチニン、グルコース(尾静脈より採取)を測定した。

25ppm 群において、28 週目の検査の雌雄と 54 週目の検査の雌でコレステロール値は統計学的に有意に増加し、わずかではあるが背景データ*範囲外であった。しかし 104 週のコレステロール値は雌雄とも統計学的な有意差もみられず、また背景データ範囲内にあり、測定時期に関連した増加はみられなかった。また肝重量の増加は実重量のみの統計学的に有意な増加であり、対体重比の統計学的に有意な増加が伴っていないこと、そして肝の形態像には脂質代謝障害を示唆する変化は認められていないことから、みられたコレステロールの増加は偶発的な変化と判断した。その他の有意差は、背景データの範囲内にあり、時期的にも特異的な傾向はなく、検体に起因するものではなかった。

表 2. 血液検査結果 (統計学的有意差の認められた項目を下表に示す)

ppm	雄				雌			
	0.1	1	5	25	0.1	1	5	25
白血球数 ①						↓82	↓82	↓80
赤血球数 ①								↓94
ヘモグロビン ①								↓94
ヘマトクリット ①				↑103				↓95
ヘマトクリット ②				↑113				
MCV ②					↓95	↓96	↓96	↑113
MCH ③								↓94
MCHC ②	↑103		↑104	↓90				
白血球分画								
リンパ球 ①			↑111	↑174				
分葉核 ①	↓74		↓60	↓57				
好中球 ②		↓65	↓575	↓59				
単球 ②		↑151	↑174	↑104				

①27週目の検査, ②53週目の検査, ③試験終了時の検査

↑↓: $p < 0.05$, ↑↓: $p < 0.01$ (U test)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したものを。

表 3. 生化学検査結果 (統計学的有意差の認められた項目を下表に示す)

ppm	雄				雌			
	0.1	1	5	25	0.1	1	5	25
グルコース ②					↑117	↑123	↑142	↑130
グルコース ③				↑127				
コレステロール ①	↓90			↑115				↑129
コレステロール ②								↑116
クレアチニン ①							↑153	↑143
クレアチニン ②								
尿素 ①								↓83
蛋白 ①			↑104	↑104			↑106	↑105
蛋白 ②	↓95			↓91				

①27週目の検査, ②53週目の検査, ③試験終了時の検査

↑↓: $p < 0.05$, ↑↓: $p < 0.01$ (U test)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したものを。

6-3) コリンエステラーゼ (ChE) 活性 (表 4)

血漿、赤血球、脳コリンエステラーゼ活性を測定した。

その結果、0.1ppm では血漿、赤血球、脳の ChE に対して阻害は認められなかった。1ppm 以上の群では血漿 ChE の阻害、25ppm 群ではさらに赤血球と脳の ChE に阻害がみられた。5ppm までの脳の ChE 活性の阻害率は 10%~17%であったが、用量相関性も明確ではなく、また投与期間を通じて一定に阻害されていないことから検体の毒性

作用とは考えられなかった。以上のことから ChE 活性における無毒性量は 5ppm と考えられた。

申請者註) JMPR の評価(1995 年)では、脳 ChE の阻害率が 10%以上であった場合毒性学的に有意な変化としており、その評価基準に基づいていても上記理由で 5ppm までの脳 ChE の阻害率を毒性学的に有意とはしていない。

表 4. コリンエステラーゼ活性 (統計学的に有意な項目)

ppm	雄				雌			
	0.1	1	5	25	0.1	1	5	25
血漿 ChE ①	↓87	↓61	↓22	↓7		↓72	↓31	↓7
		↓67	↓22	↓6			↓28	↓8
		↓74	↓38	↓8		↓74	↓35	↓6
			↓63	↓41				↓59
赤血球 ChE①				↓85				
				↓76				↓87
				↓88				↓87
				↓87				
脳 ChE ①	-	-	-	-	-	-	-	-
	↑110		↓90	↓71		↓87	↓85	↓74
	-	-	-	-	-	-	-	-
	↓83	↓86	(86)	↓68	(96)	(98)	(95)	(96)

①28 週目の検査, ②54 週目の検査, ③79 週目の検査, ④試験終了時の検査, - : 検査せず
 ↑↓ : $p < 0.05$, ↓ : $p < 0.01$ (U test), () 統計学的に有意差なし
 表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示したもの。

7) 剖検

途中死亡動物、中間屠殺動物および最終屠殺動物の全動物を剖検した。

各動物の剖検所見では投与に起因する特異的な臓器変化は認められなかった。

8) 臓器重量(表 5)

12 ヶ月後の中間屠殺時と 24 ヶ月後の試験終了時に動物を屠殺し、以下の臓器の重量を測定した。また、体重を測定し、対体重比も算出した。

脳、心、精巣、肝、肺、脾、腎

肝実重量は、中間屠殺動物においては 25ppm 群の雄で軽度であるが統計学的に有意に増加(12%)した。この 25ppm 雄群の体重はこの時期に対照群よりも約 20%高値であったことから、肝の対体重比では、対照群との間に統計学的に有意な差は認められなかった。その他の雄群では対照群と意味のある差はなかった。試験終了時の剖検では、対照群と比較して、0.1ppm 群の雄では肝の実重量、対体重比に意味のある差は認めら

れなかった。1ppm と 5ppm 群で肝の実重量、対体重比は対照群よりわずかに増加したが、統計学的に有意ではなかった。25ppm 群での肝実重量は、対照群に比して統計学的に有意な約 31%の増加、対体重比は統計学的に有意ではないが約 20%増加した。しかし、肝臓に対する毒性所見として疑われる変化は病理組織学的には認められておらず、特に肝腫瘍発生を促進すると思われる病変もみられなかったことから、この群でみられた肝重量の増加は肝腫瘍本体の重量が影響している可能性があると考えられた。雌動物の肝の実重量と対体重比は中間屠殺時、最終屠殺時とも対照群と意味のある差は認められなかった。

腎実重量は、25ppm 群で 51 週の間断屠殺時の雄と最終屠殺時の雌雄で対照群よりもわずかだが有意に増加した。しかし、この群では体重が増加したために対体重比は低下した。従って、腎実重量の変化は投与に起因したものとは考えられなかった。

その他の対照群と統計学的に有意であった各種の臓器重量(実重量および対体重比)は対照群と意味のある差はなく、用量相関性はみられず、体重の差により説明できるものであった。

表 5. 統計学的に有意な臓器

ppm		雄				雌			
		0.1	1	5	25	0.1	1	5	25
体重	①			↑106	↑119				
	②			↑106	↑113				↑114
心	実重量 ①				↑106				
	対体重比 ①				↓90				
	②								↓91
	肝								
実重量	①	↓93			↑112				
	②				↑131				↑106
腎	実重量 ①				↑110				
	②			↑105	↑109	↑122			↑104
対体重比	①			↓96	↓94				
	②								↑103
脳	実重量 ①								
	②			↓93	↓84				
対体重比	①				↓89				↓91
	②								
肺	対体重比 ①			↓92	↓84				
	②				↓95				↓91
脾	対体重比 ①				↓92				↓90
精巣	対体重比 ①			↓90	↓84				
	②			↓96	↓89				

① 51 週目の検査, ② 試験終了時の検査, - : 検査せず

↑ ↓ : $p < 0.05$, ↑ ↓ : $p < 0.01$ (U test),

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示したもの。

9) 病理組織学的検査(表 6, 7, 8, 9, 10)

全試験群の動物の大動脈、眼、腸、外涙腺、大腿骨、胆のう、脳、ハーダー氏腺、膀胱、尿管、尿道、皮膚、心、精巣、下垂体、喉頭、頭蓋、肝、リンパ節、胃、乳腺、脾、筋肉、精巣上体、副腎、坐骨神経、腎、食道、卵巣、睪、前立腺、脊髄、精のう、甲状腺、唾液腺、胸骨、胸腺、期間、子宮、陰、舌、肉眼的病変部について、組織学的検査を行った。

9-1) 途中検査用群と主群の非腫瘍性病変

動物の臓器/組織に、投与に起因すると思われる非腫瘍性病変は認められなかった。

表 6-1: 途中検査用群-主な非腫瘍性病変

性	雄					雌				
	0	0.1	1	5	25	0	0.1	1	5	25
用量 (ppm)										
腎	19	19	20	20	20	20	20	20	20	20
リンパ球浸潤	0	1	0	0	2	0	0	3	1	0
好塩基性尿細管	2	3	2	1	2	2	0	2	0	0
肝	19	19	20	20	20	20	20	20	20	20
壊死巣	0	1	1	0	0	1	1	1	2	2
卵巣	/	/	/	/	/	20	20	20	20	20
黄体のう胞						0	0	3	3	3

Fisher の直接確率検定, 申請者により実施)

表 6-2: 主群-主な非腫瘍性病変

性	雄					雌				
	0	0.1	1	5	25	0	0.1	1	5	25
用量 (ppm)										
腎	59	60	60	60	60	60	60	60	59	60
好塩基性尿細管	5	3	2	5	8	1	0	0	1	0
糸球体腎症	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
肝	59	60	60	60	60	60	60	60	60	60
壊死巣	0	0	3	1	1	0	1	2	3	1
肝細胞肥大	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0
脾臓	54	59	60	60	60	60	60	60	60	60
髄外造血	3	5	3	5	7	3	3	5	7	2
精巣	59	60	60	60	60	/	/	/	/	/
精細管萎縮	0	1	1	1	0	/	/	/	/	/
副腎	59	60	60	60	60	60	59	60	60	59
皮質過形成	2	1	5	1	3	0	1	0	0	0

Fisher の直接確率検定, 申請者により実施) 本報告書を作成した当時、子宮内膜間質ポリープは非腫瘍性病変として取り扱われていたため、報告書中では非腫瘍性病変の表にリストアップされている。本抄録では腫瘍性病変として取り扱い、表 10 の腫瘍性病変の頻度表の中に記載した。

9-2) 途中検査用群の腫瘍性病変(表 7)

雄では腫瘍を有した 5 例のうち 4 例は肝細胞腺腫(対照群 1 例, 0.1ppm 1 例, 5ppm 2 例)で、残りの 1 例(1ppm)は歯牙腫であった。雌では 4 例に腫瘍が認められ、0ppm 群の 1 例に肝細胞癌がみられた。3 例の雌では副腎(0.1ppm)、甲状腺(5ppm)、ハーダー氏腺(5ppm)に腺腫がそれぞれみられたが、各群とも腫瘍の種類、頻度と分布に投与群との関連性はみられなかった。

表 7. 腫瘍の発生頻度/中間屠殺用動物

性別	雄					雌				
	0	0.1	1	5	25	0	0.1	1	5	25
投与用量 (ppm)										
動物総数	19	19	20	20	19	20	20	20	20	20
担腫瘍動物数	1	1	1	2	0	1	1	0	2	0
担良性腫瘍動物数	1	1	1	2	0	0	1	0	2	0
担悪性腫瘍動物数	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
担良性・悪性腫瘍動物数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
転移腫瘍動物数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
腫瘍の総数	1	1	1	2	0	2	2	0	4	0

9-3) 主群の腫瘍性病変(表 8, 表 9, 表 10)

担腫瘍動物数を表 8 に、またこれらの動物の死亡時期を表 9 に、また 2 年間投与の動物でみられた全ての腫瘍(発生部位、種類、良悪、頻度)を表 10 に示した。

各群の雌雄ごとに良性腫瘍を有する動物数、悪性腫瘍を有する動物数、良性と悪性の腫瘍を有する動物数の分布にわずかな変動しかみられず、各群の出現時期からも投与に関連した影響は認められなかった。

発現した良性腫瘍または悪性腫瘍のいずれも、腫瘍の発生部位、種類、頻度に用量に関連した差は認められず、またこれらの種類の腫瘍は本系統のマウスで自然発生するものであった。

これらのことから、検体に催腫瘍性作用はないものと考えられた。

表 8. 担腫瘍動物数/主群(最終屠殺)

性別	雄					雌				
	0	0.1	1	5	25	0	0.1	1	5	25
投与用量(ppm)	0	0.1	1	5	25	0	0.1	1	5	25
動物総数	45	56	50	50	51	48	52	49	49	45
担腫瘍動物数	13	26	25	27	21	27	29	28	33	27
担良性腫瘍動物数	9	19	15	15	14	11	12	9	10	6
担悪性腫瘍動物数	2	4	6	8	5	11	8	12	8	12
担良性・悪性腫瘍動物数	2	3	4	4	2	5	9	7	15	9
腫瘍の総数	19	32	37	37	27	37	46	37	59	43

本報告書を作成した当時、子宮内膜間質ポリープは非腫瘍性病変として取り扱われていたため、本表にはこの病変の発生数が集計されていない。

[申請者注]子宮内膜間質ポリープを腫瘍性病変として再集計した結果を以下に示す。

担腫瘍動物数/主群(最終屠殺)

性別	雄					雌				
	0	0.1	1	5	25	0	0.1	1	5	25
投与用量(ppm)	0	0.1	1	5	25	0	0.1	1	5	25
動物総数	45	56	50	50	51	48	52	49	49	45
担腫瘍動物数	13	26	25	27	21	28	30	30	34	28
担良性腫瘍動物数	9	19	15	15	14	12	13	11	11	7
担悪性腫瘍動物数	2	4	6	8	6	11	8	12	7	11
担良性・悪性腫瘍動物数	2	3	4	4	2	5	9	7	16	10
腫瘍の総数	19	32	37	37	27	38	47	39	61	45

表 9. 腫瘍を有する動物の死亡時期/主群(死亡動物)

性別	雄					雌				
	0	0.1	1	5	25	0	0.1	1	5	25
投与用量(ppm)	0	0.1	1	5	25	0	0.1	1	5	25
動物総数	15	4	10	10	9	12	8	11	11	15
担腫瘍動物数	9	2	7	5	5	7	5	8	7	8
担良性腫瘍動物数	5	0	1	0	2	1	0	1(2)	1	1(2)
担悪性腫瘍動物数	3	2	5	2	2	6	4	6	5	6
担良性・悪性腫瘍動物数	1	0	1	3	1	0	1	1	1	1
腫瘍の総数	10	2	8	9	6	7	6	9(10)	8	9(10)
死亡時期										
日数 1~90										
91~180										
181~270										
271~360										
361~450			1					1	2	
451~540	1		1		1	1	1		1	
541~630	4	1	2		1	3	1	1	1	3
631~720	4	1	3	5	3	3	2	4	2	5
721~733							1	2(3)	1	0(1)

()内の数値は子宮内膜間質ポリープを腫瘍病変として加算した結果を示す。

以上の結果のように、検体をマウスに2年間にわたって投与した結果、25ppm群では血漿、赤血球、脳のコリンエステラーゼが阻害された。1ppm以上では血漿コリンエステラーゼが阻害された。

本検体による発がん性は認められなかった。

[申請者註]

1995年のJMPRの評価において、1ppmでの血漿ChE値に対する影響は毒性学的に関連性がないものとされ、赤血球ChEおよび脳ChEの毒性影響が認められていない5ppmが無毒性量として評価されており、申請者はこれを採用する。

従って、無毒性量は5ppm(雄:1.95mg/kg/日、雌:2.25mg/kg/日)と判断した。

1993年6月28日付補遺の内容について

カリフォルニアEPAから、25ppmが最大耐量でない場合には本試験は発がん性試験としては不十分であるので、25ppmが最大耐量であるとした理由についての説明を求められた。この要望に対する説明書がこの補遺の内容である。その理由の主旨は、25ppmで、血球及び脳コリンエステラーゼに生物学的小よび毒性学的に有意な阻害が認められたことに主として基づいている。このことから、25ppmよりも高用量での投与はかなりの死亡を誘発し、最大耐量を超える事が推察されるため、更なる高用量の追加の必要性はなく、25ppmは最大耐量として評価しうるといったものである。尚、米国EPAも、本試験で設定された濃度は本剤の発がん性試験において適した用量であり、更なる高用量での試験の追加は必要ないと評価している。

表 10-1 : 腫瘍発生頻度 / 主群

性	雄					雌					
	用量 (ppm)	0	0.1	1	5	25	0	0.1	1	5	25
途中死亡動物	肺	13	4	10	10	9	12	8	11	11	15
	肺腺腫	b	1	0	1	2	0	0	0	0	0
	肺腺癌	m	0	0	0	0	0	0	1	1	0
	下垂体	14	3	9	6	8	11	8	10	10	13
	腺腫	b	0	0	0	0	0	0	1	1	0
	副腎	15	4	10	10	8	12	8	11	11	14
	皮質腺腫	b	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	褐色細胞腫	b	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	ハーダー氏腺	14	4	8	8	6	12	6	9	10	13
	腺腫	b	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	脾	14	3	10	10	9	12	8	11	11	15
	血管腫	b	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	血管肉腫	m	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	卵巣	/	/	/	/	/	11	8	11	11	15
	血管腫	b	/	/	/	/	0	0	1	0	0
	血管肉腫	m	/	/	/	/	0	0	1	0	0
	肝	15	4	10	10	9	12	8	11	11	15
	肝細胞腺腫	b	2	0	0	1	1	1	0	0	1
	肝細胞癌	m	1	1	0	2	3	0	0	0	1
	血管腫	b	1	0	1	0	1	0	0	0	0
血管肉腫	m	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
網内系	15	4	10	10	9	12	8	11	11	15	
悪性リンパ腫	m	3	0	5	3	0	4	3	5	3	
組織球肉腫	m	0	1	0	1	0	0	1	0	3	
皮下組織	0	0	0	1	1	1	0	0	0	2	
線維肉腫	m	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
子宮	/	/	/	/	/	12	8	11	11	15	
子宮内膜間質ポリープ	b	/	/	/	/	0	0	1	0	1	
最終屠殺動物	肺	44	56	49	50	51	48	52	49	49	45
	肺腺腫	b	6	7	11	1	3	0	3	0	1
	肺腺癌	m	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	下垂体	35	54	47	48	50	45	44	45	48	44
	腺腫	b	0	0	0	0	11	13	6	11	7
	副腎	43	54	49	50	51	48	51	49	49	45
	皮質腺腫	b	2	2	2	4	1	0	1	1	1
	褐色細胞腫	b	0	0	0	2	0	0	1	1	1
褐色細胞腫	m	1	0	0	0	0	0	0	0	0	

b: 良性, m: 悪性, (Fisher の直接確率検定, 申請者により実施)

表 10-2 : 腫瘍発生頻度 / 主群

性	雄					雌					
	用量 (ppm)	0	0.1	1	5	25	0	0.1	1	5	25
甲状腺		44	56	50	50	51	48	52	49	49	45
のう胞状ろ胞細胞腺腫	b	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
ろ胞細胞腺腫	b	0	0	0	0	0	0	3	0	2	2
ハーダー氏腺		42	54	46	45	46	43	50	47	49	43
腺腫	b	1	3	3	3	2	2	2	0	4	1
心		44	56	50	50	51	48	50	49	49	45
血管腫	b	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
脾		40	56	50	50	51	48	52	49	49	45
血管腫	b	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0
精巣		44	56	50	50	51	/	/	/	/	/
間質細胞腫	b	0	0	1	0	0	/	/	/	/	/
卵巣		/	/	/	/	/	46	52	48	48	45
血管腫	b	/	/	/	/	/	0	0	2	0	1
のう胞状腺腫	b	/	/	/	/	/	1	0	1	2	1
奇形腫	b	/	/	/	/	/	0	1	0	0	0
管状腺腫	b	/	/	/	/	/	0	0	0	1	1
莢膜細胞腫	b	/	/	/	/	/	0	0	0	1	0
顆粒膜細胞腫	b	/	/	/	/	/	1	0	1	1	0
子宮		/	/	/	/	/	48	52	49	49	45
平滑筋腫	b	/	/	/	/	/	1	1	0	0	0
平滑筋肉腫	m	/	/	/	/	/	1	0	0	0	1
腺癌	m	/	/	/	/	/	1	0	1	0	0
子宮内膜間質肉腫	m	/	/	/	/	/	0	1	0	0	0
子宮内膜間質ポリープ	b	/	/	/	/	/	1	1	2	2	2
腎		44	56	50	50	51	48	52	49	48	45
腺腫	b	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
盲腸		44	56	50	50	51	48	52	49	49	45
平滑筋腫	b	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
肝		45	56	50	50	51	48	52	49	49	45
肝細胞腺腫	b	5	12	9	13	10	1	2	4	6	4
肝細胞癌	m	3	3	10	5	5	2	1	2	2	1
血管腫	b	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
膵		44	56	50	50	51	48	52	49	49	45
島腺腫	b	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
唾液腺		44	56	50	50	51	47	51	49	49	44
血管腫	b	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

b: 良性, m: 悪性, **: P<0.01 (Fisher の直接確率検定, 申請者により実施)

表 10-3 : 腫瘍発生頻度 / 主群

性	雄					雌					
	0	0.1	1	5	25	0	0.1	1	5	25	
用量 (ppm)	0	0.1	1	5	25	0	0.1	1	5	25	
最終屠殺動物	網内系	44	56	50	50	51	48	52	49	49	45
	悪性リンパ腫 m	0	3	1	8**	3	13	14	14	21	20
	組織球肉腫 m	0	1	0	0	0	0	2	2	0	0
	皮膚	44	56	50	50	51	48	52	49	48	51
	線維肉腫 m	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	皮下組織	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	血管腫 b	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	腸間膜	0	1	0	1	0	0	2	0	0	3
	神経線維腫 b	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	全動物	肺	57	60	59	60	60	60	60	60	60
肺腺腫 b		7	7	12	3	3	0	3	0	1	1
肺腺癌 m		0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
下垂体		49	57	56	56	58	56	52	55	58	57
腺腫 b		0	0	0	0	0	11	14	7	11	7
副腎		58	58	59	60	59	60	59	60	60	59
皮質腺腫 b		2	2	2	4	2	0	1	1	1	1
褐色細胞腫 b		0	0	0	2	0	0	1	1	1	2
褐色細胞腫 m		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
甲状腺		57	59	57	60	60	59	59	59	60	60
のう胞状ろ胞細胞腺腫 b		0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
ろ胞細胞腺腫 b		0	0	0	0	0	0	3	0	2	2
ハーダー氏腺		56	58	54	53	52	55	56	56	59	56
腺腫 b		2	3	3	3	2	2	2	0	5	1
心		58	60	60	60	60	60	58	60	60	60
血管腫 b		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
脾		54	59	60	60	60	60	60	60	60	60
血管腫 b	1	0	0	0	0	1	0	0	2	0	
血管肉腫 m	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
精巣	59	60	60	60	60	/	/	/	/	/	
間質細胞腫 b	0	0	1	0	0	/	/	/	/	/	

b: 良性, m: 悪性, (Fisher の直接確率検定, 申請者により実施)

表 10-4 : 腫瘍発生頻度 / 主群

性	用量 (ppm)	雄					雌				
		0	0.1	1	5	25	0	0.1	1	5	25
全動物	卵巣	/	/	/	/	/	57	60	59	59	60
	血管腫	b	/	/	/	/	0	0	3	0	1
	血管肉腫	m	/	/	/	/	0	0	1	0	0
	のう胞状腺腫	b	/	/	/	/	1	0	1	2	1
	奇形腫	b	/	/	/	/	0	1	0	0	0
	管状腺腫	b	/	/	/	/	0	0	0	1	1
	莢膜細胞腫	b	/	/	/	/	0	0	0	1	0
	顆粒膜細胞腫	b	/	/	/	/	1	0	1	1	0
	子宮	/	/	/	/	/	60	60	60	60	60
	平滑筋腫	b	/	/	/	/	1	1	0	0	0
	平滑筋肉腫	m	/	/	/	/	1	0	0	0	1
	腺癌	m	/	/	/	/	1	0	1	0	0
	子宮内膜間質肉腫	m	/	/	/	/	0	1	0	0	0
	子宮内膜間質ポリープ	b	/	/	/	/	1	1	3	2	3
	腎	/	59	60	60	60	60	60	60	59	60
	腺腫	b	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	盲腸	/	59	59	59	59	59	60	59	59	60
	平滑筋腫	b	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	肝	/	60	60	60	60	60	60	60	60	60
	肝細胞腺腫	b	7	12	9	14	11	2	2	4	5
	肝細胞癌	m	4	4	10	7	8	2	1	2	2
	血管腫	b	2	1	1	0	1	0	0	0	1
	血管肉腫	m	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	膵	/	57	60	60	59	59	60	60	59	60
	島腺腫	b	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	唾液腺	/	59	59	60	60	60	58	58	59	59
	血管腫	b	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	網内系	/	59	60	60	60	60	60	60	60	60
	悪性リンパ腫	m	3	3	6	11*	3	17	17	19	24
	組織球肉腫	m	0	2	0	1	0	0	3	2	3
皮膚	/	59	60	59	60	59	58	59	60	59	
線維肉腫	m	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
皮下組織	/	0	0	0	1	1	1	0	1	0	
血管腫	b	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
線維肉腫	m	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
腸間膜	/	0	1	0	1	0	1	3	0	1	
神経線維腫	b	0	0	0	0	0	0	1	0	0	

b; 良性, m: 悪性, *: P<0.05 (Fisher の直接確率検定, 申請者により実施)

MPP のヒト(志願者)への安全性評価

(毒性資料 No. 原体-21)

試験機関:

報告書作成年月日:

検体の純度 : %

試験動物 : ヒト(志願者)、1群4名(男性)

投与期間 : 4週間投与

投与方法 : 検体をコーン油と混合し、ゼラチンカプセルに入れ、0、0.02、0.07mg/kg
の割合で4週間ヒトに投与した。

試験項目及び結果:

1) 一般症状

投与前とその後1週毎に体重、体温、脈拍数、血圧を測定し、問診を行った。

試験期間中、検体に起因する異常所見は全く認められなかった。

2) 生化学的検査

試験開始前2回、投与開始後週1回、グルコース、コレステロール、尿素窒素、クレアチニン、尿酸、ナトリウム、カリウム、カルシウム、無機リン酸塩、総蛋白、総ビリルビン、ALP、GOT、GPT、LDHについて測定した。

試験中、検体に起因する異常値は全く認められなかった。

3) 血液学的検査

試験開始前2回、投与開始後週1回、ヘモグロビン、ヘマトクリット、赤血球数、白血球数、白血球分画について測定した。

その結果、検体に起因する変化は何ら認められなかった。

4) 尿検査

試験開始前2回、投与開始後週1回尿を採取し、色と透明度、比重、pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン、潜血、沈渣について測定した。

その結果、検体に起因する変化は何ら認められなかった。

5) コリンエステラーゼ(ChE)活性

試験開始前4回、投与開始24時間後とその週にもう1回、合計週に2回血漿と

血球の ChE 値を測定した。

その結果、0.02mg/kg では ChE 値に影響は認められなかったが、0.07mg/kg では血漿 ChE 値が有意に減少した。

以上のことから、本試験で認められた変化は、0.07mg/kg/日の血漿 ChE 活性の低下であり、0.02mg/kg/日では影響は認められなかった。

[申請者註]

1995年のJMPRの評価において、0.07mg/kg/日では血漿 ChE 値に影響がみられたものの、赤血球 ChE への影響がみられていないこと、また臨床症状などが認められていないことから、0.07mg/kg/日が無毒性量として評価されており、申請者はこれを採用する。

MPP のヒトの中毒の治療例

1) 849mg/kg の硫酸アトロピンを投与し後遺症なく救命しえた激症有機リン(MPP)中毒例 1 例

(毒性資料 No. 原体-22)

治療機関：

報告書作成年：

中毒起因物質：MPP 乳剤(誤飲)

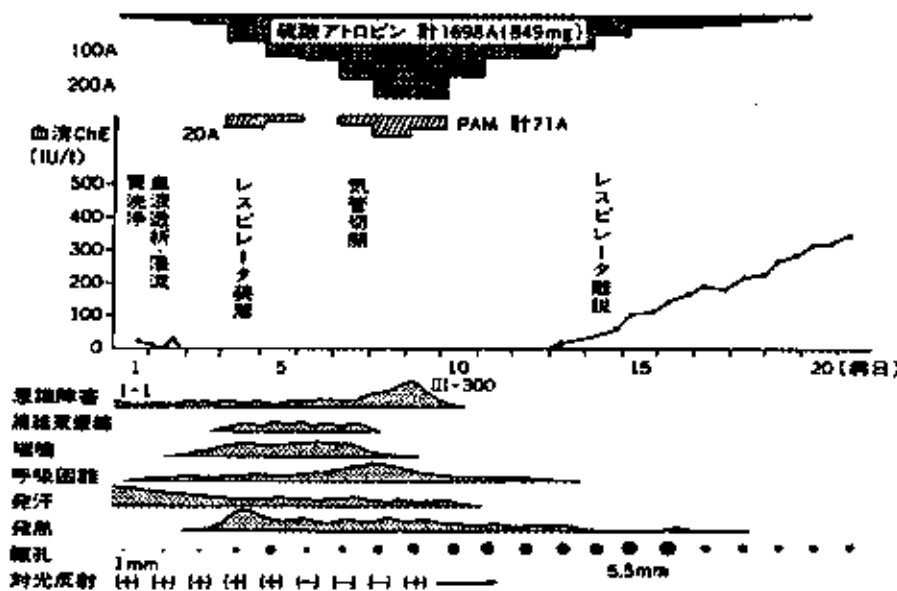
患者：57 歳 男性

転帰：第 49 病日に退院

治療経過：

入院時に瞳孔は左右同大で対光反射を認めたが、直径 1mm と高度の縮瞳を呈していた。その後の臨床検査により、血清コリンエステラーゼ (ChE) の著明な低値と、特徴的な臨床症状により、直ちに有機リン中毒と診断され、胃洗浄後にアトロピン投与が開始された。同時に血液灌流も試みられたが中断された。さらに PAM も一時併用された(総量 35.5g)。

アトロピンの投与に関しては、発汗の増加、気道分泌の増加、縮瞳傾向の出現、さらに経過中に出現しはじめた筋線維束攣縮の増強を指標に、アトロピン(2.5mg, 5 アンプル)の緩徐静脈注投与が 30 分毎に反復された。最高 120mg/日の投与が必要とされ、最終的に治療に要したアトロピンの総量は 849mg/日(1698 アンプル)、投与期間は 19 日間であった。この間、血清 ChE は第 13 病日より上昇し始め、第 30 病日には正常に戻った。これに平行して意識障害をはじめ全身状態も次第に改善し、後遺症もなく回復した。



2) 特異な経過を呈した有機リン中毒の2症例

(毒性資料 No. 原体-22)

治療機関：

報告書作成年：

中毒起因物質：MPP 乳剤(服用)

患者：50歳 男性

転帰：第45病日に退院

治療経過：

初診時意識清明で、瞳孔等の理学的所見で異常が認められなかった。しかし、初診時の検査から、血清コリンエステラーゼ (ChE) 値は 0.02U/mL と低下し、また血清中に MPP が 14ppm 検出された。

入院後まったく中毒症状がみられず、服用後 2 日目に患者の希望で自宅に近い病院に転院した。服用後 3 日目に、突然意識障害、縮瞳、対光反射消失、筋攣縮が出現し、遅発有機リン中毒と診断された。機械呼吸やアトロピン投与によって臨床症状は改善し、レスピレータより離脱後、45 病日に退院した。

3) MPP 急性中毒

(毒性資料 No. 原体-22)

治療機関：

報告書作成年：

中毒起因物質：MPP 水和剤(服用-自殺目的)

患者：33歳 女性

転帰：入院13日目に退院

治療経過：

入院当日(服用翌日)意識清明で、瞳孔と対光反射正常、神経症状および機能異常は認められなかった。入院後直ちに、PAMを2アンプル点滴、アトロピン1アンプルを3時間おきに筋注、フェノバル1アンプル、ブスコパン1アンプルが注射された。血清ChEの活性値は0.08(Δ pH)であったが、ChE活性阻害による中毒症状は特に報告されていない。

入院翌日に血清ChEの活性値は0.00(Δ pH)となったが、観察された症状は腹痛と嘔気であった。PAMの2アンプルを点滴注入、アトロピンの1アンプルが3時間おきに筋注された。

アトロピンの投与は入院3日目に、PAMの投与は入院8日目に中止され、入院13日目に退院した。

血清および血球ChE活性

入院	血清ChE (Δ pH)	血球ChE (Δ pH)
当日	0.08	-
1日目	0	0.47
2	0.09	0.50
3	0.18	0.47
4	0.22	0.47
5	0.23	0.50
6	0.24	0.46
7	0.37	0.54
8	0.38	0.54
9	0.36	0.57
11	0.50	0.50
13	0.56	0.53

(12) 繁殖毒性及び催奇形性

MPP のラットの繁殖性に及ぼす影響(三世代)

(毒性資料 No. 原体-23)

試験機関 :

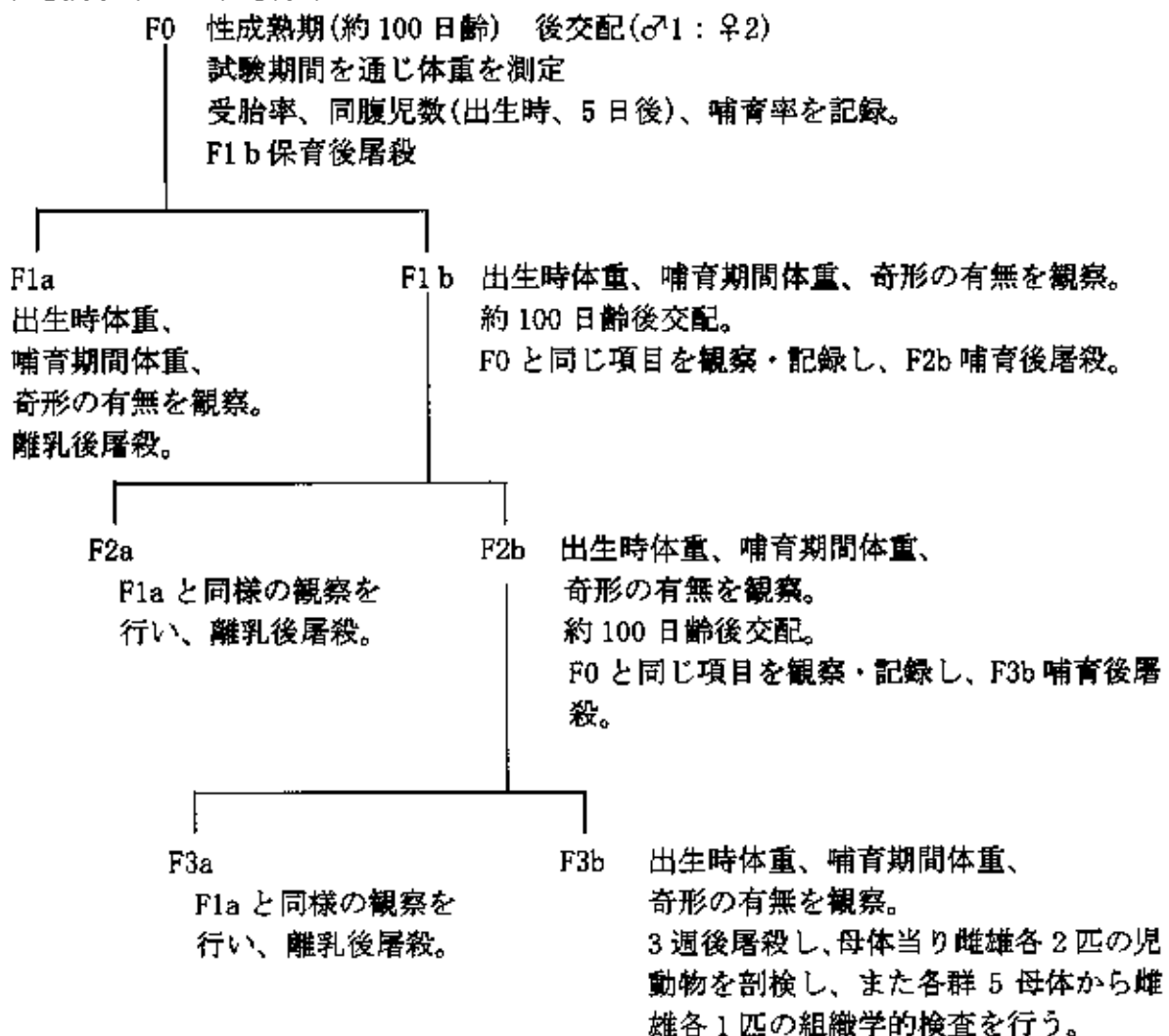
報告書作成年月日 :

検体の純度 : %

供試動物 : FB30 系ラット, 約 33 日齢, 1 群雄各 10 匹, 雌各 20 匹

投与方法 : MPP を Silkasil S と混ぜ、50% プレミックスにして粉末飼料中に 0 (対照群)、3、15 及び 75ppm の濃度に混合し、ラットの 3 世代にわたって給餌した。

試験方法および試験項目



結果

次頁の表に示したように、本検体を 0、3、15 および 75ppm の投与用量で三世代にわたりラットに投与したところ、75ppm 群で F0 と F1b 親世代において体重の低下(または一時的低下)がみられた。

受胎率(妊娠率)、同腹児数、児動物の出生児体重、哺育期間体重、哺育率および奇形の検査では、全世代において 75ppm までの投与で影響は認められなかった。また、F3b 動物を 3 週齢で屠殺し、1 母体当り雌雄各 2 匹を剖検し、各群雌雄各 5 匹(1 母体から雌雄各 1 匹)について組織学的検査を行ったが、検体に起因する影響は全く認められなかった。従って、75ppm で体重増加に影響が認められたが、検体は繁殖性に影響を示さなかった。

従って、無影響量は親動物に対して、15ppm、児動物および繁殖能に対しては 75ppm と判断した。

世代	親：F0		兄：F1a, F1b		親：F1b		兄：F2a, F2b		親：F2b		兄：F3a, F3b	
	0	3	15	75	0	3	15	75	0	3	15	75
投与用量(ppm)												
動物数	雄	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	雌	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
親動物												
体重	雄	-	-	-	低下	-	-	-	-	-	-	-
	雌	-	-	-	低下	-	-	-	-	-	-	-
受胎率	a	19/20	20/20	17/20	16/20	19/20	19/20	18/20	19/20	20/20	19/20	20/20
	b	11/20	17/20	13/19	11/20	19/20	19/20	18/20	19/20	20/20	20/20	20/20
児動物												
出生時平均数	a	10.9	11.40	7.05	7.85	11.1	10.2	11.7	9.8	13.05	11.10	12.40
	b	11.6	11.1	10.6	10.6	11.4	10.9	10.0	10.5	12.05	11.47	11.00
5日後平均生存数	a	8.60	8.95	5.50	6.85	8.7	8.0	9.6	7.9	9.20	8.25	8.95
(淘汰後)	b	8.5	8.6	8.4	8.8	9.2	8.9	8.1	8.8	9.15	8.84	9.26
出生時平均体重	a	6.22	6.05	6.32	6.11	6.59	6.11	6.09	6.31	6.05	6.07	6.22
	b	6.23	6.41	6.53	6.15	6.07	6.53	6.53	6.44	6.04	6.28	5.77
哺育率	a	97.66	94.41	95.45	91.24	98.18	99.34	98.25	98.00	84.24	87.88	94.97
(4週後生存率)	b	98.94	97.26	97.03	87.63	97.70	97.04	98.63	98.62	96.72	89.28	96.59
哺育期体重	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
奇形の有無	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
病理解剖, 組織												
(F3bのみ)												

*p<0.05, **p<0.01, - : 影響なし, 空欄: 検査せず, a: 第1回目出産時, 第一産児, b: 第2回目出産時, 第二産児

受胎率 (妊娠動物数/交尾動物数 (雌)), 5日後生存率=(生後5日淘汰前生存児数/出生児数)×100,

哺育率=(4週哺育後の新生児総数/淘汰後の新生児総数)×100

MPP のラットの繁殖性に及ぼす影響(二世代)

(毒性資料 No. 原体-24)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年月日:

検体の純度: %

供試動物: SD系ラット (Cr1:CD BR)、1群雌雄各30匹、投与開始時10週齢
体重 雄 333~463 g、雌 192~277 g

投与期間: P世代; 投与開始からF1児離乳時までの21週間、
F1世代; 離乳からF2児離乳時までの22週間 (1988年1月11日から)

投与方法: 検体を0、1、2、14及び100ppm含有した飼料を自由に摂取させた。
検体混入飼料を2~3週間ごとに調製した。なお、飼料に添加する際アセトンとコーン油に混和させた。

投与量設定根拠; 投与量は Mobay Corporate Toxicology にて既存のデータをもとに検討され、EPA で討議・受諾された。

交配・調整・選抜及び観察・検査項目: 概要を次ページの表にまとめた。

一般状態及び死亡率; 全動物の一般状態及び生死を毎日観察した。

交配及び妊娠の確認; 交配は雌雄を1:1で同居させ、翌日膣スメア中の精子の存在により交尾を確認した。交尾確認日を妊娠0日とした。

繁殖性に関する指標; 交配、妊娠及び哺育時期の観察に基づき、次の指標を算出した。

交尾所要日数 = 交配開始日から交尾成立まで

交尾率(%) = (交尾動物雌数/雄と同居させた雌動物数) × 100

受胎率(%) = (妊娠動物数/交尾動物雌数) × 100

出産率(%) = (生児出産雌数/妊娠雌数) × 100

出生率(%) = (出產生児数/着床痕数) × 100

妊娠期間 = 交尾成立から出産まで

生後4日の生存率(%) = (生後4日(児数調整前)の生児数/生後0日の生児数) × 100

離乳率(生後21日の生存率)(%) = (生後21日の生児数/生後4日(児数調整後)の生児数) × 100

病理組織学的検査;

P及びF1親動物の精巣上体および肉眼的病変については全群で、精巣、前立腺、精囊、卵巣、子宮、子宮頸部、膣、下垂体については対照群と最高用量群で病理標本を作成し、鏡検した。

試験方法及び項目 : 概要を下記の表に示す。

世代	期間 (週間)	交配・調整・選抜	観察・検査項目
P	生育 (10 週間)		一般状態の観察、体重・摂餌量を週 2 回測定、性周期の観察 (交配前 10 日、各群 10 匹)、血漿・赤血球 ChE 活性の測定 (交配前 10-14 日、雌雄各 10 匹)
	交配 (最長 4 週間)	雌雄 1:1 で交配。交配は陰スミア中の精子で確認 (妊娠 0 日)。	交配状況の観察
	妊娠 (3 週間)		妊娠 0、7、14、20 日に体重、摂餌量を週 2 回測定
	出産		出産状況の観察 新生児数、死産児数、外表異常、性別および同腹生存児体重測定。
	哺育 (3 週間)	生後 4 日目に、同腹児数を雌 4 匹、雄 4 匹に調整 (不可能な場合は雌雄計 8 匹、計 8 匹に満たない場合にはそのままの匹数を哺育)。生後 21 日に離乳。	母動物の出産後 0、7、14、21 日目に体重測定。摂餌量の測定なし。 出生児は死亡、一般状態を生後 21 日まで毎日観察、生後 0、4、7、14、21 日に体重測定。生後 4 日目淘汰児は肉眼的病理検査、脳・血漿・赤血球 ChE 活性の測定 (各群 10 腹、雌雄各 3 匹)。
F ₁	離乳	継代用の各群雌雄 30 匹ずつを分娩した母動物から 1 腹あたり少なくとも雌雄各 1 匹ずつ無作為に選抜。	親動物 (雄: 出生児の離乳後、雌: 哺育 21 日) は肉眼組織学的検査、臓器重量測定 (精巣、精巣上体、卵巣、下垂体) 及び脳・血漿・赤血球 ChE 活性測定 (交配前の測定時と同じ動物)。 継代用以外の見動物の肉眼的病理検査及び脳・血漿・赤血球 ChE 活性測定 (生後 21 日、各群 10 腹、雌雄各 1 匹)。
	生育 (11 週)		(P 世代に準ずる)
	交配 (最長 4 週間)	(P 世代に準ずる)	(P 世代に準ずる)
	妊娠 (3 週間)		(P 世代に準ずる)
	出産		全ての F ₁ 雌動物が出産した後、雄親動物は肉眼組織学的検査、臓器重量測定 (精巣、精巣上体、下垂体) 及び脳・血漿・赤血球 ChE 活性測定 (交配前の測定時と同じ動物)。 (P 世代に準ずる)
F ₂	哺育 (3 週間)	(P 世代に準ずる)	雌親動物は F ₁ 世代に準じて検査。残りの F ₂ 見動物は肉眼的病理検査及び脳・血漿・赤血球 ChE 活性測定 (生後 21 日、各群 10 腹、雌雄各 1 匹)。
	離乳		

結果：

一般状態の観察

試験期間中、検体投与に起因した異常はいずれの動物にも認められなかった。

死亡

P世代では対照群の雄1例が投与30日に事故死し、対照群の雌1例が投与99日及び1ppm群の雄1例が投与91日に死亡した。また、対照群の雌1例を投与28日に切迫屠殺した。いずれの死亡も検体投与に起因するものではなかった。

体重

P世代の雌では2及び100ppm群で、F1世代の雌では100ppm群で交配前期間の体重値が統計学的に有意な高値を示したが、軽微な変化であり、検体投与との関連はないものと考えられた。また、F1世代の雄では100ppm群で有意な低値を示したが、初回測定日の体重が有意に低かったことに起因していると考えられた。従って、雌雄の1、2、14ppm群及び雄の100ppm群ではいずれの期間においても検体影響は認められなかった。100ppm群の雌では妊娠期間の体重増加量がP世代で有意な低値、F1世代で低値傾向が認められ、いずれも検体投与の影響と考えられた。

摂餌量

両世代とも検体投与の影響は認められなかった。

繁殖能

両世代ともいずれの投与群でも発情周期、交尾所要日数及び交尾行動に影響は認められず、交尾率に影響はなかった。また、妊娠期間、出産率及び出生率にも影響は認められなかった。組織検査で実施した精巣及び精巣上体の精子形成ステージ、精子数、精子形態に異常は認められなかった。

P世代の雌では2ppm群の受胎率が69%と有意に低かったが、14ppm群では対照群と差がなく、且つ、F1世代の2ppm群では同様の変化が認められなかったことから検体影響とは考えなかった。従って、両世代とも1、2及び14ppm群では受胎能及び繁殖能に検体影響は認められなかった。100ppm群では両世代とも受胎率が統計学的に有意な低下を示し、妊娠動物数（F1世代のみ）、平均着床痕数及び平均同腹児数が背景値の範囲を外れ（妊娠動物数：11-29、平均着床痕数：13.1-16.1、平均同腹児数：12.0-16.8）低値傾向を示し、検体投与の影響と考えられた。なお、コリンエステラーゼ活性が血漿、赤血球および脳のいずれにおいても著明に阻害されたことから、これらの影響は後述のようにコリンエステラーゼ活性阻害に起因した二次的な影響

と考えられた。

新生児への影響

胎児に対し、両世代とも 100ppm 群で死産児率の高値傾向（背景値：0-2.2%）が認められ検体影響と考えられた。児動物の成長および発達に関して、両世代とも 1、2 および 14ppm 群では検体影響は認められなかった。100ppm 群では両世代とも生存性に対する検体影響が認められ、総死亡児率及び生後 0-4 日の死亡児数が増加傾向、生後 4 日の生存率及び離乳率が低値傾向を示した。体重変化については、哺育期間中の体重増加量、生後 14 及び 21 日の体重中央値の低値が認められた。特に F2 児動物の体重値は背景値の範囲（生後 4 日：9.2-10.5g、生後 7 日：14.3-17.2g、生後 14 日：27.5-34.7g、生後 21 日：44.5-54.7g）から外れていた。なお、これらの影響は、後述のようにコリンエステラーゼ活性が血漿、赤血球および脳のいずれにおいても著明に阻害されたことから、コリンエステラーゼ活性阻害に起因した二次的な影響と考えられた。両世代とも哺育期間中の児動物の一般状態には検体影響は認められなかった。

剖検

両世代とも、雌雄の親動物および児動物の剖検で認められた所見はいずれも自然発生性の変化と考えられ、検体影響による肉眼変化はなかった。

病理組織学的検査

両世代の雄の 14 及び 100ppm 群で、精巣上体体部に精巣上体管上皮の空胞化が認められ検体投与に関連した変化と考えられた。空胞化は主に主細胞に認められ、特に体部の中間部で大型の空胞が認められたことから、同部分が空胞化の発生に関係していたと考えられた。空胞化の程度は P 世代より F1 世代で比較的強く認められた。なお、精巣上体管上皮の空胞形成にはライソゾームが関与し、代謝産物や老化した小器官など異物を分解することが知られていることから、本試験で求められた空胞化も異物に対する防御反応と考えられた。

雌の生殖器官に対して検体影響を示唆する異常所見は認められなかった。

他に認められた所見はいずれも自然発生性の変化と考えられた。

臓器重量

雄では、精巣上体について P 世代の 100ppm 群で実重量が統計学的に有意な高値を示したが、対体重比重量には有意な差は認められなかった。F1 世代の 100ppm 群では精巣上体の実重量が僅かな高値、対体重比重量が有意な高値を示した。また、下垂

体重量がP世代の雄の1、2及び14ppm群では実重量及び対体重比重量ともに有意な低値、雌の2及び100ppm群では実重量が高値を示したが、組織学的な変化は認められず検体影響ではないと判断した。F1世代の雌では100ppm群で卵巣重量の実重量が低値傾向、対体重比重量が有意な低値を示したが、組織学的な変化は認められず、黄体数に関係した結果と推察され、毒性学的影響はないものと判断した。

コリンエステラーゼ活性

P世代の親動物では、血漿 ChE 活性値は雌雄の14及び100ppm群で交配前及び最終剖検時のいずれでも有意な低値を示し阻害率が高値であった。赤血球 ChE 活性値は雄の14及び100ppm群、雌の100ppm群で交配前に低値を示し阻害率が高値であった。脳 ChE 活性値は雌雄の14及び100ppm群で最終剖検時に低値を示し阻害率が高値であった。F1世代の親動物についてもP世代とほぼ同様に、血漿 ChE が雌雄の14及び100ppm群で交配前および最終剖検時に、赤血球 ChE が雌の100ppm群で交配前、雌の14ppm及び雌雄の100ppm群で最終剖検時に、脳 ChE が雌雄の14及び100ppm群で最終剖検時に、いずれも活性値が低値を示し阻害率が高値であった。また、P世代の雌の2ppm群で血漿 ChE、1及び2ppm群で脳 ChE の活性値が最終剖検時に低値を示したが、同群の雄では認められず、F1世代の親動物および両世代の児動物でも認められていないことから毒性学的な意義はないと判断した。

児動物ではF1及びF2世代とも生後4日の測定で、雄については血漿 ChE 活性値が14及び100ppm群、赤血球 ChE 活性値が100ppm群、雌については血漿及び赤血球 ChE 活性値が100ppm群で低値を示し阻害率が高値であった。生後21日の測定では、雌雄とも血漿 ChE 活性値が14及び100ppm群、赤血球及び脳 ChE 活性値が100ppm群で低値を示し阻害率が高値であった。なお、生後21日の阻害率は生後4日より増加した。この原因としては児動物が成長に伴い自発的に摂餌したためと考えられた。

以上の結果より、2世代にわたって検体を飼料中に混入して投与した場合、100ppm群では雌の妊娠期間の体重増加量が低値(P、F1)を示し、病理組織検査では精巣上体体部の精細管上皮細胞で細胞質の空胞化(P、F1)が14ppm群では少数例、100ppm群では全例に観察され、100ppm群では精巣上体の実重量及び/または対体重比が高値(P、F1)を示した。繁殖能については、100ppm群で受胎率、出生率、生存率(0日、4日)、離乳率、母動物数(出産率)、平均着床痕数及び平均同腹児数が低値、平均死亡児数が高値を示した。胎児毒性として、100ppm群で死産児数が増加した。児動物に対しては、100ppm群で総死亡児数および生後0-4日の死亡児数が高値、体重増加量、生後14日及び21日の生存児体重の中央値が低値を示した。なお、コリンエステラーゼ活性が14

及び100ppm群で親動物、児動物ともに血漿、赤血球および脳のいずれにおいても著明に阻害されたことから、親動物に認められた毒性兆候、繁殖能の低下や児動物に認められた影響はコリンエステラーゼ活性阻害に起因した二次的な影響と考えられた。

従って、無影響量は親動物に対して、雄では2ppm(0.16mg/kg/日)、雌では14ppm(1.12mg/kg/日)。児動物および繁殖能に対しては14ppmと判断した。また、コリンエステラーゼ活性阻害に対する無影響量は2ppmと判断した。

結果の概要

世代		親: F0 親: F1					親: F1 親: F2				
投与量 (ppm)		0	1	2	14	100	0	1	2	14	100
動物数	雄	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
	雌	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
一般状態											
死亡数	雄	1	1								
	雌	2									
体重変化	雄										▲
	雌			↑		↑					▲
体重増加量 (妊娠期間)	雄										
	雌										
交尾所要日数(中央値)		3	3	2	2	3	3	4	4.5	3	3
受精期間 (a)		19.0	25.0	25.0	23.0	32.0	23.0	23.0	20.0	18.0	26.0
交尾率 (%)		100.0	100.0	98.7	100.0	100.0	100.0	90.0	90.0	100.0	85.7
受胎率 (%)		96.7	90.0	69.0	93.3	73.3	86.7	81.5	81.5	86.7	36.5
妊娠動物数		28	27	20	27	22	26	22	20	25	10
出産率 (%)		96.6	100.0	100.0	96.4	100.0	100.0	100.0	90.9	96.2	100.0
妊娠期間 (日)		22.0	22.1	22.1	22.2	22.2	21.8	22.0	22.0	21.8	22.1
肉眼的病理解査											
病理組織学的検査											
精巣上皮管上皮空腔化					2	30				2	30
精巣・精巣上皮の精子数											
臓器重量											
下盤体	雄		▲A 81 ▲R 67	▲A 75 ▲R 67	▲A 88 ▲R 87						
	雌			↑A123		↑A115					
精巣上皮						▲A109					A(↑) ▲R109 A(↓) ▲R 76
卵巣											
コリンエステラーゼ活性 (交配前)											
血漿 ChE	雄/雌				↓73/↓31	↓40/↓8				↓67/↓38	↓37/↓12
赤血球 ChE	雄/雌				↓19/	↓8/↓5					↓140
脳 ChE	雄/雌										
(最終採血時)											
血漿 ChE	雄/雌			↓178	↓73/↓33	↓38/↓12				↓61/↓33	↓90/↓10
赤血球 ChE	雄/雌									↓58/↓30	↓36/↓30
脳 ChE	雄/雌		↓178	↓83	↓81/↓40	↓36/↓22				↓72/↓82	↓44/↓44
総出生数		364	336	251	354	232	325	265	248	320	111
死産児数		6	1	0	3	7	11	6	8	7	6
死産児率 (%)		1.7	0.3	0.0	0.8	3.0(↑)	3.4	2.3	3.2	2.2	5.4(↑)
平均同腹児数		12.6	12.4	12.0	13.1	10.6(↓)	12.5	12.0	12.4	12.8	11.1(↓)
外産異常											
性比 (%) 雄		53.7	42.9	63.8	49.3	50.0	48.5	63.3	44.5	65.6	39.2
平均増床指数		13.4	13.6	13.0	13.8	11.6(↓)	13.5	13.0	13.8	14.1	12.4(↓)
出生率 (%)		90.1	90.3	90.6	92.2	84.3	88.9	89.1	79.4	85.9	81.2
体重 (a: 中央値)											
生後0日		6.2	6.4	6.1	6.2	6.4	6.0	6.0	6.3	6.1	6.0
生後4日		10.1	10.2	10.0	10.0	9.8	9.4	9.6	9.8	9.4	7.8(↓)
生後7日		16.4	16.9	17.0	17.2	16.9	16.0	16.0	16.2	15.3	12.2(↓)
生後14日		33.6	33.9	34.6	33.6	▲30.5	31.8	32.1	32.6	31.7	26.4(↓)
生後21日		54.8	55.4	56.8	54.3	▲50.6	50.8	49.4	52.4	50.5	43.2(↓)
体重増加量		48.6	49.3	50.4	48.3	▲44.2	44.6	43.2	46.4	44.9	37.6(↓)
総死亡数		16	3	7	24	▲28	19	12	15	23	24
総死亡率 (%)		4.2	0.9	2.8	6.8	12.1(↑)	5.8	4.5	6.5	7.2	21.6(↑)
生後0-4日の死亡数		9	2	7	20	17(↑)	7	6	7	15	17(↑)
生後4日の生存率 (%)		97.6	99.6	97.3	91.3	85.0(↓)	98.1	97.8	97.1	94.8	73.9(↓)
離乳率 (%)		100.0	100.0	100.0	99.6	97.6(↓)	99.5	100.0	100.0	99.6	87.5(↓)
肉眼的病理解査											
コリンエステラーゼ活性 (生後4日目)											
血漿 ChE	雄/雌				↓88/	↓83/↓69				↓87/	↓60/↓62
赤血球 ChE	雄/雌					↓70/↓66					↓165
脳 ChE	雄/雌										
(生後21日目)											
血漿 ChE	雄/雌				↓62/↓62	↓19/↓18				↓67/↓66	↓42/↓27
赤血球 ChE	雄/雌					↓11/↓19					↓56/↓45
脳 ChE	雄/雌					↓47/↓49					↓83/↓83

↑, ↓: P<0.05 ▲: P<0.01

空欄: 投与による影響なし

A: 実重量 R: 対体重比

a) (受精回数/産量回数) x 100

体重, 精巣量, 臓器重量, コリンエステラーゼ活性値は, Dunnettの多重比較検定を実施した。

交尾率, 受胎率, 出産率, 離乳率, 生存率, 出生率は, Fisherの直接確率検定を実施した。

同腹児数, 生存率, 総死亡数, 増床指数, 性比 (雄), 出生児体重, 出生児体重増加量は, Kruskal-Wallis検定の後Dunn検定を実施した。

コリンエステラーゼ活性値および臓器重量は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を

MPP のラットを用いた催奇形性試験

(毒性資料 No. 原体-25)

試験機関：

報告書作成年月日：

検体の純度： %

試験 動物：FB30 系ラット 1 群妊娠雌各 19～20 匹

(試験開始時：198g～267g, 2.5～3.5 ヶ月齢)

試験方法：検体を 0.5% Cremophor 水溶液に懸濁し、0、1、3、10mg/kg の投与用量でラットの妊娠 6～15 日目に毎日 1 回強制経口投与した。対照群には、体重 1kg 当たり 10mL の 0.5% Cremophor 水溶液を同一期間に投与した。

投与用量設定の根拠

予備試験で妊娠ラットに 30mg/kg を 6 回毎日投与したところ、一部の動物に振せんとう体重減少がみられたことから、本試験の用量を設定した。

検査項目：

母体；一般症状、死亡、体重増加の観察と妊娠 20 日に帝王切開し受精率、妊娠率、着床数、生存胎児数、吸収胚数(死亡胎児は、後期吸収とみなしここに含まれる)を調査した。

胎児；体重、発育遅延胎児数、胎盤重量、外表検査、骨格検査および内臓検査を行った。

試験結果：

ラットにおける胎児毒性試験において、MPP は 10mg/kg/日までの経口投与で、母体に損傷を与えず、また検体投与期間および全妊娠期間においても母体の体重増加に影響を与えなかった。死亡動物はなく、試験に用いた用量では、母体毒性も認めなかった。同様に胎児の発育にも 10mg/kg/日までの用量では影響がなく、対照群を含む全群に奇形が散発的にみられたが、その性質および頻度の視点から、本試験に供試したラットの系統に通常みられるもので、自然発生的なものであった。

従って検体の 10mg/kg/日までの投与では母体毒性、胎児毒性、催奇形性作用はいずれも認められなかった。

投与用量 mg/kg/日		0	1	3	10
1群あたりの妊娠動物数		20	19	20	20
親	一般症状	-	-	-	-
	死亡数	0	0	0	0
	体重増加(g)	141.5	147.0	144.1	141.2
	受精率(受精雌/交尾雌)	20/21	20/22	20/21	20/21
	着床所見				
	平均着床数	10.9	11.0	10.8	11.2
	平均生存胎児数 雄	4.8	5.3	5.3	5.3
	雌	5.4	4.5	4.6	5.3
	平均死亡胎児数, 吸収胚数	0.6	1.2	0.8	0.6
胎児	平均体重(g)	4.11	4.27	4.25	4.21
	平均発育遅延胎児数(<3g)	0.00	0.05	0.15	0.05
	平均胎盤重量(g)	0.56	0.58	0.57	0.57
	平均骨格異常胎児数	3.20	3.84	2.95	3.65
	平均奇形胎児数(胎児数/母体)	0.05(1/1)	0.11(2/1)	0.15(3/2)	0.05(1/1)

* : p<0.05

MPP のラットを用いた催奇形性試験

(毒性資料 No. 原体-26)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：

検体の純度 : %
試験動物 : Sprague-Dawley 系 (Cr1:CD*BR) ラット
各群雌 33 匹 (更に 2 群に分けた ; I 群 ; 妊娠 16 日目に屠殺する
母動物 5 匹, II 群 ; 妊娠 20 日目に屠殺する母動物 28 匹で構成)
(妊娠 0 日雌体重 ; 241~330g)
投与期間 : 10 日間 妊娠 6~15 日

試験方法：

検体を 5%Emulphor 水溶液に懸濁し 0 (溶媒対照群)、1、4、2、18mg/kg の投与量で動物に妊娠 6 日目の体重に基づいて妊娠 6 日目から 15 日目までの 10 日間毎日 1 回経口投与した。投与容量は 12.5mL/kg であった。

交配および妊娠 0 日：

無処理の雌 2 匹のラットを雄 (26 週齢 ; 466~751g) 1 匹と一晚同居させ交配させた。交尾の確認は、交配の翌朝に採取した膣スミアの精子検査により行った。精子が確認された日を妊娠 0 日とした。

観察・検査項目：

親動物；試験期間中、全母動物について毎日1回、外観および行動の変化などの毒性を示す明らかな一般状態の変化について観察した。

第I群の母動物の体重は妊娠0、6、8、10、12、15および16日目に測定した。第II群の母動物の体重は妊娠0、6、8、10、12、15および20日目に測定した。

摂餌量は妊娠1、6、8、12、15および20日目に測定した。

第I群については、妊娠16日目、すなわち検体または対照溶媒の最終投与の約24時間後、CO₂により屠殺し、血液および脳組織を採取して赤血球、血漿、および脳コリンエステラーゼ活性(ChE)を測定した。各母動物の腹部および胸部の内臓を検査し、また妊娠を確認し肉眼的変化を記録した。

第II群については、検体または対照物質の最終投与の5日後である妊娠20日目にCO₂により屠殺し、血液および脳組織を採取して赤血球、血漿、および脳ChEを測定した。黄体数、着床数、子宮重量、胎盤の重量、死亡胎児数、生存胎児数、性比について調べた。各母動物の腹部および胸部の内臓を詳細に検査し、肉眼的変化があれば記録した。

生存胎児；性別、体重、外表異常の観察を行った。

対照群を含む全群について1用量群20匹(1腹1匹)の胎児の脳を採取し、脳ChEを測定した。

各同腹児群の約1/2の胎児については骨格標本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：結果の概要は表 3 に示した。

1. 母動物に対する所見

臨床観察

18mg/kg 群で、流涎、流涙、振せん、眼球突出、自発運動の低下など、検体投与による毒性症状がみられた。その他の群では検体投与に関連したと考えられる所見は認められなかった。

体重

1mg/kg 群および 4.2mg/kg 群の体重増加量は試験期間を通して対照群と同程度であった。尚、4.2mg/kg 群ではすべての時点（初回投与前日の 0 日目を含む）で対照群と比較して平均体重が統計学的に有意な低値を示した。しかし、4.2mg/kg 群における妊娠 6～15 日目および 0～20 日目の平均体重増加量、20 日目の平均補正体重（最終体重－子宮重量）、および 0～20 日目の平均補正体重増加量は、対照と同程度であった。従って対照群と比較して 4.2mg/kg 群での統計学的に有意な低体重は、初期平均体重が低値であったことに起因したもので、投与の影響を反映するものではないと考えられた。18mg/kg 群については、妊娠 6～8 日（検体投与の初期段階）の平均体重に増加が見られなかった（対照群についての平均体重は同じ期間に 5.1g の増加）。さらに、妊娠 20 日目の平均体重および平均補正体重（対照よりそれぞれ 7.0% および 6.5% 低値）、妊娠 6～15 日および 0～20 日の平均体重増加量（対照よりそれぞれ 42.7% および 21.3% 低値）、ならびに 0～20 日目の平均補正体重増加量（対照より 40.2% 低値）に統計学的に有意な低下が認められた。

摂餌量

1、4.2mg/kg 群の摂餌量は、試験期間を通して対照と同程度であった。18mg/kg 群では、投与期間中は摂餌量が対照群に比べ少なく、なかでも妊娠 8 および 15 日目に統計学的に有意な低下がみられた。なお、投与終了後の妊娠 20 日目には摂餌量は対照群と同等であった。

コリンエステラーゼ (ChE) 活性 (表 1)

1) 母動物の ChE－妊娠 16 日目

血漿 ChE は、全群で統計学的にもまた毒性学的に意味のあるレベルまで阻害された。赤血球 ChE は、全群で毒性学的に意味のある阻害が認められ、18mg/kg 群については統計学的に有意でもあった。脳 ChE の阻害は、4.2mg/kg および 18mg/kg 群においてのみ統計学的にも毒性学的にも有意であった。

2) 母動物の ChE—妊娠 20 日目

血漿、血球、脳の ChE の阻害の程度に明らかな回復がみられた。

血漿 ChE の阻害は 1mg/kg と 18mg/kg で統計学的に有意であったが、4.2mg/kg では統計学的な有意差はみられなかった。18mg/kg の阻害のみが 20%以上を示し、毒性学的にも意味があるものと考えられた。

血球 ChE は全ての群で統計学的にも毒性学的にも有意な阻害が認められた。

脳 ChE の阻害は、すべての用量で統計学的に有意な阻害が認められたが、毒性学的に有意であったのは、4.2mg/kg および 18mg/kg 群であった。

(申請者注)

本試験の試験責任者は、血漿、血球、脳の ChE の阻害について、毒性学的に有意であるとした指標は、阻害率が 20%以上のものとしていた。一方、JMPR(1995 年)の評価におけるコリンエステラーゼ阻害の毒性学的指標としての考え方は以下のとおりであった。

1) 血漿 ChE 活性は毒性学的な指標としての重要性は低く、血球 ChE 及び脳 ChE の測定が同時になされている場合には、それらの値をもとに毒性評価を行う。

2) 統計学的有意差より、毒性学的有意差(生物学的有意差)が考慮されている。

- 阻害率が、脳 ChE の場合は 10%以上、赤血球 ChE の場合は 20%以上を示したときに、統計学的に有意の有無にかかわらず毒性学的(生物学的)に有意とした。

申請者は、JMPR での指標に基づき、脳、赤血球 ChE における毒性学的に有意な程度の阻害が 1mg/kg 以上で認められたため、ChE における NOAEL は 1mg/kg 以下と判断する。

3) 児動物—妊娠 20 日目の母動物から得られた児動物—の脳 ChE

対照群に比べいずれの群でも毒性学的に有意な差は認められなかった。

表 1. ChE 活性 (残存活性)

用量(mg/kg)	母動物 ; 妊娠 16 日			胎児		
	1	4.2	18	1	4.2	18
血漿 ChE	↓50.9	↓32.2	↓6.1	—	—	—
血球 ChE	↓67.5	↓63.1	↓6.6	—	—	—
脳 ChE	80.5	↓52.3	↓21.9	94.1	97.1	↓91.3
用量(mg/kg)	母動物 : 妊娠 20 日			胎児		
	1	4.2	18	1	4.2	18
血漿 ChE	↓85.9	94.4	↓74.0	—	—	—
血球 ChE	↓79.5	↓73.3	↓47.7	—	—	—
脳 ChE	↓88.3	↓64.2	↓44.0	94.1	97.1	↓91.3

↑ ↓ : p < 0.05 (Dunnett test)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示したものの。

肉眼的病理検査

妊娠 16 または 20 日目に屠殺した母動物において、検体投与に伴う明らかな肉眼的病理変化は何ら認められなかった。

繁殖パラメーター - 第Ⅱ群の母動物

受胎率、妊娠率、生存胎児を有する母動物数、黄体数、胎児数、同腹児数、着床前死胚率、着床数、および着床後死胚率は、いずれの群についても対照と同程度で、当試験所の背景対照範囲内にあった。一方、下記の表に示すように、18mg/kg 群で吸収胚の合算数、吸収胚を 2 個以上有する母動物の数、吸収胚を有する母動物の割合がわずかに増加した。更に同群では母動物あたりの平均吸収胚数の増加もみられ、これは対照群と比較して統計学的に有意でないものの、当試験所の背景データ範囲 (0.3~1.4) よりもわずかに高かったことから、この用量での明らかな母動物に対する毒性が関連している可能性が考えられた。

表 2. 吸収胚の分布

吸収胚数	母動物数			
	0mg/kg	1mg/kg	4.2mg/kg	18mg/kg
0	12	9	11	6
1	6	7	8	8
2	6	6	3	8
3	2	1	0	1
4	0	0	1	1
6	0	0	0	1
吸収胚数の合算値	24	22	18	37
2 個以上の吸収胚をもつ母動物数	8	7	4	11
吸収胚をもつ母動物%	53.8	60.9	52.2	76
吸収胚数(母動物当り)	0.9	1.0	0.8	1.5

2. 胎児に関する所見 (第Ⅱ群母動物の胎児)

胎児体重、胎盤重量、生存率、性比

いずれの用量においても、死亡胎児はなく、胎児または胎盤の重量のいずれに対しても有害な影響はなかった。各用量での胎児の性比 (雄の胎児の割合 (%) の中央値として表す) は、対照群と同等であり、当試験所の背景対照範囲内 (42.9-55.6%) にあった。

外表および内臓検査

本検体の投与に起因する外表および内臓の特異的な解剖学的変化に発生率の増加は認められなかった。

骨格検査

検体に関連すると考えられる奇形、変異、また胎児骨格の骨化遅延は認められなかった。

以上の結果より、本検体を妊娠ラットに1、4.2 および特に18 mg/kg の用量で投与したとき、母動物に対する影響として血球及び脳のコリンエステラーゼの毒性学的に有意と考えられる阻害が1.0mg/kg 以上でみられた。18mg/kg で、コリンエステラーゼの阻害によると考えられる明らかな中毒症状が認められ、摂餌量の低下、体重増加抑制がみられた。更に同群では、母動物あたりの平均吸収胚数のわずかな統計学的に有意でない増加（背景データの範囲からわずかに逸脱）がみられたが、これは母毒性に起因した変化と考えられた。

胎児については、18mg/kg まで何ら影響は認められなかった。

従って、母動物に対する無毒性量は1mg/kg/日未満であり、胎児に対する無毒性量は18mg/kg/日であった。また、検体の直接的な催奇形性作用は18mg/kg/日まで認められなかった。

表 3-1. 結果の概要

投与用量 (mg/kg/day)	0	1.0	4.2	18.0	
交配動物数 (I 群+II 群)	33	33	33	33	
受胎動物数 (I 群+II 群)	31	28	28	28	
受胎動物数 (I 群)	5	5	5	3	
受胎動物数 (II 群)	26	23	23	25	
受胎率 (I 群+II 群) f	93.9	84.8	84.8	84.8	
受胎率 (II 群) f	92.9	82.1	82.1	89.3	
生存胎児を有する動物数 (I 群+II 群)	31	28	28	28	
妊娠率 (I 群+II 群) f	100	100	100	100	
妊娠維持動物数 (第 II 群のみ)	26	23	23	25	
一般症状	-	-	-	流涎, 流涙, 振せん, 眼球突出, 活動性の低下	
死亡	0	0	0	0	
流産	0	0	0	0	
全吸収胚数	0	0	0	0	
体重 d	-	-	-(↓*試験全期間)	↓(試験最終時)	
体重増加量(g) (妊娠 6-15 日) d	33.2	35.4	33.0	↓19.0	
体重増加量(g) 妊娠 0-20 日) d	128.4	123.9	119.0	↓101.1	
補正体重増加量(g) [§]	49.3	49.6	44.7	↓29.5	
摂餌量 d	-	-	-** (試験開始日のみ↓)	↓(投与期間)	
剖検所見	-	-	-	-	
★着床所見	黄体数 (平均値)	15.3	15.4	14.7	15.1
	(中央値) kd	15.0	15.0	15.0	15.0
	着床数 (平均値)	14.4	13.6	13.1	14.0
	(中央値) kd	15.0	14.0	14.0	15.0
	着床前死胚率 (平均値)	8.2	12.3	13.0	8.3
	(中央値) kd	0.0	6.3	0.0	5.9
	着床後死胚率 (平均値)	6.5	6.6	5.5	10.5
	(中央値) kd	6.3	6.7	6.3	6.7
	同腹児数 (平均値)	13.5	12.7	12.3	12.6
	(中央値) kd	14.0	14.0	13.0	14.0
吸収胚数 (平均値)	0.9	1.0	0.8	1.5	
(中央値) kd	1.0	1.0	1.0	1.0	

I 群; 妊娠 16 日目に屠殺する母動物 5 匹で構成,

II 群; 妊娠 20 日目に屠殺する母動物 28 匹で構成

§; [補正体重(最終体重 - 子宮重量) - 開始時の体重]

*; 試験開始時において既に統計学的に有意な低値を示し、体重増加量では統計学的に有意差なし

** ; 検体を投与していない試験開始日のみ有意な低下

f: Fisher's exact test, d: Dunnett test (↓:p<0.05, ↓↓:p<0.01)

kd: Kruskal-Wallis+Dunn's test

★: 1 匹の妊娠動物あたり - : 異常なし

表 3-2. 結果の概要

投与用量 (mg/kg/day)		0	1.0	4.2	18.0	
胎児数		350	292	284	314	
死亡胎児数		0	0	0	0	
雄の割合(%) (中央値) kd		48.3	50.0	50.0	50.0	
生存胎児体重(g) (中央値) 雌雄 kd		3.8	3.8	3.9	3.8	
生存胎児体重(g) (中央値) 雄 kd		3.9	3.9	4.0	3.8	
生存胎児体重(g) (中央値) 雌 kd		3.7	3.7	3.8	3.7	
胎盤重量(g) (中央値) kd		0.55	0.55	0.57	0.53	
児動物	外表検査	検査胎児数	350	292	284	314
		奇形				
		小眼症 (両側/片側)	2	2	0	0
	異常	矮小	1	0	0	2
		検査胎児数	168	141	135	153
	内臓検査	奇形				
		脳室拡張	0	0	1	0
		腎盂/尿管拡張	0	3	4	1
	異常	膈ヘルニア	0	0	1	0
		検査胎児数	182	151	149	161
骨格検査	奇形	頸椎弓癒合	1	0	0	0
		腰椎弓欠損	1	0	0	0
		頭蓋骨縫合線癒合	0	1	0	0
		仙骨弓癒合	0	0	1	0
	変異	過剰肋骨	12	6	11	11
		液状肋骨	1	1	5	3
	骨化	仙骨弓不完全化骨	89	71	47**	73
胸骨-第三 不完全化骨		6	5	8	16*	

kd: Kruskal-Wallis+Dunn's test,

骨格検査: *:p<0.05, **:p<0.01; Chi-square test, Fisher's exact test, Pair-wise Fisher's exact test

MPP のウサギを用いた催奇形性試験

(毒性資料 No. 原体-27)

試験機関：

報告書作成年月日：

検体の純度： %

試験動物：チンチラ系ウサギ 1群妊娠雌各 20 匹(試験開始時：4~6ヶ月齢)

試験方法：検体を 2%になるように CMC*を添加した蒸留水に懸濁し、0、2、6、18mg/kg の投与用量で妊娠 6~18 日目までの 13 日間毎日 1 回強制経口投与した。

CMC*；カルボキシメチルセルロース Na 塩

検査項目：

母体；一般症状、体重、摂餌量を記録し、妊娠 28 日目に動物を頸椎脱臼により屠殺し、帝王切開により胎児を摘出した。そして、黄体数、着床数、吸収胚数(早期と後期に分類)さらに生存胎児と性別および死亡胎児について検査し、他の子宮重量、胎児の子宮内位置についても検査した。

生存胎児；体重、外表異常を記録し、骨格検査および内臓検査を行った。

試験結果：

母体の一般症状、摂餌量、増体重量については、18mg/kg/日で腹臥姿勢、呼吸困難、流涎および下痢が認められ、11 匹が死亡した。この群では摂餌量も妊娠 11~24 日に著しく減少し、増体重量の減少もみられた。

着床検査では、6mg/kg/日と 18mg/kg/日群の後期吸収胚数がわずかに増加した。胎児体重は、18mg/kg/日群で明らかに減少(21.4%)した。外表検査では 18mg/kg/日群で 1 母体由来の 2 胎児に左前肢の欠指がみられたが、自然発生的所見であり、頻度も生理的変動範囲内であった。内臓検査では 18mg/kg/日群以外の全ての群に、いくつかの症例が散見されたが、投薬に関連すると思われる所見はなく、骨格検査でも異常は認められなかった。

従って検体の 2mg/kg/日の投与では母体毒性も胎児毒性も認められなかった。6mg/kg/日では軽微な胎児毒性(後期吸収胚の増加)がみられた。18mg/kg/日では、母体に明らかな毒性が認められ、その影響により、後期吸収胚の増加と胎児体重の減少などの胎児毒性が認められたが、用いた試験条件下では催奇形性作用は認められなかった。

投与用量 mg/kg/日		0 (溶媒対照)	2	6	18	
交尾動物数		20	20	20	20	
非受精動物		2	1	4	0	
死亡動物数		0	0	0	11	
流産、全吸収胚動物数		0	0	0	4	
計(評価から除外した動物数)		2	1	4	15	
妊娠動物数		18	19	16	5	
母体	一般症状	-	-	-	腹臥, 呼吸困難, 流涎, 下痢	
	摂餌量	-	-	-	妊娠 11~24 日に 著しく減少	
	体重増加*(%)	0.7	-0.7	-1.1	↓ ^D -5.9 (妊娠 9~21 日に 減少)	
	着床	平均黄体数	10.72	11.16	13.06	14.00
		平均着床数	8.78	9.74	9.94	10.00
	所見	平均生存胎児数 雄	4.06	4.05	4.94	4.00
		雌	4.22	5.05	4.13	5.00
		雄と雌の性比(%)	48.99	44.51	54.48	44.44
		死亡胎児数	0	0	0	0
		後期吸収 (%)	↑ ^T 1.27	1.08	↑ ^F 5.66	6.00
	早期吸収 (%)	4.43	5.41	3.14	4.00	
胎児	平均体重(g) 雄	34.50	34.40	34.60	↓ ^D 25.30	
	雌	34.60	33.80	33.10	↓ ^D 28.70	
	全胎児平均体重(g)	34.60	34.10	33.90	↓ ^D 27.20	
	外表異常	-	-	-	-	
	骨格異常	-	-	-	-	
	内臓異常	-	-	-	-	

*: 投与1日目と剖検日の体重差(剖検日体重は総体重より子宮重量を差し引いた値)

↑↓: p<0.05、↓: p<0.01 統計学的有意

F: Fisher 直接確率計算法、D: Dunnett 多重比較 (ノンパラメトリック型)、T: 傾向検定

MPP のウサギを用いた催奇形性試験

(毒性資料 No. 原体-28)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：

検体の純度 : %
試験動物 : American Dutch ウサギ
 各群雌 17 匹(妊娠 0 日雌平均体重 ; 3.25kg)
投与期間 : 13 日間 妊娠 6~18 日
試験方法 :

検体を 5%Emulphor 水溶液に懸濁し 0(溶媒対照群)、1、2.75、7.5mg/kg の投与量で動物に妊娠 6 日目の体重に基づいて妊娠 6 日目から 18 日目までの 13 日間毎日 1 回経口投与した。投与容量は 3mL/kg であった。

交配：

交配は人口受精により行った。

観察・検査項目：

親動物；試験期間中、全母動物について毎日1回、外観および行動の変化などの毒性を示す明らかな一般状態の変化について観察した。

母動物の体重は妊娠0、6、8、10、14、19、21、および28日目に測定した。

摂餌量は妊娠1、6、7、12、15、19、23、および28日目に測定した。

妊娠19日目(検体の最終の投与の約24時間後)に、血漿および赤血球中コリンエステラーゼ活性を測定するために耳動脈から血液サンプルを採取した。

妊娠28日目には血漿および赤血球中コリンエステラーゼ測定のための血液サンプルを心臓穿刺によって採取した。さらに脳コリンエステラーゼ活性も測定した。各母動物の腹部および胸部の内臓を検査し、また妊娠を確認し肉眼的変化を記録し、黄体数、着床数、子宮重量、胎盤の重量、死亡胎児数、生存胎児数、性比について調べた。

生存胎児；性別、体重、外表異常、内臓の観察を行い、骨格の発達についても評価した。

試験結果：結果の概要は表3に示した。

1. 母動物に対する所見

臨床観察

2.75、7.5mg/kg で軟便を示す動物数の増加がみられた（対照群1例、1mg/kg 群2例、2.75mg/kg 群6例、7.5mg/kg 群12例）。それ以外は、いずれの投与群についても検体投与に関連した明らかな一般状態の変化は認められなかった。

体重

統計学的に有意でないが7.5mg/kg 群で増体重抑制がみられた。

摂餌量

摂餌量に投与群と対照群に差は認められなかった。

コリンエステラーゼ (ChE) 活性

1) 母動物の ChE—妊娠 19 日目

1mg/kg 群では血漿及び赤血球 ChE に毒性学的に意味のある (>20%) そして統計学的に有意な阻害は認められなかった。2.75mg/kg では、統計学的な有意差は認められないものの、赤血球 ChE 活性の毒性学的に意味のある阻害がみられた。7.5mg/kg では血漿および赤血球 ChE 活性に毒性学的に意味があり、統計学的に有意な阻害が認められた。

2) 母動物の ChE—妊娠 28 日目

1mg/kg 群では血漿、赤血球及び脳 ChE に毒性学的に意味のあるそして統計学的に有意な阻害は認められなかった。2.75、7.5mg/kg で脳 ChE 活性の毒性学的に意味のある (>20%) および統計学的に有意な阻害が認められたが、血漿および赤血球 ChE 活性に 19 日に比べ回復傾向がみられ、2.75mg/kg においては、毒性学的においても意味のある有意な阻害は認められなかった。

*JMPR(1995年)での審議において脳 ChE の場合は 10%以上の阻害がみられたときに毒性学的に有意との評価がなされた。

表 1. ChE 活性

用量(mg/kg)	妊娠 19 日			妊娠 28 日		
	1	2.75	7.5	1	2.75	7.5
血漿 ChE	95.2	84.4	↓54.3	102.7	111.9	93.5
血球 ChE	90.4	78.3	↓17.1	105.0	86.0	↓52.5
脳 ChE	—	—	—	93.5	↓79.7	↓59.8

↑ ↓ : p < 0.05 (Dunnett test)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示したものの。

肉眼的病理検査

検体投与に伴う明らかな肉眼的病理変化は何ら認められなかった。

繁殖指数

受胎率、妊娠率、生存胎児を有する妊娠母動物数、黄体数、着床数、同腹児数、または着床前後の胚損失率に統計学的有意差はなかった。一方、下記の表に示すように、7.5mg/kg 群で平均吸収胚数に統計学的に有意ではないが、わずかな増加がみられた。この値は背景データ範囲をわずかに上回り、本剤の母体に対する一般毒性が関連していることを否定できなかった。

[申請者注]

7.5mg/kg 群で、平均吸収胚数(母動物あたり)のわずかな統計学的に有意ではない増加(背景データの範囲からわずかに外れていた)がみられたが、吸収胚をもつ母動物の割合及び吸収胚率などに投与群と対照群との間に差は認められなかったことから、投与の影響とは考えられなかった。

表2. 吸収胚の分布

吸収胚数	母動物数				背景データ
	0mg/kg	1mg/kg	2.75mg/kg	7.5mg/kg	
0	10	10	11	8	—
1	6	4	4	1	
2	0	1	1	2	
3	0	1	0	1	
4	0	0	0	2	
吸収胚数の合計	6	9	6	16	
2個以上の吸収胚をもつ母動物数	0	2	1	5	0 - 4*
吸収胚をもつ母動物%	37.5	37.5	31.2	42.9	18.8 - 50.0
吸収胚数(母動物当り)	0.4	0.6	0.4	1.1	0.2 - 1.0

[申請者注]背景データ(当該試験施設の11試験)*

試験	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	範囲
A	14	15	16	12	16	17	16	16	15	14	16	12-17
B	6	4	7	10	16	8	6	9	12	9	3	3-16
C	1	0	2	3	4	3	2	2	3	3	0	0-4

A: 供試母動物数, B: 母動物毎にの吸収胚数の合計, C: 母動物中、2個以上の吸収胚をもつ母動物数

2. 胎児に関する所見

胎児体重、胎盤重量、生存率、性比

いずれの用量においても、死亡胎児はなく、胎児または胎盤の重量のいずれに対しても統計学的な有意差は認められなかったため、有害な影響とはみなさなかった。各用量での胎児の性比は、対照群と同等であり、当試験所の背景対照範囲内(雄の占める割合; 40.0-66.7%)にあった。

外表および内臓検査

本検体の投与に起因する外表および内臓の特異的な解剖学的変化に発生率の増加は認められなかった。

骨格検査

検体に関連すると考えられる奇形、変異、また胎児骨格の骨化遅延は認められなかった。尚、高用量群において中手骨未骨化の統計学的に有意な ($p \leq 0.05$) 増加が認められた。この所見は特筆すべきものとは考えられず、偶発的なものと推測される。しかし、この骨格要素の発達は、対照群と比較して高用量群では同腹児数が多いことおよび胎児体重が低いこと (いずれも統計学的な有意差なし) の結果として、発育がわずかに遅延した可能性も考えられた。

[申請者注]

中手骨未骨化増加の有無及びその他の骨化指標として、胸骨分節について、一腹単位による統計学的検査を行った。

下記に示すように、統計学的に有意差は認められなかったことから、今回認められた骨化遅延を、投与の影響とはみなさなかった。

中手骨及び胸骨分節の骨化 (一腹単位、一腹ごとの出現頻度)

用量 (mg/kg/日)	0	1.0	2.75	7.5	
母動物数	16	16	16	14	
骨化	中手骨:未骨化 (%)	6.3 ± 13.8	3.3 ± 6.3	7.2 ± 14.9	12.6 ± 18.2
	不完全骨化 (%)	3.6 ± 7.1	7.2 ± 13.2	5.6 ± 9.7	6.4 ± 12.1
	胸骨第1分節:不完全骨化 (%)	6.1 ± 8.9	4.9 ± 9.7	5.8 ± 13.9	12.9 ± 15.7
	胸骨第2分節:不完全骨化 (%)	15.3 ± 13.9	15.2 ± 19.1	16.9 ± 21.0	19.3 ± 18.9
	胸骨第3分節:不完全骨化 (%)	1.6 ± 6.3	0.0 ± 0.0	1.3 ± 3.7	0.9 ± 3.5
	胸骨第4分節:不完全骨化 (%)	5.6 ± 11.5	2.8 ± 6.8	2.9 ± 8.7	5.2 ± 13.6
	胸骨第5分節:未骨化 (%)	8.9 ± 15.5	14.1 ± 19.7	10.9 ± 19.1	15.1 ± 20.0
	不完全骨化 (%)	75.0 ± 22.5	80.0 ± 19.7	75.0 ± 22.8	81.0 ± 20.2
	胸骨第6分節:未骨化 (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.6 ± 2.1
	不完全骨化 (%)	25.1 ± 26.7	24.6 ± 20.6	18.9 ± 23.9	23.1 ± 20.5

数値は平均値±標準偏差

Bartlett 等分散検定 (危険率 5%) を行い、等分散の場合は Dunnett 検定、不等分散の場合は Steel 検定で群間比較。いずれも有意差なし (危険率 5%、両側検定)。(申請者実施)

以上の結果より、本検体を妊娠ウサギに 1、2.75、および特に 7.5mg/kg の用量で投与したとき、母動物に対する影響として脳および血球のコリンエステラーゼの毒性学的に有意と考えられる阻害が 2.75mg/kg 以上でみられた。胎児に対する影響は 7.5mg/kg まで認められなかった。

従って、母動物に対する無毒性量は 1mg/kg/日であり、胎児に対する無毒性量は 7.5mg/kg/日であった。また、検体の直接的な催奇形性作用は 7.5mg/kg/日まで認められなかった。

表 3-1. 結果の概要

投与用量 (mg/kg/day)	0	1.0	2.75	7.5
交配動物数	17	17	17	17
受胎動物数	16	16	16	14
受胎率 f	94.1	94.1	94.1	82.4
生存胎児を有する動物数	16	16	16	14
妊娠率 f	100	100	100	100
妊娠維持動物数	16	16	16	14
一般症状(軟便)	1	2	6	12
死亡	0	0	0	0
流産	0	0	0	0
全吸収胚数	0	0	0	0
最終体重(kg) d	3.45	3.41	3.38	3.26
補正体重* (kg) d	3.10	3.08	3.06	2.89
体重増加量(妊娠 6-19 日) (kg) d	0.12	0.12	0.10	0.07
体重増加量(妊娠 0-28 日) (kg) d	0.03	0.25	0.21	0.18
補正体重増加量** (kg) d	-0.10	-0.09	-0.12	-0.20
摂餌量 d	-	-	-	-
母動物 剖検所見	-	-	-	-
★黄体数(平均値)	8.6	7.4	9.0	10.1
(中央値) kd	9.0	8.0	9.0	10.0
★着床数(平均値)	7.6	7.2	7.1	9.4
(中央値) kd	7.5	7.0	7.5	9.5
★着床前死胚率(平均値)	17.3	12.3	13.0	8.3
(中央値) kd	11.8	5.0	10.6	3.6
★着床後死胚率(平均値)	5.8	10.3	8.7	12.0
(中央値) kd	3.8	0.0	0.0	3.8
★同腹児数(平均値)	7.3	6.6	6.7	8.3
(中央値) kd	6.5	6.0	7.0	8.0
★吸収胚数(平均値)	0.4	0.6	0.4	1.1
(中央値) kd	0.0	0.0	0.0	0.0

*: 補正体重(最終体重-子宮重量)

** : 補正体重- 開始時の体重

f : Fisher's exact test, d : Dunnett test (↓ : p<0.05, ↓↓ : p<0.01)

kd : Kruskal-Wallis+Dunn's test

★ : 1 匹の妊娠動物あたり - : 異常なし

表 3-2. 結果の概要

投与用量 (mg/kg/day)		0	1.0	2.75	7.5	
胎児数		116	106	107	116	
生存胎児		114	104	100	114	
死亡胎児数		2	2	7	2	
雄の割合/中央値(%) kd		50.0	50.0	50.0	52.8	
生存胎児体重 (g)雌雄 kd		35.4	35.5	35.1	32.6	
生存胎児体重 (g)雄 kd		34.3	36.1	34.8	32.6	
生存胎児体重 (g)雌 kd		36.4	34.8	34.7	32.6	
胎盤重量中央値(g) kd		5.2	5.8	4.9	4.8	
検査胎児数		114	104	100	113	
外 表	異常					
	矮小	4	1	0	9	
内 臓	奇 形	小眼球症	0	0	0	1
		臍ヘルニア	0	1	0	0
		水頭症	1	0	1	0
		心臓回転異常	1	0	0	0
		精巣位置異常	1	0	0	1
		脳室拡張	0	1	0	0
		腎欠損(片側)	0	0	1	0
骨 格	奇 形	腰椎弓欠損	0	0	0	1
		頭蓋縫合癒合	1	1	0	1
		胸骨分節癒合	1	0	0	0
		肋間軟骨癒合	1	0	0	0
		欠指症	0	2	0	0
		胸椎弓欠損	1	0	0	0
		肋骨位置異常	0	0	1	0
		腰椎弓欠損	0	0	0	1
		脊柱側弯	0	0	0	1
		変異				
骨 化	過剰肋骨	24	7**	22	21	
	波状肋骨	1	1	0	0	
	中手骨未骨化	9	4	10	23*	

kd: Kruskal-Wallis+Dunn's test,

骨格検査: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$; Chi-square test, Fisher's exact test, Pair-wise Fisher's exact test

(13) 変異原性

MPP の細菌を用いた DNA 修復試験および復帰突然変異性試験

(毒性資料 No. 原体-29)

試験機関：

報告書作成年月日：

検体の純度： %

1) Rec-assay

試験方法：枯草菌の組換え修復機構保持株(H-17)と欠損株(M-45)を用いた。この両株の-80℃保存株を融解後、小型ピペットを用いて B-II 寒天培地上に出発点が接触しないようにストリークした。検体はジメチルスルホキシドに溶解した。

直径 10mm のろ紙に検体の溶液 0.02mL を染ませ、ストリークの開始点をおおう様に置き、37℃で一夜培養後、阻止帯の長さを測定した。陰性対照として Kanamycin、陽性対照として Mitomycin C を用いた。

試験結果：次表に示す様に MPP は H-17 株と M-45 株の間に全く生育阻止の差を認めなかった。一方、陽性対照として用いた Mitomycin C では両株の間に著明な生育阻止の差を生じ、陰性対照として用いた Kanamycin では両株に同程度の生育阻止を認めた。

表：Rec-Assay 試験成績

検体	濃度		阻止域 (mm)		差 (mm)
	% (V/V)	µg/ディスク*	H-17	M-45	
対照 (DMSO)	—	—	0	0	0
MPP	1	250	0	0	0
	5	1250	0	0	0
	10	2500	0	0	0
	25	6250	0	0	0
	50	12500	0	0	0
	100	25000	0	0	0
Kanamycin	—	10	4	5	1
Mitomycin C	—	0.1	0	7	7

*比重 1.25 として申請者により再計算した。

2) 復帰変異試験

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌(5株)およびトリプトファン要求性の大腸菌を用い、PCB 500mg/kg、1回の腹腔内投与で酵素誘導したラット肝から調製した薬物代謝酵素系の存在下および非存在下で Ames らの方法により変異原性を検定した。

試験結果：次表に示す様に TA1535 株の S-9Mix 存在下において、復帰変異コロニー数の非常に弱い増加傾向が認められたので、さらに4回の反復試験を実施した。その結果、図に示す exp. 2 以外の3回の実験において、いずれも S-9Mix 存在下で TA1535 株の復帰変異コロニー数に非常に弱い増加が認められた。それ以外の株ではいずれの場合においても復帰変異コロニー数の増加は認めらなかった。

従って、本検体は S-9Mix の存在下で TA1535 株(塩基対置換型)に非常に弱い変異原性を示すと考えられる。

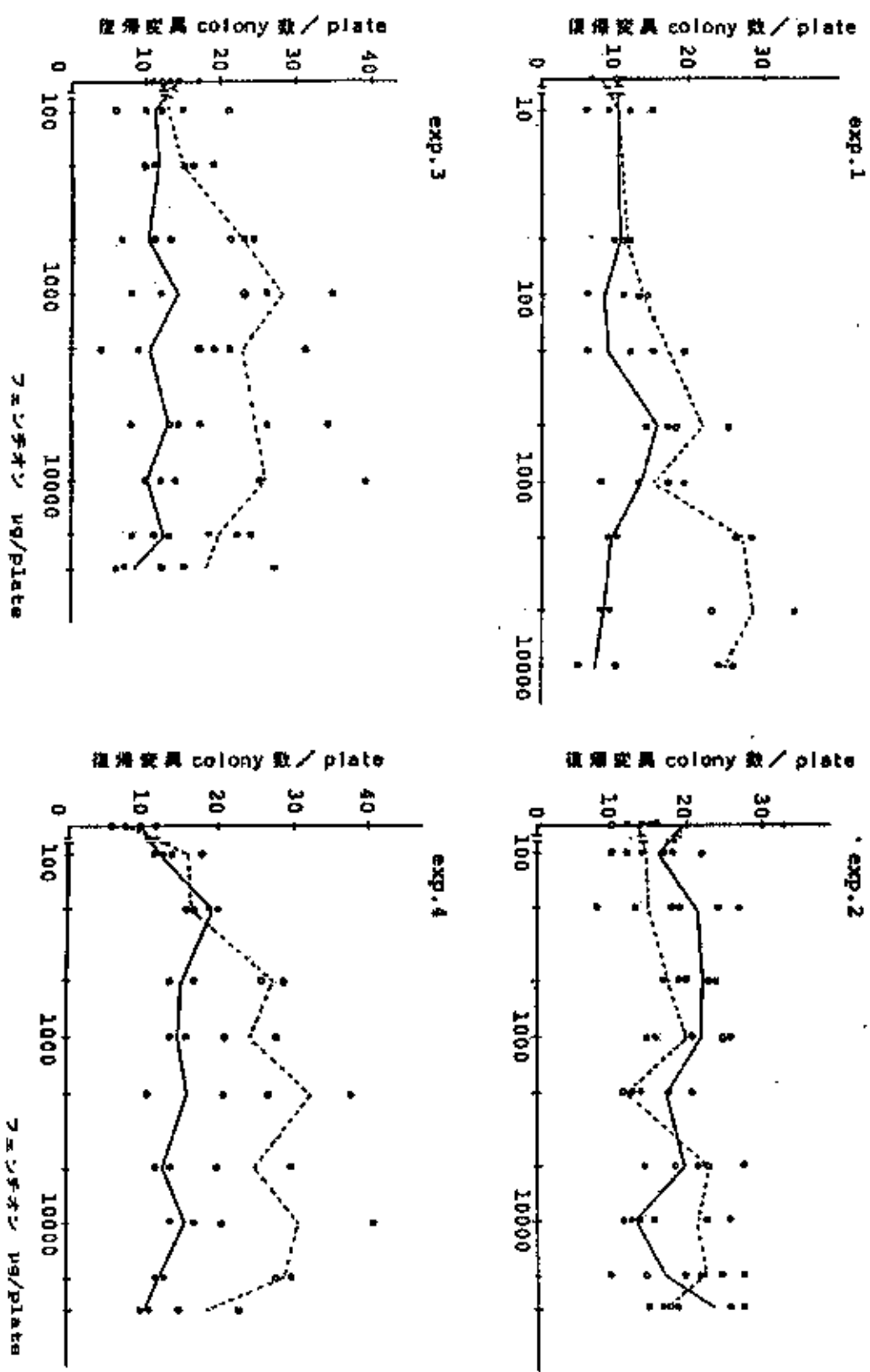
表 復帰変異試験成績

	濃度 μg/プレート	S-9Mix 有無	復帰コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			WP2hcr	TA 1535	TA 100	TA 1537	TA 1538	TA 98
対照 (DMSO)		-	13	10	118	10	8	19
			15	18	128	12	10	17
MPP	10	-	12	10	122	9	8	33
			9	12	128	9	5	17
	50	-	18	10	135	11	14	28
			12	4	112	7	5	26
	100	-	12	18	99	8	10	22
			12	10	111	5	16	26
	500	-	13	10	92	5	11	20
			17	12	112	7	13	19
	1000	-	18	11	101	4	6	28
			14	13	117	8	12	17
	5000	-	16	10	113	5	7	17
			10	13	111	10	7	18
対照 (DMSO)		+	9	11	122	7	10	25
			17	11	137	3	15	17
MPP	10	+	17	12	130	6	16	11
			8	16	122	8	10	20
	50	+	17	10	109	9	14	13
			26	12	114	6	22	16
	100	+	26	18	117	8	14	23
			12	17	110	5	11	30
	500	+	13	25	97	8	11	15
			30	25	108	6	15	21
	1000	+	12	16	108	5	15	20
			15	35	101	4	11	24
	5000	+	12	19	79	6	15	14
			18	29	80	6	13	19
2-AA	10	-	21	10	178	22	8	44
			11	10	166	25	19	29
	10	+	69	376	>3000	556	>3000	>3000
			63	384	>3000	562	>3000	>3000
陽性対照		-	a	b	c	d	e	f
			>2000	740	658	>10000	>3000	201
			>2000	752	760	>10000	>3000	174

2-AA : 2-aminoanthracene, a: AF-2 (0.25μg/プレート), b: β-propiolactone (50μg/プレート),
c: AF-2 (0.05μg/プレート), d: 9-aminoacridine (200μg/プレート), e: 2-nitrofluorene (50μg/プレート),
f: AF-2 (0.1μg/プレート)

Confidential

図 TA1538株を用いた産生菌菌数試験成績



フェンチオンはMPPの一般名である。

MPP の細菌を用いた DNA 修復試験および復帰突然変異性試験

(毒性資料 No. 原体-30)

試験機関：

報告書作成年月日：

検体の純度： %

1) Rec-assay

試験方法

枯草菌の組換え修復機構保持株 (NIG17) と欠損株 (NIG45) を用いた。枯草菌 2 株の一晚培養液を固定培地上に「八字型」にストリークし、検体を含む円形ろ紙をそのストリークの両先端を被うように置いた。このプレートを 37°C の恒温器内で一晚培養し、各ストリークの阻害の長さを測定した。Rec-assay の陽性対照には Mitomycin C を用いた。また、MPP はジメチルスルホキシドに、Mitomycin C は蒸留水に溶解した。

試験結果

次表に示す様に枯草菌の両株の生育には、本薬の 3~300µg/ディスクで阻害が認められず、Mitomycin C では両株間に生育阻止の差を生じた。

故に、本検体には DNA 損傷作用がないことが示唆された。

表：Rec-Assay 試験成績

検体	濃度 µg/ディスク	阻止域 (mm)		差 (mm)
		NIG17	NIG45	
MPP	3	0	0	0
	30	0	0	0
	300	0	0	0
Mitomycin C	0.3	1	10	9

2) 復帰変異試験

試験方法

Ames らによって開発されたネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) の 4 株、TA1535、TA1537、TA98 および TA100 を用いて復帰突然変異試験を実施した。in vitro 代謝活性化にはフェノバルビタールで処理したラットとマウスの肝から調製した薬物代謝酵素の存在下および非存在下で変異原性を検定した。

次表中に示した各菌株の陽性対照には NTG¹ と DMNA² のみ蒸留水に溶解し、他は MPP を含めジメチルスルホキシドに溶解し用いた。

試験結果

次表に示す様に、本検体は TA1535、TA1537、TA98、TA100 の 4 菌株においては代謝活性化の有無にかかわらず復帰変異コロニー数の増加は認められず変異原性は認められなかった。

¹ N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine

² dimethylnitrosoamine

表 復帰変異試験成績

	μg/プレート	S-9Mix** 有無	復帰コロニー数/プレート			
			塩基対置換型		フレームシフト型	
			TA 1535	TA 100	TA 1537	TA 98
MPP	1000	+	45	338	11	4
	10	+	18	301	15	51
	0.1	+	21	383	14	26
	1000	-	25	342	11	50
	-	+	13	476	24	26
	-	-	15	399	18	32
AF-2	0.02	-	-	>1000	-	-
NTG	10	-	>1000	-	-	-
Dexon	50	-	-	-	501	>1000
AAF	50	+	-	-	-	>1000
AAF	50	-	-	-	-	43

**ラット肝ホモジネート

表 復帰変異試験成績(マウス肝ホモジネートS-9分画)

	μg/プレート	S-9Mix** 有無	復帰コロニー数/プレート			
			塩基対置換型		フレームシフト型	
			TA 1535	TA 100	TA 1537	TA 98
MPP	1000	+	15	172	7	14
	10	+	6	184	12	17
	0.1	+	7	216	10	27
	1000	-	6	226	3	13
	-	+	5	162	5	25
	-	-	5	222	5	26
AF-2	0.02	-	-	>1000	-	-
NTG	10	-	>1000	-	-	-
Dexon	50	-	-	-	483	>1000
DMNA	1000	+	>1000	>1000	-	-
DMNA	1000	-	10	223	-	-

**ラット肝ホモジネート

AF2: Furfurylamine, NTG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine,

DMNA: dimethylnitrosamine, AAF: 2-acetylaminofluorene

MPP の細菌を用いた復帰突然変異性試験

(毒性資料 No. 原体-31)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：

検体の純度： %

試験系： 細菌 (サルモネラ菌 (TA98、TA100、TA1535、TA1537))

【試験方法】

溶媒として DMSO を用いた。

Ames 試験 (プレートインコーポレーション法)

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) の 4 株を用いた。屠殺 5 日前に Aroclor 1254 で薬物代謝系を誘導した雄ラット肝臓から調製した S9 の非存在及び存在の条件下で、Ames らの方法により変異原性を検定した。

S9-Mix 又は緩衝液 0.5mL と菌懸濁液 0.1mL、さらに検体溶液 0.1mL を試験管に加え、45℃に保ったトップアガー 2mL を試験管に加えて混合し (最大 30 秒)、最少グルコース寒天平板培地に広げた。この培地を 37℃で 48 時間培養した。生育阻害の有無を調べた後、復帰変異コロニー数を計測した。各用量とも 4 プレートを用い、試験は再現性を確認するために 2 回行った。尚、S-9mix 存在下においては、S-9 分画を 30%含む S9-Mix で 2 回、S-9 分画を 10%含む S9-Mix で 1 回 (TA98 については 2 回) 行った。

各菌株について各用量ごとの復帰変異コロニー数の平均値を算出し、溶媒対照の値と比較した。各菌株共に各用量ごとの平均復帰変異コロニー数が、溶媒対照の数の 2 倍以上で用量相関性のある増加を示した場合を、変異原性陽性と判定した。

【結果及び考察】

次表に示したように、2回の試験共に検体を用いた全用量において代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数に溶媒対照の2倍以上で、かつ用量相関性を伴った増加は認められなかった。尚、40µg/プレートを含む用量まで検体は細菌毒性影響を示さず、総細菌数は、陰性対照と同等か、又は有意ではない程度に差のある結果を一貫して示した。生育阻害も認められなかった。高用量では菌株特異的に僅かな細菌毒性影響がみられたが、5000µg/プレートを含む用量まで評価に用いることが可能であった。5000µg/プレートの用量では、被験物質の析出が起こった。

一方、陽性対照として用いた非代謝活性化条件下での NaN_3 ¹⁾、NF²⁾、4-NPDA³⁾では、溶媒対照と比較して明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、代謝活性化条件下での 2-AA⁴⁾は、試験に用いたすべての菌株に明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、検体は本試験条件下において、復帰変異誘発作用は有さないものと判断された。

- 1) : Sodium azide
- 2) : Nitrofurantoin
- 3) : 4-nitro-1,2-phenylene diamine
- 4) : 2-aminoanthracene

復帰変異試験成績 (1回目)
(表中の数値は4プレートの結果の平均値)

薬物	μg/プレート	S-9Mix** 有無	復帰コロニー数/プレート			
			塩基対置換型		フレームシフト型	
			TA 1535	TA 100	TA 1537	TA 98
対照 (DMSO)		—	5	62	7	20
検体	8	—	115	64	6	13
	40	—	97	71	5	24
	200	—	65	54	4	15
	1000	—	86	48	5	12
	5000	—	43	52	6	10
対照 (DMSO)	0	+	10	97	11	25
検体	8	+	10	82	3	22
	40	+	10	88	6	23
	200	+	11	69	6	22
	1000	+	14	80	7	24
	5000	+	14	80	5	18
陽性対照						
NaN ₃	10	+	785			
NF	0.2	+		322		
4-NPDA	10/0.5*	+			99	97
2-AA	3	—	183	560	43	531

NaN₃: Sodium azide

NF Nitrofurantoin

4-NPDA: 4-nitro-1,2-phenylene diamine(*:TA1535/10μg/プレート, 1537/0.5μg/プレート)

2-AA: 2-aminoanthracene

** : S9 分画 30V/V% (S9-Mix 中)

復帰変異試験成績 (2回目)
(表中の数値は4プレートの結果の平均値)

薬物	µg/プレート	S-9Mix** 有無	復帰コロニー数/プレート			
			塩基対置換型		フレームシフト型	
			TA 1535	TA 100	TA 1537	TA 98
対照 (DMSO)		—	11	73	10	12
検体	8	—	12	84	7	13
	40	—	10	91	8	12
	200	—	12	73	8	12
	1000	—	12	75	9	9
	5000	—	13	63	6	8
対照 (DMSO)	0	+	15	88	15	23
検体	8	+	20	90	12	20
	40	+	19	97	9	18
	200	+	18	101	11	22
	1000	+	22	80	8	23
	5000	+	21	69	6	21
陽性対照						
NaN ₃	10	+	793			
NF	0.2	+		272		
4-NPDA	10/0.5*	+			76	60
2-AA	3	—	191	660	88	575

** : S9 分画 30V/V% (S9-Mix 中)

復帰変異試験成績 (3回目)
(表中の数値は4プレートの結果の平均値)

薬物	µg/プレート	S-9Mix** 有無	復帰コロニー数/プレート				
			塩基対置換型		フレームシフト型		
			TA 1535	TA 100	TA 1537	TA 98	
対照 (DMSO)	0	+	14	97	10	23	24
検体	8	+	13	88	11	23	23
	40	+	16	102	7	25	21
	200	+	16	93	9	20	23
	1000	+	16	95	9	21	16
	5000	+	16	85	10	15	16
陽性対照							
2-AA	3	—	158	1645	460	1379	1413

NaN₃ : Sodium azide

NF Nitrofurantoin

4-NPDA : 4-nitro-1,2-phenylene diamine (* : TA1535/10µg/プレート, 1537/0.5µg/プレート)

2-AA : 2-aminoanthracene

** : S9 分画 10V/V% (S9-Mix 中)

MPP のマウスを用いた優性致死試験

(毒性資料 No. 原体-32)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：

検体の純度： %

試験動物： NMRI (HSD/WIN) 系マウス雌雄、1群雄 50 匹*、雌 600 匹

試験開始時： 雄 8~12 週齢、体重：36~48 g

雌 8~12 週齢、体重：31~33 g

試験期間： 48 日間

投与方法

検体を Lutrol (ポリエチレングリコール 400) に溶解し、0 (担体)、30 およ
び 60mg/kg の用量で雄マウスに単回経口投与した。

交配

検体あるいは担体を所定量の用量で経口投与した雄マウスを無投与の雌マウ
スと 1:1 で 4 日間同居させた。同居は投与当日を含め、4 日間の間隔で 12 期間
(12 回) 行なった。

*：高用量群については死亡例が予測されたため 60 匹とした。

評価手順

交配期間の約 14 日後に、着床前および着床後の死胚数を評価した。雌を屠殺した後、帝王切開を行った。子宮を開き、総着床数、生存および死胚数、ならびに黄体数を確認した。死胚数は、脱落膜塊ならびに死亡胚を数えて確認した。

結果の評価はノンパラメトリックな KOLMOGOROV-SMIRNOV 検定により、対照群と投与群の各パラメータ（死亡および生存胚数、総着床数、着床前死胚数）の頻度分布を比較した。

分散分析を用いて死胚数および総胚数（平方根変換）、総胚数に対する死胚数の比、ならびに黄体に基づいた着床前死胚数（角変換）を調べた。

結果

1. 雄マウスの臨床症状と死亡

検体の 30mg/kg または 60mg/kg を急性経口投与した雄において、無関心、よろめき歩行、胸を床につける横臥位、痙攣、跳躍痙攣、呼吸困難などの検体投与に起因した症状が認められた。死亡した雄は認められなかった。24 時間後には動物は正常に見えた。摂餌行動は正常であった。その後、外観および行動に影響は認められなかった。本試験においては雄マウスに死亡例は認められなかった。なお、雌 2 例（対照群と 60mg/kg の交配に用いたそれぞれ 1 例）が死亡したが、これらについては結果の評価から除外した。

2. 優性致死検査

2.1. 受精率

検体を投与した雄の受精率に影響は認められなかった。

2.2. 着床前死胚数

検体は着床前死胚数に影響を及ぼさなかった。

2.3. 着床後死胚数

受胎した雌毎の生存および死胚数の割合に基づいた着床後死胚数を調べた結果、検体投与による影響は認められなかった。

以上の結果のように、検体を 30mg/kg および 60mg/kg 体重の用量で、雄マウスに急性経口投与した後の優性致死試験では、検体を投与した雄マウスに急性的な毒性症状が認められた。動物の受精能（受精させる能力）に変化はなかった。投与により誘発された死亡例は認められなかった。

評価に関連するパラメータ（着床前死胚数、着床後死胚数、総着床数、死胚数および生存胚数）の統計的評価では、検体の有害作用として解釈できる可能性のある生物学的に重要な変動は何ら検出されなかった。

したがって、雄マウスの優性致死試験において、30mg/kg および 60mg/kg の急性経口用量では、検体に変異原性を示唆する徴候は認められなかった。

Confidential

MPP の哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験 (in vitro)

(毒性資料 No. 原体-33)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：

検体の純度： %

試験系： チャイニーズハムスター肺由来の継代培養細胞株 (CHL細胞)

投与方法：

検体調製

検体をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、陽性対照のマイトマイシン C (MMC) とシクロホスファミド (CPA) は純水に溶解した。

染色体異常試験

①直接法

直径 6cm のシャーレに CHL 細胞を 1×10^4 個/mL 接種し、培養 3 日目のシャーレから培地を除き、検体を溶解した培地を 5mL 加え、細胞を 24 および 48 時間培養した (培養終了 2 時間前にコルセミドを 0.1 μ g/mL になるように培地に加えた。)。薬液添加 24 時間および 48 時間後の細胞浮遊液をスライドグラスに滴下後、通常の空気乾燥法により染色体標本を作成した。細胞増殖抑制試験から決定した濃度は 94 μ g/mL (溶解限度, 増加率: 24 時間処理 59.9%)、47.0 μ g/mL、23.5 μ g/mL の 3 濃度であり、いずれも分裂細胞が確認された。陰性対照として、無処理対照群および溶媒対照群、陽性対照として MMC を 0.05 μ g/mL 加えた群を設けた。

②代謝活性化法

S-9 分画は SD 系ラット雄に誘導剤としてフェノバルビタールおよび 5, 6-Benzoflavone を併用した肝から調製した。

直径 6cm のシャーレに CHL 細胞を 3×10^4 個/mL 接種し、培養 2 日目にシャーレから培地を除き、検体を溶解した S-9mix/MEM 3mL を添加して 6 時間処理した。6 時間後に培地を新鮮なものに交換し 18 時間培養した (培養終了 2 時間前にコルセミドを 0.1 μ g/mL になるように培地に加えた。)。培養終了後、①と同様にして染色体標本を作成した。試験濃度は直接法と同様とした。

陰性対照として、無処理対照群および溶媒対照群、陽性対照として CPA を 10 μ g/mL 加えた群を設けた。また代謝活性化の効果を明らかにする目的で S-9mix

を含まない培地で、検体濃度および処理時間を S-9Mix 添加群と同一にした対照群を設けた。

染色体分析と判定

一枚のシャーレにつき 100 個の細胞の分裂中期像を観察し、染色体または染色文体にみられる構造的異常（ギャップ、切断、交換型異常など）および数的異常（倍数性、核内倍化）を調べた。各群 2 枚のシャーレ計 200 個の細胞を観察して異常相棒の出現率を求めた。構造的異常の出現については、ギャップを含めた場合と含めない場合について算出した。

結果の判定は、ギャップ意外の異常を有する細胞数（2 枚のシャーレの合計）につき溶媒対照群と検体処理群の間でフィッシャーの直接確率検定による有意差検定を行い、有意差のみられる検体処理群において異常を有する細胞の出現率に用量依存性または再現性がみられる場合を陽性とした。

試験結果

直接法による試験および代謝活性化法による試験共に検体の各処理群の染色体構造異常細胞の出現頻度は溶媒対照群との間にいずれも有意差は認められなかった。また倍数体の出現頻度は溶媒対照群との間にいずれも有意差は認められなかった。また倍数体の出現頻度の増加も認められなかった。一方、直接法による陽性対照 MMC 処理と代謝活性化による陽性対照 CPA 処理ではいずれも溶媒対照群との間に有意差が認められた ($p < 0.001$)。

以上の結果から、本検体は本試験条件下では代謝活性化の有無にかかわらず、染色体異常を誘発しないと考えられる。

Confidential

MPPのマウス骨髄細胞を用いた染色体異常試験 (in vivo)

(毒性資料 No. 原体-34)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年月日:

検体の純度 : %

試験系 : NMRI系マウス、1群雄各6匹*

(試験開始時: 6~10 週齢、体重 雄 40.1±3.5g)

【試験方法】

検体をポリエチレングリコール 400 に溶解し、43.8、87.5 および 175mg/kg の投与レベルで単回腹腔内投与した。なお、陰性対照群にはポリエチレングリコール 400 を、陽性対照群にはシクロホスファミドを脱イオン水に溶解させたものを同様に投与した。

屠殺に先立ち、2.5 時間前にコルセミドを腹腔内投与し、細胞の分裂を中期で停止させた。投与後 24 時間に動物を屠殺し、各動物の大腿骨から骨髄を塩化カリウム低張液を用いて採取した。遠心分離後、無水メタノール・氷酢酸混液で固定し、スライドガラス上に広げた。この標本をギムザ染色し、骨髄標本を作製した。

各標本について、200 個の中期分裂像について染色体の異常（ギャップ、切断、断片、欠失、交換、多重異常、染色体崩壊）を観察した。

*(最高用量についてはさらに 6 例を追加し、48 時間後のサンプルを採取した)

【試験結果】

1) 一般症状

175mg/kg 群について症状を観察した。その結果、死亡はみられず、症状としては自発運動の低下、腹臥位、眼瞼閉鎖、被毛粗毛、無関心が観察された。

2) 染色体異常

以下の表に結果を示す。

各群とも 6 匹のデータをもとに評価した。結論として、本試験において検体投与による染色体異常誘発作用は認められなかった。

投与群 (mg/kg)	評価時間 (投与後)	異常細胞数% ^{a)}		分裂指数% ^{b)}
		ギャップを 含む	ギャップを 含まない	
担体対照群	24	0.7	0.6	7.64
43.8mg/kg	24	0.2	0.2	4.46
87.5mg/kg	24	0.3	0.2	4.32
175mg/kg	24	0.2	0.1	5.34
175mg/kg	48	0.1	0.1	5.24
陽性対照群 シクロホスファミド 10mg/kg	24	23.2	22.6*	3.50

a): 1000個の細胞を観察 b): 5000個の細胞を観察

*: Mann-Whitneyで有意差あり (p<0.05)

表：細胞 1000 個あたりの異常所見

群	時間	GA	IGA	BR	IBR	FR	IFR	DE	MUL	EXC	DIS
担体対照群	24	1	0	6	0	0	0	0	0	0	0
43.8mg/kg	24	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0
87.5mg/kg	24	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
175mg/kg	24	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
175mg/kg	48	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
陽性対照群 シクロホスファミド 10mg/kg	24	27	1	94	6	87	1	0	105	82	5

GA：ギャップ
 IGA：同位ギャップ
 BR：切断
 IBR：同位切断
 FR：断片
 IFR：同位断片
 DE：欠失
 MUL：多重異常
 EXC：交換
 DIS：染色体崩壊

Confidential

MPPのマウスにおける小核試験

(毒性資料 No. 原体-35)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：

検体の純度 ： %

試験系 ： NMRI系マウス、 1群雄各5匹*

(試験開始時： 6～12 週齢、体重 雌 28～33g 雄 36～42g)

【試験方法】

検体をポリエチレングリコール 400 に溶解し、0、20、40、80mg/kg の投与レベルで腹腔内投与した。なお、陰性対照群にはポリエチレングリコール 400 を、陽性対照群にはシクロホスファミドを脱イオン水に溶解させたものを同様に投与した。検体投与群および陰性対照群には投与は2回行い、投与間隔は24時間とした。陽性対照群の投与回数は1回とした。いずれも最後の投与後、24時間に動物を屠殺し、各動物から大腿骨の骨髓を採取して、スライドガラス上に滴下し均一に広げ、一晚乾燥させた。この塗抹標本をギムザ染色し、メタノールで脱染色し、脱イオン水で洗浄し乾燥し、骨髓標本を作製した。

各標本について、2000個の多染性赤血球を数えると同時に、正染性赤血球の数、小核を有する多染性、正染性赤血球についても計数した。

【

* (死亡例がみられたため、40mg/kg 群については4匹追加、80mg/kg については5匹追加)

【試験結果】

1) 一般症状

20、40 および 80mg/kg を 2 回腹腔内投与した後 24 時間までに、無関心、粗毛、体重減少、腹臥、痙攣、ふるえ、高い足踏み歩行、呼吸困難、眼瞼下垂、閉眼、白色流涙および下痢が観察された。陰性対照群の動物においても無関心、粗毛、体重減少、痙攣および高い足踏み歩行などは観察された。40mg/kg および 80mg/kg 投与群の雄動物それぞれ 9 匹中 3 匹および 10 匹中 2 匹が試験期間中に死亡した。陽性対照群の動物では症状はまったくみられなかった。

2) 結果

以下の表に結果を示す。

陰性対照に比較して、小核を有する多染性赤血球数が毒性学的に意味のあるまた統計学的に有意に増加している場合には、検査は陽性であると判断した。

投与群 (mg/kg)	評価した多染性赤血球総数	2000個の多染性赤血球あたりの正染性赤血球数	小核を有する細胞数	
			2000個の正染性赤血球あたり	2000個の多染性赤血球あたり
陰性対照群	10000	2921±810	4.4±3.0	4.2±2.9
20×2回	10000	3601±1493	4.4±2.5	5.8±3.1
40×2回	10000	5199±1505	3.6±2.0	8.2±1.9
80×2回	10000	5400*±2076	4.3±0.9	8.2±1.3
陽性対照群 シクロホスファミド 20mg/kg	10000	2163±561	3.8±2.8	36.8**±16.0

Wilcoxonの順位和検定で有意差あり (*:p<0.05, **:p<0.01)

Confidential

各群とも5匹のデータをもとに評価した。その結果、小核を有する多染性赤血球の数に増加傾向(統計学的に有意性なし)がみられた。結論として、本小核試験において、本検体の弱いながら染色体異常誘発作用が認められ、この作用は非遺伝毒性的な作用によるものと推察された。

[申請者註] 検体の腹腔内投与により、小核をもつ多染性赤血球の数の増加傾向がみられており、また本試験施設の背景データ値を超えたこと、安全性サイドの点から、本試験責任者は弱い染色体異常誘発作用を否定しなかった。

しかしながら、この試験の後にマウスの骨髄細胞における *in vivo* 染色体異常試験(毒性資料 No. 原体-34)を行い、その結果は陰性であることが確認されている。また他の変異原性試験においていずれの結果も陰性であり、発がん性も認められなかった。更に、本試験成績においても、小核をもつ多染性赤血球の数の増加には統計学的な有意差は認められていない。従って、申請者は、本試験の結果は陰性と判断しても良いものとする。

(14) 生体機能影響

MPP の生体機能に及ぼす影響に関する試験

(毒性資料 No. 原体-36)

試験機関：

報告書作成年：

検体の純度：工業用原体

供試動物： 雄マウス(体重約 20g), ウサギ(体重約 2.5kg~3kg),

ウイスター系雄ラット(体重約 200g)

試験方法と結果

以下の各項目に使用した溶媒は、1) のみがオリーブ油(10mg/kg)で、2) 以降はポリエチレングリコール 400(以下 P・G と略す)0.4mL/kg を使用した。

1) 全身症状(マウス)

1 群 6 匹の雄マウスに検体を 0 (溶媒対照)、5、10、20、50、100 および 200mg/kg の割合でオリーブ油に懸濁し、1 回腹腔内投与した。そして Irwin の多元間観察法により一般症状を観察した。

検体 5mg/kg 投与では溶媒対照群と比較して変化はなかったが、10mg/kg 投与では異常症状が軽度に現れ、投与量の増加と共に認知力、運動性、正常姿勢および筋緊張の抑制が強くなった。200mg/kg では極めて強い症状が出現し、全例が死亡した。

2) 体温測定(ウサギ)

1 群 3 羽のウサギの直腸に電子体温計を 1 分間挿入し測定した。ウサギの直腸温が一定するのを確かめた後、検体を 0 (溶媒対照)、50、100、150 および 200mg/kg の割合で P・G に溶解し耳静脈投与し、30 分間隔で 6 時間測定した。

溶媒対照群と検体 150mg/kg までを注射した群では、直腸温はほとんど変化なく推移した。しかし、検体 200mg/kg の静脈注射後の直腸温は、次第に上昇し、90~120 分後で 0.5~0.9℃の上昇を示した。その後次第に下降し、5~6 時間後には元の値を示した。なお、直腸温の上昇に先んじて、躯幹の筋肉の振せん、軽度の痙攣を示した。

3) 瞳孔(ウサギ)

1群5羽のウサギに検体を0(溶媒対照)、50、100、150および200mg/kgの割合でP・Gに溶解し静脈注射後、15分、30分後、以後30分間隔で6時間後まで各動物の瞳孔径をノギスで測定し注射前の値との差を比較した。

溶媒対照群は、経時的にほとんど変化なく推移したのに対して、50mg/kg投与では軽度な縮瞳(-0.8mm)を示した。検体の縮瞳は投与量の増加に伴って強く認められ、6時間以内の最高収縮値は、100mg/kg投与で-3.0mm、150mg/kgで-3.35mm、200mg/kgで-4.0mmであった。

4) 血圧(ウサギ)

各群3~5羽のウサギを使用し、観血的血圧測定法、すなわち無麻酔下で頸部を切開し、一側の総頸動脈に動脈カニューレを挿入し、定法通りに血圧の変化を描記させた。検体はP・Gに溶解し0(溶媒対照)、100、150、200および300mg/kgを静脈注射し、その影響を約4時間にわたって観察した。

溶媒対照群と検体の100mg/kgを静脈注射した場合には、変化は全く認められなかった。150mg/kg静脈注射の場合には、約2時間以後に急速に下降し死亡した。死因は気管支分泌が増加し、喘鳴が著明となったことから呼吸閉塞によると判断した。

200mg/kg、250mg/kgおよび300mg/kg静脈注射時の血圧の変化は、約20~50分後に急速に下降して死に到った。なおこの時も気管支分泌過多による呼吸困難が著明であった。

5) 呼吸(ウサギ)

1群5羽のウサギに検体の各量(100、150、200および250mg/kg)および溶媒としてP・G(溶媒対照)を静脈注射した後、呼吸数を経時的に測定した。

溶媒対照群では呼吸数は30前後で、変化なく推移した。検体の100mg/kg投与では、呼吸数は投与後次第に増加し、3時間後に51.4となったが、その後再び減少し、5時間後には42.0となった。

150、200および250mg/kgの投与では、30分後より呼吸数は増加し、死亡直前には急激にしかも著明な呼吸数の増加を示した。

6) 心電図(ウサギ)

1 群 3~5 羽のウサギを使用し、無麻酔下で四肢の皮下に各誘導電極を埋没させ、シャープ製心電計を用いて、標準四肢誘導で第一誘導による心電図を記録した。検体の投与量は 100、150、200、250mg/kg とし、P・G に溶解したものを、耳静脈より注射を行い、投与前の心電図と投与後 1、2、3、4 および 6 時間目の心電図の変化を比較検討した。

溶媒のみの投与では心電図には何らの影響を与えないことを確かめた後本実験を行った。

100mg/kg 投与では心電図にはほとんど変化が認められなかったが、150 および 200mg/kg 投与では、ST 下降、T 波平低下、R 棘下降などの冠動脈不全症状のほか、R-R の延長または短縮が加わり、心不全を呈して死亡した。250mg/kg 投与では同様の症状が早くかつ強く出現して死亡した。

7) 腸管運動(ウサギ)

1 群 3~5 羽のウサギを用いて、Trendelenburg 生体位腸管懸垂法にしたがって、検体の腸管への影響を観察した。

P・G に溶解した検体 0 (溶媒対照)、100、150、200 および 250mg/kg をそれぞれウサギの耳静脈に注射し、キモグラフィオンに回腸の緊張と運動の変化を描記させた。

溶媒対照群または 100mg/kg を静脈注射したところ、腸管の緊張および運動にはほとんど影響をあたえなかった。

150mg/kg の投与では、静注 2~3 分後から腸管の収縮が出現しはじめ、次第に強くなった。

同様に検体 200mg/kg および 250mg/kg の静注後直ちに腸管は収縮しはじめ、漸次強くなったが、約 12 分後には一定の収縮を保った。

8) 尿排泄(ラット)

1 群 6 匹の雄ラットを 1 夜絶食させ、検体 0、25、50、100、200 および 250mg/kg を P・G に溶解し、生食水の経口投与と同時にラット背部に皮下注射した。その後 4 時間の尿を集め尿量、pH 値、Na 量、K 量を測定した。

尿量は、無処理対照群に比して、溶媒である P・G (この場合には 4.5mL/kg) の皮

下投与により明らかに増加したが、各量の検体投与群との間に、相違は認められなかった。

pHは各群とも6.0前後で相違は認められなかった。

Na量は、200mg/kgまでの投与では著明な相違はなかったが、250mg/kg投与ではやや減少した。

K量は、200mg/kgまでの投与では影響はなかったが、250mg/kg投与ではやや増加の傾向を示した。

9) 溶血(ウサギ)

Giffin-Sanford 変法により行った。すなわち、注射器に少量のヘパリン液をとり、ウサギ血液を頸静脈より採取し、遠沈管に入れ、2500rpm 5分遠沈し、上清を捨て生理食塩水で3回洗い、5%赤血球浮遊液を調製した。検体をP・Gに溶解し、1 μ g/mL、10 μ g/mL、100 μ g/mL、1mg/mL、10mg/mL、100mg/mLの検体液を調製し、これらを試験管にそれぞれ10mLとり、これに5%赤血球浮遊液の0.5mLを加え、2時間38°Cに保った後、遠沈(3000rpm 30分)し、上清を肉眼で観察した。

なお、対照として、P・Gのみに血球浮遊液を添加したものをを用いた。

各濃度の検体溶液に赤血球を添加しても、いずれの場合も、溶媒対照と同様に溶血しなかった。

10) 血液凝固(ウサギ)

検体を0(溶媒対照)、50、100、150および200mg/kgの割合でP・Gに溶解し耳静脈に投与し、30分および60分後に頸静脈より採血し、その血液を小型試験管に入れLee-White変法で血液凝固時間を測定した。

溶媒対処群と150mg/kgまでの投与群間には、30分値と60分値共に有意差を認めなかった。

200mg/kg投与群では明らかに有意差のある短縮が認められた。

11) 血中コリンエステラーゼ活性 (ChE) (ウサギ)

1 群 6 羽の雄ウサギを試験前 24 時間絶食させ、検体を P・G に溶解し、0 (溶媒対照)、50、100、150 および 200mg/kg の割合で耳静脈に投与した。総頸動脈から約 2mL の血液を 1、2、3、4、6 および 24 時間後に採取し、凝固をヘパリンで防ぎ、翌日 ChE 活性を Michel 法で測定した。

溶媒対照群では血球および血漿 ChE 値に著明な変化はなかった。

検体投与群では 50mg/kg 投与においても、血球および血漿中の ChE 活性はいずれも強く抑制されたが、24 時間後には回復の傾向を示した。100、150 および 200mg/kg と検体投与量の増加に比例して、ChE 活性低下も著明となり、24 時間以内に 150 および 200mg/kg 投与群では死亡する症例も多く認められた。

従って本検体はマウスの 10mg/kg 以上 (腹腔内投与) で全身症状、ウサギ 50mg/kg 以上 (腹腔内投与) で縮腫、ChE 活性の低下が認められたが、ウサギにおいて生体に対し重篤な中毒症状発現量 (死亡例を認めた) は 150mg/kg 以上であった。尚、本試験結果から、本検体が散布作業に伴って摂取された場合や誤って摂取された場合において、縮腫の有無は本検体の中毒を見極めるパラメータとして極めて重要であると考えられた。

「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

項目	投与経路	投与量 mg/kg	動物数/ 群	無作用量 mg/kg	作用量 mg/kg	結果の 概要
中枢神経系	マウスの一般行動 (Irwin 法)	腹腔 0, 5, 10, 20, 50, 100, 200	♂:6	5	10	抑制
	ウサギの体温 直腸温	静脈 0, 50, 100, 150, 200	♂:3	150	200	上昇
呼吸・循環系	無麻酔ウサギの 血圧	静脈 0, 100, 150, 200, 300	3~5	100	150	下降
	無麻酔ウサギの 呼吸数	静脈 0, 100, 150, 200, 250	5	—	100	増加後に減少 死亡例: 死亡直前には 浅い促迫状態となる
	無麻酔ウサギの 心電図	静脈 0, 100, 150, 200, 250	3~5	100	150	ST 下降, T 波平定化, R 棘下降, R-R 延長
自律神経系	ウサギの瞳孔径	静脈 0, 50, 100, 150, 200	5	—	50	縮瞳
消化管	無麻酔ウサギの 生体位腸管	静脈 0, 100, 150, 200, 250	3~5	100	150	腸管の収縮
腎機能	ラットの尿排泄	皮下 0, 25, 50, 100, 200, 250	♂: 6	200	250	Na ⁺ の減少と K ⁺ の増加
血液	ウサギの血球浮遊液での溶血	in vitro 0, 1, 10, 100µg/mL, 1, 10, 100mg/mL		100mg/mL	—	変化なし
	ウサギの血液凝固時間	静脈 0, 50, 100, 150, 200	5	150	200	短縮
ChE	ウサギの血漿と赤血球 ChE の阻害	静脈 0, 50, 100, 150, 200	6	—	50	血漿と赤血球 ChE の阻害

2. 代謝物
急性毒性

(毒性資料 No. 代謝物-1)

LD₅₀ 値 (mg/kg)

番号*	経口	腹腔内
II	125 ¹⁾	250 ²⁾
III	125 ¹⁾	250 ²⁾
IV	125 ¹⁾	26 ²⁾
V	50 ¹⁾	22 ²⁾
VI	30 ¹⁾	9 ²⁾
VII	6500 ³⁾	
VIII	3500 ³⁾	
IX	7000 ³⁾	

*巻末の代謝分解物一覧を参照

3. 製剤

50%乳剤

(1) 急性毒性

50%乳剤のラットを用いた急性経口毒性試験

(毒性資料 No. 製剤-1)

試験機関：

報告書作成年月日：

有効成分の含有量：MPP；50%

試験動物：ウイスター系雌雄ラット，1群雌雄各15匹

試験開始時；雄5週齢（平均体重；130g）

雌5週齢（平均体重；115g）

観察期間：14日間

【試験方法】

<検体調製>

検体原液を調製せずそのまま用いた。

<投与方法>

金属製胃ゾンデを用いて強制的に経口投与した。

<一般症状の観察及び体重の測定>

検体投与日は頻繁に、翌日からは毎日1回以上、14日間にわたって注意深く臨床観察を行った。

体重測定は、検体投与直前および14日に行った。

<剖検>

観察終了日に動物をエーテル麻酔下で放血して屠殺後、剖検してその所見を記録した。

【結果】

投与方法	経口
投与量 (mL/kg)	雄:0.15, 0.20, 0.26, 0.34, 0.44, 0.57 雌:0.30, 0.39, 0.42, 0.46, 0.51, 0.66, 0.86
LD ₅₀ 値 (mL/kg) (95%信頼限界)	雄: 0.29(0.26~0.32) 雌: 0.48(0.44~0.52)
死亡開始時間及び 終了時間	雄: 6時間から5日 雌: 24時間から4日
症状発現時間及び 消失時間	雄: 60分から6日 雌: 60分から5日
最大無作用量 (mL/kg)	雄: - 雌: -
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mL/kg)	雄: 0.15 雌: 0.30

LD₅₀ 値は雄で 0.29mL/kg、雌で 0.48mL/kg であり、性差は認められなかった。

<中毒症状>

雌雄とも投与1時間頃から全身のふるえが現れ、2時間後には紅涙、流涎、失禁、下痢等のコリンエステラーゼ活性阻害による症状が全ての用量群で認められた。

死亡例はこれらの症状が重篤となり、次第に呼吸が深くなり、時々喘ぐような様子を呈しながら死亡した。

<剖検>

死亡例について剖検した結果、胃内はガスで膨満し、腸管内は粘稠性液体が認められ、糞塊はみられなかった。また数例に腸管の点状出血が認められた。生存例について剖検したところ、検体の影響と考えられるような所見は認められなかった。

Confidential

50%乳剤のマウスを用いた急性経口毒性試験

(毒性資料 No. 製剤-2)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：

有効成分の含有量：MPP；50%

試験動物：ICR系雄雄マウス，1群雌雄各10～20匹

試験開始時；雄5週齢（20～27g）

雌5週齢（17～23g）

観察期間：14日間

<検体調製>

投与日に検体を所定量秤量し、蒸留水を加えて懸濁液を調製した。

<投与方法>

投与前日から絶食したマウスに金属製胃ゾンデを用いて強制的に経口投与した。

投与容量は体重10g当たり0.1mLとした。

<一般症状の観察及び体重の測定>

検体投与日は頻繁に、翌日からは毎日1回以上、14日間にわたって注意深く臨床観察を行った。

体重測定は、検体投与直前、投与後1、7および14日に行った。

<剖検>

観察終了日に動物をエーテル麻酔下で放血して屠殺後、剖検してその所見を記録した。

【結果】

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雄： 270, 350, 450, 590, 770, 1000 雌： 210, 270, 350, 450, 590, 770, 1000
LD ₅₀ 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	雄： 520(470~590) 雌： 490(440~550)
死亡開始時間及び 終了時間	雄： 5 時間から 5 日 雌： 5 時間から 3 日
症状発現時間及び 消失時間	雄： 8 分から 5 日 雌： 5 分から 3 日
最大無作用量 (mg/kg)	雄： — 雌： —
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄： 270 雌： 210

1. 一般観察

主な症状は鎮静、振せん、流涎、流涙、眼の白色分泌物、痙攣、挙尾、チアノーゼで重篤なものは死亡した。回復の遅かった例のほとんどは、投与1~2日目に一度症状が消失し、その後再び振せんや流涙などの症状を示した。

2. 体重

投与直後、投与7日目、14日目と死亡例について測定した。死亡例では全例に体重減少が認められ、生存例では770mg/kgの1例に一過性の増加抑制があったが、他は順調な増加を示した。

3. 剖検

生存例の剖検では、肉眼的変化は認められなかった。死亡例では、雄の1000mg/kg群の5日後死亡例に腸内容物褐色、脾の萎縮がみられた。他の例では、腺胃部出血斑、褐色の胃腸内容物が認められた。

50%乳剤のラットを用いた急性経皮毒性試験

(毒性資料 No. 製剤-3)

試験機関：

報告書作成年月日：

有効成分の含有量：MPP；50%

試験動物：ウイスター系雌雄ラット，1群雌雄各15匹

試験開始時；雄5週齢（平均体重；131g）

雌5週齢（平均体重；115g）

観察期間：14日間

【試験方法】

<検体調製>

検体原液を調製せずそのまま用いた。

<投与方法>

背部剃毛部位に検体を塗布した。塗布後24時間を経過してから、微温湯と石鹼を用いて塗布面を十分に洗い、検体を除去した。

<一般症状の観察及び体重の測定>

検体投与日は頻繁に、翌日からは毎日1回以上、14日間にわたって注意深く臨床観察を行った。

体重測定は、検体投与直前および14日に行った。

<剖検>

観察終了日に動物をエーテル麻酔下で放血して屠殺後、剖検してその所見を記録した。

【結果】

投与方法	経皮
投与量 (mL/kg)	雄: 0.89, 1.17, 1.52, 1.67, 2.31, 3.00 雌: 0.89, 1.15, 1.49, 1.67, 1.95, 2.52
LD ₅₀ 値 (mL/kg) (95%信頼限界)	雄: 1.68(1.53~1.85) 雌: 1.54(1.42~1.67)
死亡開始時間及び 終了時間	雄: 24時間から6日 雌: 24時間から10日
症状発現時間及び 消失時間	雄: 60分から7日 雌: 60分から10日
最大無作用量 (mL/kg)	雄: - 雌: -
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mL/kg)	雄: 0.89 雌: 0.89

LD50 値は雄で 1.68mL/kg、雌で 1.54mL/kg であり、性差は認められなかった。

<中毒症状>

塗布後60分頃から紅涙が認められ、その後流涎、失禁、下痢などのコリンエステラーゼ活性 (ChE) 阻害による症状がみられた。また、24時間首輪をはめているため、摂食、飲水ができず、検体の影響ともあわせて、塗布24時間後の動物は全塗布群とも衰弱していた。

<剖検>

死亡例について剖検した結果、衰弱がひどく、胃内はガスで膨満し、腸管内は黄色粘濁性液体が認められ糞塊はみられなかった。生存例について剖検したところ、検体の影響とみられるような所見は認められなかった。

急性吸入毒性

50%乳剤のラットを用いた急性吸入毒性試験

(毒性資料 No. 製剤-4)

試験成績の提出除外

本剤についての吸入毒性試験成績は、「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成12年11月24日付け12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知)の運用についての「第4 試験成績の提出の除外について」(2)③のイの規定により提出除外にあてはまる。

[除外根拠]

本剤はくん蒸剤、くん煙剤等当該農薬の成分物質を気化させて使用する農薬以外の農薬である。

このようなことから、急性吸入毒性試験の提出は不要であると判断した。