

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

2) マウスを用いた飼料混入投与による 13 週間反復経口投与毒性試験 (資料No.T-12)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1998 年

検体純度： %

供試動物：CD-1 系 (CrI:CD-1 (ICR) BR) マウス、一群雌雄各 10 匹、開始時 5~6 週齢、
開始時体重 (雄) 26.9~34.0 g、(雌) 21.7~26.6 g

投与期間：13 週間 (1997 年 9 月 16 日~12 月 16 日)

投与方法：検体を、0、450、1800 及び 7000 ppm の濃度で飼料に混入し、約 13 週間にわたって随時
摂食させた。検体を混入した飼料は週 1 回調製し、10 日以内 (給餌期間は 7 日間) に
投与を終えた。なお、検体混入飼料には、落花生油 (1 w/w%) を添加した。又、対照
飼料は、検体を除いた以外は、投与飼料と同様に調製した。

用量設定根拠；

観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡率；1 日 2 回 (週末及び休日には 1 回)、全ての動物について、臨床症状並び
に瀕死及び死亡の有無について観察を実施した。

検体投与による一般状態の変化及び死亡例は認められなかった。血液採取中あるいは採
取後に 3 匹のマウスが死亡したが、生存率に対する検体投与の影響はないものと考えら
れた。

体重変化；全ての動物について毎週 1 回、体重を測定した。

いずれの試験群においても投与による有意な影響はなかった。

摂餌量；全動物の摂餌量を週1回測定した。

各群について1日平均摂餌量/動物、平均摂餌量/日、累積摂餌量/動物及び1日平均摂餌量 (g/kg/日) 等を算出した。

雌雄の各群とも、摂餌量に有意な影響はなかった。

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は以下のとおりであった。

投与量 (ppm)		450	1800	7000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	81	313	1304
	雌	135	539	2257

血液学的検査；投与12週に、各群雌雄10匹を対象として、ジエチルエーテルで麻酔した非絶食動物の眼窩静脈叢から血液(抗凝固剤:EDTA)を採取し、以下の項目の測定を行った。

白血球分画、赤血球形態、赤血球数(RBC)、血色素量(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、白血球数(WBC)、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)

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

項目	検査 時期 (週)	投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		450	1800	7000	450	1800	7000
RBC ¹⁾	12	101	97	↓93	98	96	95
Hb ¹⁾	12	100	96	↓94	↓95	↓91	↓92
HCT ¹⁾	12	102	96	95	96	↓90	↓93
MCV ¹⁾	12	101	99	101	98	↓94	98
MCH ¹⁾	12	99	100	101	98	↓95	98
白血球分画							
リンパ球 ²⁾	12	94	↓88	↓89	98	105	↑111
多形核好中球 ²⁾	12	↑136	↑174	↑167	108	86	↓64

1) Dunnettの検定：↑↓ P≤0.05、↑↓ P≤0.01

2) Mann-WhitneyのU検定：↑↓ P≤0.05、↑↓ P≤0.01

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したものの。

7000及び1800ppmでは、雌雄ともに赤血球数、血色素量及びヘマトクリット値に低値の傾向(一部は有意)が認められ、検体に関連した影響を示していると思われた。7000及び1800ppmの雄のリンパ球が有意に低く、多形核好中球(SEGM)が高値を示したが、用量依存性はなかった。7000ppmの雌では、リンパ球が有意に高く、多形核好中

球は低値を示した。リンパ球及び多形核好中球の変化は雌雄で逆の変動であること、並びに正常値の範囲（3s 範囲）内であることから検体投与との関連性はないと判断された。

450 ppm で、各検査項目において軽度若しくは有意差が認められた値が僅かにみられたが正常値の範囲（3s 範囲）内であり、検体に関連した影響とは考えられなかった。

臨床化学的検査；投与 13 週に、各群雌雄 10 匹を対象として、ジエチルエーテルで麻酔した非絶食動物の眼窩静脈叢から血液（抗凝固剤：ヘパリン）を採取し、以下の項目の測定を行った。

アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、ア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（AST）、アルブミン、総ビリルビン（T.Bil）、コレステロール（Chol）、クレアチニン（Cre）、総蛋白質、尿素（Ure）

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

項目	検査 時期 (週)	投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		450	1800	7000	450	1800	7000
AST ¹⁾	13	91	↓77	↓68	99	↓77	↓56
ALT ¹⁾	13	↓73	↓43	↓28	↓56	↓33	↓22
T.Bil ²⁾	13	83	92	83	95	↓80	100
総蛋白質 ³⁾	13	104	103	104	101	105	↑105
アルブミン ³⁾	13	99	101	102	101	↑108	↑108

1) Welch の t 検定：↑↓ P ≤ 0.05、↑↓ P ≤ 0.01

2) Mann-Whitney の U 検定：↑↓ P ≤ 0.05、↑↓ P ≤ 0.01

3) Dunnett の検定：↑↓ P ≤ 0.05、↑↓ P ≤ 0.01

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

AST の血漿中の活性は、雌雄ともに 1800 及び 7000 ppm で、ALT は全投与群で有意に減少し、総蛋白質及びアルブミン濃度は、1800 あるいは 7000 ppm の雌のみで軽度に増加した。これらの結果及び後述する肝臓の絶対重量並びに相対重量の統計学的に有意な上昇から、全ての投与群において肝臓への影響が疑われた。

臓器重量；試験終了時の全生存動物を対象として以下の臓器重量（絶対重量）を測定し、体重 100 g 当たりの対体重比（相対重量）も算出した。

脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓（両側）、副腎（両側）及び精巣（両側）

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

項目	検査 時期 (週)	投与量 (ppm)						
		雄			雌			
		450	1800	7000	450	1800	7000	
体重 (g)	13	37	35	38	30	32	31	
腎臓	重量 (mg)	13	108	100	↑114	95	104	97
	対体重比		108	105	↑113	103	106	103
肝臓	重量 (mg)	13	↑114	↑117	↑147	101	↑119	↑135
	対体重比		↑114	↑123	↑145	↑110	↑121	↑144

Dunnett の検定 : ↑↓ P ≤ 0.05, ↑↑ P ≤ 0.01

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

対体重比 : mg/100g 体重

全ての投与群において雌雄の絶対及び相対肝重量が用量依存的に増加した。相対肝重量の増加は 450 ppm では 14% (雄) 及び 10% (雌) と軽度であったが、7000 ppm の雄 (45%) 及び雌 (44%) では顕著であった。

7000 ppm の雄では、絶対及び相対腎重量が有意に増加した (相対重量差 : 13%) が、腎臓重量の有意な増加に対応する病理学的な変化はなかった。したがって、検体が腎毒性を有するとは考えられなかった。

肉眼的病理検査 ; 試験終了時の全生存動物について剖検を行った。

いずれの用量の雌雄においても検体の投与に起因する肉眼所見はなかった。

病理組織学的検査 ; 13 週間投与した動物を対象として、以下の組織について病理標本を作製し、ヘマラム・エオジン (H&E) 染色を施した後検鏡した。又、全動物のホルマリン固定をした肝臓から凍結切片を作製し、オイル赤 O (ORO) 染色した。

全投与群 : 肺、肝臓、胆嚢、腎臓、肉眼所見

対照及び高用量投与群 : 気管、食道、膀胱、精巣、精巣上体、膈、子宮、卵巣、
甲状腺、上皮小体、副腎、脾臓

認められた主要な病理組織学的所見を次表に示す。

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	450	1800	7000	0	450	1800	7000
	臓器	検査対象動物数	10	10	10	10	10	10	10	10
13 週 間 投 与 終 了 時	肝臓	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10
		(小葉中心性) 肝細胞肥大	0	0	0	↑6	0	0	0	0
		細胞質変化	0	0	0	↑6	0	0	0	0
		クッパー細胞増殖巣	0	1	4	2	2	1	3	1
		単核球浸潤	0	1	1	0	0	0	0	0
		グリコーゲン含有量減少	0	1	0	0	0	0	0	0
		水腫性変性	0	0	0	0	0	0	0	1
		うっ血	0	1	0	0	0	1	0	0
	肝臓 (ORO) *	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10
	小葉中心性脂肪化	4	8	8	6	7	10	8	8	

* 凍結切片をオイル赤O染色した。

表中の数字は所見を有する動物数を示す。

Fisher 検定: ↑↓ P ≤ 0.05 (申請者実施)

検体投与に関連したと考えられる病理組織学的病変は、7000 ppm 群の肝臓においてのみ認められた。以下に、肝臓に認められた病理学的変化の特徴を示す。

肝臓: 7000 ppm の雄の 10 例中 6 例に、小葉中心性肝細胞肥大及び肝細胞の細胞質変化が観察された。肝細胞肥大の程度は、軽微もしくは軽度と判断された。同群の雌の 1 例 (74 番) に 1 個あるいは小集団の肝細胞に軽度な水腫性変性がみられ、影響を受けた肝細胞は明らかに腫張していた。核は濃縮しており、多くが細胞辺縁に位置していた。細胞質は淡く空胞化がみられた。まれに、肝細胞の細胞質に網目状構造や取り込まれた赤血球がみられた。

以上の結果から、検体のマウスに対する飼料混入投与による 13 週間反復経口投与毒性試験における影響として、1800 ppm 以上の群の雌雄で赤血球、血色素量及びヘマトクリット値の低下、ALT、AST の低下、肝臓絶対及び相対重量の増加、同群雌の総蛋白質及びアルブミンの増加、7000 ppm 雄の肝臓小葉中心性肝細胞肥大及び変性が認められ、肝臓が標的器官と考えられた。本試験は 18 ヶ月間の発がん性試験の用量設定根拠となりうると判断された^{申請者註1}。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

3-1) ビーグル犬を用いた飼料混入投与による 90 日間反復経口投与毒性試験 (資料 No.T-13)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2001 年

検体純度： %
%
%

供試動物：純系ビーグル犬、一群雌雄各 4 匹、開始時 6 ヶ月齢未満、
開始時体重 (雄) 5347~9179 g、(雌) 5843~9568 g

投与期間：約 90 日間 (実験開始日 1999 年 4 月 8 日、最終屠殺日 1999 年 7 月 12 日の週)

投与方法：検体をアセトンに溶解し、コーン油 (飼料の 1%w/w) とともに、0、100、800 及び 2500 ppm (9 日後に 3000 ppm から変更) の濃度で飼料に混入し、少なくとも 90 日間にわたって随時摂食させた。対照飼料 (コーン油を含む) は、検体を含まないことを除き、処理飼料と同様に調製した。混合飼料は週 1 回調製した。

用量設定根拠；

観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡率；少なくとも 1 日 1 回、瀕死状態及び死亡について観察し、異常な所見のみを記録した。週 1 回、全動物を対象に毒性の臨床徴候に関する詳細な一般状態検査を行った。

検体投与に起因する臨床徴候又は観察所見は認められなかった。また、全動物が計画屠殺時まで生存した。

体重変化；全ての動物について週 1 回体重を測定した。

測定結果を次表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

項目	検査時期 (日)	投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		100	800	2500*	100	800	2500*
平均体重 (g)	0	94	105	108	109	100	101
	91	90	92	92	116	89	87

* 投与 9 日以降 3000 ppm から濃度を減じた。

Student の t-検定 : $\uparrow\downarrow$ $P \leq 0.05$

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

800 及び 2500 ppm 群の雌で対照群と比較して有意ではないが、検体投与に関連すると考えられる体重減少あるいは増加抑制が認められた。その他の群では、対照群と大差なかった。

摂餌量 ; 全動物の摂餌量を毎日測定した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた測定日の結果を下表に示す。

項目	検査時期 (日)	投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		100	800	2500*	100	800	2500*
平均摂餌量 (g/匹/日)	1			↓33			↓25
	2			↓47		↓60	↓40
	3			↓38			↓30
	4				↑140		↓60
	5		↑186		↑151		
	6			↓47			↓31
	7						↓48
	9	↑169	↑162				
	12				↑155		
	17				↑177		
	21			↑175			
	22		↓38				
	23	↑147		↑143			
	24				↑147		
28				↑152			

* 投与 9 日以降 3000 ppm から濃度を減じた。

Student の t-検定 : $\uparrow\downarrow$ $P \leq 0.05$

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

(つづき)

項目	検査時期 (日)	投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		100	800	2500*	100	800	2500*
平均摂取量 (g/匹/日)	49						↓66
	58				↑259		
	62	↓35					
	63						↓70
	66				↑128		
	89		↑177	↑184			
	91				↑296		
	92					↓56	↓47
	94				↑169		

* 投与9日以降 3000 ppm から濃度を減じた。

Student の t-検定 : ↑↓ P ≤ 0.05

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

800 及び 2500 ppm 群の雌で対照群と比較し、検体投与に関連すると考えられる摂取量の減少が認められた^{申請者註1}。

その他の群では、測定時期により増減が認められたが、概して対照群と大差なかった。

検体摂取量；投与期間中の平均検体（有効成分）摂取量は以下のとおりであった。

投与量 (ppm)		100	800	2500*
検体（有効成分）摂取量 (mg/kg/日)	雄	3.0	24.8	76.0
	雌	3.0	24.2	75.0

* 投与開始9日後から 3000 ppm から濃度を減じた。

血液学的検査；投与前、投与後 1、2 ヶ月目及び 3 ヶ月目の試験終了時に、全動物を対象として一晩絶食後に橈側又は頸静脈穿刺によって血液を採取し、以下の項目の測定を行った。

赤血球数、ハイツ小体、ヘマトクリット値 (Ht)、血色素量 (Hb)、白血球数、白血球分画、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、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、網赤血球数、血球形態、赤血球分布幅 (RDW)、ヘモグロビン分布幅 (HDW)

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目及び/又は検体投与による影響と判断された項目の変化を次表に示す。

検査項目	検査時期 (日)	投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		100	800	2500*	100	800	2500*
赤血球数	-2						
	62	↑113					
Hb	-2						
	29						↓90
Ht	-2						(94)
	29						↓89
HDW	-2						
	62	↑108	↑105	↑114			
	91		↑105	↑111			
APTT	-2	97	100	102			
	29	↓89	↓91	↓90			
	91	↓92	↓91	↓89			↓89
血小板数	-2						
	62				↑149	↑147	↑162
	91				↑155	↑154	↑165
白血球分画 単球	-2						
	62	↓75		↓70			

* 投与9日以降 3000 ppm から濃度を減じた。

Student の t-検定 : ↑↓ P ≤ 0.05

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

括弧内は参考値

2500 ppm 雌において血色素量及びヘマトクリット値の統計学的低値を特徴とする軽度な貧血が 29 日目に観察された。その後貧血が持続しなかったことから適応反応が起きたものと考えられる。

2500 ppm 雌雄の活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) に統計学的に有意な短縮がみられ、検体投与に起因すると考えられた。100 及び 800 ppm の雄においても APTT の統計学的低下が認められたが、対照群及び投与群のデータは投与前の値と同等で、APTT の持続的な低値を示したのは 2500 ppm のみであった^{申請者註2}。

血液生化学的検査及び特殊生化学検査 (肝酵素分析) 及びその他肝酵素分析; 投与前、投与後 1、2 カ月目及び 3 カ月目の試験終了時に、全動物を対象として機側又は頸静脈穿刺によって血液を採取し、以下の項目の測定を行った。又、肝酵素 (*) については剖検時に肝臓サンプルを採取して測定を行った。

血液生化学的検査：

アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルブミン、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 (AST)、総ビリルビン (T.Bil)、胆汁酸、尿素窒素 (UN)、カルシウム、塩素、総コレステロール (Chol)、クレアチニン (Cre)、クレアチンキナーゼ (CK)、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT)、グロブリン (Glob)、グルコース (Glu)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、リン、カリウム、総蛋白質、ナトリウム、トリグリセリド (TG)、尿酸、サイロキシシン (T_4)、トリヨードサイロニン (T_3)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)

* 特殊生化学検査 (肝酵素分析)：

チトクローム P450 (P450)、N-デメチラーゼ (N-DEM)、O-デメチラーゼ (O-DEM)、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ (UDP-GL)

* その他肝酵素分析：

7-エトキシマリンジエチラーゼ (ECOD)、7-エトキシレゾルフィンジエチラーゼ (EROD)、アルドリンエポキシダーゼ (ALD)、エポキサイドヒドラーゼ (EH)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GS-T)、UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ (GLU-T)

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目及び/又は検体投与によると判断された項目の変化を下表に示す。

血液生化学検査結果

検査項目	検査時期 (日)	投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		100	800	2500*	100	800	2500*
Cre	-2						
	29	(83)	↓67	↓50		(83)	↓50
	62	(83)	(83)	↓50		(86)	↓57
	91	(86)	↓71	↓43		(86)	↓57
尿酸	-2				(100)	(100)	(50)
	62				↓50	↓50	↓50
Chol	-2			↓80			
	29		↓78	↓71			
	62		↓81	↓63			↓75
	91			↓70			

* 投与9日以降 3000 ppm から濃度を減じた。

Dunnett の検定：↑↓ $P \leq 0.05$

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

括弧内は参考値。

血液生化学検査結果 (つづき)

検査項目	検査時期 (日)	投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		100	800	2500*	100	800	2500*
GGT	-2						
	29		↑200				
	62	↑150	↑200			↑167	↑200
	91		↑200				
ALP	-2						
	62		↑204	(198)		(170)	↑240
	91		(275)	↑309		(248)	↑341
総蛋白質	-2						
	29					↓93	↓84
	62						↓90
	91						↓87
アルブミン	-2						
	29			↓87		↓92	↓82
	62			↓92			↓85
	91		↓92	↓84			↓85
ナトリウム	-2						
	29						↓99
カリウム	-2						
	62					↑109	↑109
	91	↓88					
リン	-2						
	62		↓89				
カルシウム	-2						
	29					↓93	
	62			↓93		↓95	↓91
	91			↓95			
T ₃	-2						
	29			(75)		↓71	↓71
	62			(78)		(100)	(75)
	91			(75)			(75)

* 投与9日以降 3000 ppm から濃度を減じた。

Dunnett の検定 : ↑↓ P ≤ 0.05, ↑↑ P ≤ 0.01

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

括弧内は参考値。

800 ppm 以上の投与群の雌雄で、ALP の増加及びアルブミンの減少、雌で総蛋白質の減少、2500 ppm 群の雄で総蛋白質の減少を認めた。又、800 ppm 以上の投与群の雌及び 2500 ppm の雄で、カルシウムの減少、投与 29 日における T₃ 値の低下を認めた。さらに、800 ppm の雄及び 2500 ppm の雌雄で、コレステロール値の低値が認められ、検体投与の影響と考えられた。なお、ALP の変化は検体よりもたらされた肝臓変化の二次的影響であること、T₃ 値の低下は 62 日目に対照群と同等のレベルになったことから、検体の連続投

と期間中に生理的代償作用が生じたことを示唆すると考えられた。

又、800 ppm 以上の投与群の雌及び全投与群の雄のクレアチニン値に持続的な低値が認められたが、一般にクレアチニン値は増加することのみが重要とされているため、これらの変化の臨床病理学的意義は疑わしいと考えられた^{申請者註3}。

特殊生化学検査（肝酵素分析）及びその他酵素分析結果

検査項目	検査 時期 (日)	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		0	100	800	2500*	0	100	800	2500*
O-DEM (nM/mi/mgpr)	95	0.13	↑0.23	↑0.36	↑0.45	0.23	0.25	↑0.35	↑0.39
P450 (nM/mgpr)	95	0.29	↑0.79	↑0.91	↑0.85	0.33	↑0.87	↑1.25	↑1.14
UDP-GT (nM/mi/mgpr)	95	19.72	17.88	21.19	22.97	17.37	20.58	↑23.74	↑23.84
ECOD (nM/g・min)	95	16.3	↑45.2	↑93.6	↑72.0	20.3	↑45.5	↑113.6	↑153.8
ALD (nM/g・min)	95	7.9	11.9	↑21.1	↑17.4	7.7	↑14.2	↑29.2	↑36.1
EH (nM/g・min)	95	1602	1711	↑2923	↑2683	1143	1709	↑3114	↑3911
GS-T (μM/g・min)	95	59	64	63	54	48	↑68	↑68	↑66
GLU-T (nM/g・min)	95	1880	1860	2893	2663	1601	2245	↑3003	↑4218

* 投与9日以降 3000 ppm から濃度を減じた。
Student の t-検定：↑↓ P ≤ 0.05、↑↓ P ≤ 0.01

肝酵素分析において、O-デメチラーゼは 800 及び 2500 ppm の雌雄で高値を示し、雄では 100 ppm でも高値を示した。チトクローム P450 は全投与群の雌雄で高値を示した。さらに、800 ppm 以上の雌で、UDP-GT の高値を示した。これらは、検体投与の影響と判断されたが、100 ppm での O-デメチラーゼ（雄）及びチトクローム P450（雌雄）の有意な増加については背景値*の範囲を逸脱していない、あるいは、病理組織学的変化に伴うものではなかったため、検体投与による毒性影響とは考えられなかった。

*肝酵素背景値範囲 (1992~1996)

		-2SD~+2SD	
		雄	雌
O-DEM (nM/mi/mgpr)	亜急性 (9 試験)	0.11~0.34	0.09~0.38
	慢性 (9 試験)	0.00~0.37	0.10~0.41
P450 (nM/mgpr)	亜急性 (9 試験)	0.00~0.44	0.00~0.80
	慢性 (9 試験)	0.00~0.63	0.00~0.95

肝臓試料の代謝酵素については、800 及び 2500 ppm 雌雄の ECOD、ALD 及び EH が有意に増加した。又、800 及び 2500 ppm 雌の GS-T 及び GLU-T が有意に増加した。これらは、検体投与の影響と判断されたが、100 ppm での ECOD (雌雄) 及び ALD (雌) 及び GS-T (雌) の有意な増加は病理組織学的変化を伴うものではなかったため検体投与による毒性影響とは考えられなかった。

尿検査；血液学的検査と同時期に採取した尿について以下の項目の測定を行った。

外観、比重、蛋白、ケトン体、ウロビリノーゲン (Urob)、亜硝酸塩、沈渣、pH、グルコース (Glu)、潜血、ビリルビン (Bil)、白血球、カルシウム、リン

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

検査項目	検査時期 (日)	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		0	100	800	2500*	0	100	800	2500*
ケトン体 (mg/dL)	-3	(4)		(1)	(3)				
	61	(5)		↓0	↓1				
潜血	-3					(0.0)		(1.3)	
	28					(1.0)		↓0.0	

* 投与 9 日以降 3000 ppm から濃度を減じた。

Student の t-検定：↑↓ P ≤ 0.05

括弧内は参考値。

ケトン体及び潜血に有意な変化が認められたが、これらの変化は軽微、投与前から同じ傾向があるかあるいは用量依存性がないなどの理由から、検体投与に関連した影響とは考えられなかった。

眼科学的検査；投与開始前及び終了前に、全動物を対象に検査を行った。検査は、ペンライトあるいは透光装置を用いた結膜及び瞳孔反射検査を行った。散瞳剤で散瞳させた後、角膜、虹彩、眼房水及び水晶体の検査をスリットランプ顕微鏡を用いて検査した。又、倒像検査眼鏡及び集光レンズを用いて硝子体液、網膜、脈絡膜、視神経乳頭の検査を行い、更に、眼底検査、前眼部の圧力及び流体力学的状態を測定するために眼圧並びに角膜の異常を評価するために角膜厚測定が含まれた。

眼科学的検査、眼圧及び角膜厚の各パラメータに、検体投与の影響はみられなかった。

神経学的検査；投与開始前及び終了前に、全ての動物について精神状態／行動、歩行の特徴、姿勢及び姿勢反応に関する神経学的検査並びに脊髄反射及び脳神経反射検査を行った。さらに、心臓及び肺に関する胸部聴診も実施し、デジタル温度計を用いて直腸温を測定した。以下の項目の検査を行った。

心理的状态／行動：覚醒、自発運動、驚愕反射、聴覚反応、すくみ／恐怖、攻撃性

姿勢：立ち上がり、振戦、線維束性収縮、開脚姿勢、扁平足、頭の位置、尾の位置、背の位置、頭部傾斜

歩行：失調性、ナックリング、旋回、硬直性／棒状、推尺過大、推尺過少、歩幅、脚幅、固有位置感覚

反応姿勢：片側跳び直り、片側歩行、片側立ち、手押し車歩行（前進、後進）、位置視覚、触覚性踏み直り、脚の撤去反応

脊髄／脳神経反射：膝蓋腱反射、二頭筋反射、三頭筋反射（いずれも UMN：上部運動神経症、軽度興奮性、LMN：下部運動神経症、軽度抑制性）、腓腹筋反射、瞳孔反射（直接、間接）、会陰反射

記述／解説

その他：ラッセル音、直腸温、心雑音

神経学的検査項目及び直腸温に、検体投与の影響は認められなかった。

心電図及び血圧評価；検体投与前及び終了直前に各1回、全動物を対象として、心電図検査（P波、QRS群及びT波の第2誘導心電図測定）を行った。又、検体投与前及び試験期間終了直前に各1回、心収縮期、心拡張期、平均動脈圧及び心拍数の測定を行った。

心電図検査において対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

検査項目	検査時期	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		0	100	800	2500*	0	100	800	2500*
P 波振幅 (mV)	投与前	0.15	↑0.17	↑0.19	0.15	0.19	0.17	0.15	0.16
	終了前	0.16	0.16	0.22	0.20	0.21	0.20	0.17	↓0.13
P 時間 (ms)	投与前	41.6	42.6	↑47.4	41.0	47.1	↓42.0	↓41.1	45.2
	終了前	45.0	44.1	44.3	42.4	44.4	44.5	41.5	45.7
P-R 間隔 (ms)	投与前	89.9	95.6	91.5	89.3	98.2	92.8	92.5	103.9
	終了前	100.9	97.0	↓90.7	↓88.9	104.8	↓93.6	99.1	↑116.3
R 波振幅 (mV)	投与前	1.37	1.15	1.44	1.27	1.71	↓1.33	1.60	↓1.34
	終了前	1.82	↓1.55	1.91	1.71	2.13	↓1.57	1.93	↓1.60
QT 間隔 (ms)	投与前	175.1	174.5	173.4	168.0	169.0	↑178.9	↑178.8	↑188.5
	終了前	183.7	190.4	187.8	186.7	197.8	187.5	184.7	188.7

* 投与9日以降 3000 ppm から濃度を減じた。

Fisher の最小有意差検定：↑↓ P ≤ 0.05

心電図あるいは血圧項目に、検体投与の影響は認められなかった。

波形で異常を確認したが、電氣的干渉がしばしば現れた以外に異常は認められなかった。

又、本試験で得られた心電図あるいは血圧項目のデータは、イヌで予想される値の範囲から逸脱はなかった。申請者註4

臓器重量；試験終了時に全動物を対象として以下の臓器重量を測定し、剖検直前に測定した体重に対する対体重比も算出した。

副腎、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、下垂体、胸腺、甲状腺及び上皮小体

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目及び／又は検体投与による影響が認められた項目を下表に示す。

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		100	800	2500*	100	800	2500*
体重 (g)		90	93	94	114	88	87
腎臓	重量 (mg)			(113)		(102)	(102)
	対体重比 (mg/100g 体重)			(120)		↑117	↑118
肝臓	重量 (mg)		(116)	↑138		(107)	(112)
	対体重比 (mg/100g 体重)	(112)	↑124	↑148		(125)	↑132
下垂体	重量 (mg)				↑126	↑120	↑140
	対体重比 (mg/100g 体重)				(120)	↑140	↑160

* 投与9日以降 3000 ppm から濃度を減じた。Student の t-検定：↑↓ P ≤ 0.05

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。括弧内は参考値。

800 ppm 以上の投与群の雌雄において対照群と比して絶対及び相対肝重量の統計学的に有意な増加あるいは増加傾向が認められ、後述の病理学的及び病理組織学的変化を反映しており、検体投与の影響と考えられた。

腎臓重量には雄の検体投与群には統計学的に有意な変化はなかったが、検体投与による影響を示唆する腎臓の相対重量の高値傾向が 2500 ppm の雄に認められ、これは病理組織学的検査で見られた所見に対応する変化と判断された。^{申請者註 5}

100 ppm 以上の投与群雌の下垂体の絶対重量及び 800 ppm 以上の群の相対重量が有意な高値を示した。100 ppm の下垂体の絶対重量の統計学的に有意な変化は相対重量の変化を伴わなかったため偶発性変化であると判断した。さらに、800 ppm 以上の投与群における下垂体の重量増加についても、関連する形態学的変化がなかったこと、下垂体への生物学的に有意な影響を示す臨床病理学的項目 (T₃、T₄、TSH) においても毒性学的変化が認められなかったこと、並びに雌の体重が 800 ppm 以上の群で低下傾向を示していることから、これらの変化は毒性学的影響とは判断されなかった。

肉眼的病理検査；試験期間終了時に全動物について麻酔下で剖検を行った。剖検では、各動物の全般的身体状態、身体開口部、外表及び体内の臓器及び組織の体系的な肉眼による観察を行った。

いずれの投与群においても検体投与の影響と考えられる所見はなかった。

病理組織学的検査；肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、以下の組織について病理標本を作成し、検鏡した。卵巣及び精巣を除く全組織を 10%緩衝ホルマリン液、卵巣及び精巣をブアン液、視神経を含む右眼を Universal solution、視神経を含む左眼をダビットソン液で固定した。主に H&E 染色を行い、必要に応じて特殊染色を行った。

副腎、大動脈、大腿骨、肋骨／肋軟骨、胸骨、骨髄、脳（小脳、大脳 - 中脳、延髄 - 橋）、盲腸、頸部、結腸、耳（内耳）*、精巣上体、食道、眼、卵管、胆嚢、肉眼的病変部、心臓、関節（大腿骨 - 脛骨）、腎臓、喉頭、肝臓、肺、腸間膜リンパ節、咽頭後リンパ節、乳腺、筋肉、鼻組織、鼻咽頭、視神経、坐骨神経、卵巣、膵臓、上皮小体、個体識別票*、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺、皮膚、小腸（十二指腸、回腸、空腸）、脊髄（頸部、腰部、胸部）、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺／上皮小体、気管、膀胱、子宮、膣

*：病理組織学的検査を実施しなかった。

認められた主要な病理組織学的所見を次表に示す。

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		0	100	800	2500*	0	100	800	2500*
腎臓	所見\検査動物数	4	4	4	4	4	4	4	4
	近位尿細管上皮細胞変性	0	0	1	3	0	0	0	0
	線維化	0	0	0	0	1	0	0	0
	乳頭鉍質沈着	0	0	0	0	0	2	0	0
肝臓	所見\検査動物数	4	4	4	4	4	4	4	4
	肝細胞肥大	0	0	3	↑4	0	0	3	↑4
	細胞質内空胞化	4	4	1	0	4	3	1	0

* 投与9日以降 3000 ppm から濃度を減じた。

表中の数値は所見を有する動物数を示す。

カイ二乗検定/Fisherの直接確率計算法：↑↓ P≤0.05、↑↓ P≤0.01

800 及び 2500 ppm の雌雄において、検体投与と関連のある最小から軽度の肝細胞の肥大が発生した。肝細胞の細胞質は対照群と比して泡沫状であった。肝臓の病変は、同群の雌雄における肝酵素誘導（全投与群）の臨床病理学的所見及び肝臓重量の高値と一致していることから、検体投与の影響と判断された。

800 及び 2500 ppm 雄の腎臓において、腎皮質中間部から深部の近位尿細管上皮細胞に最小から軽度の変性からなる検体投与と関連のある病変が認められた。影響を受けた尿細管の位置は、病変が近位尿細管の P3 セグメントに限定されていることが確認された。腎臓病変は、最少から軽度の細胞腫大を伴っており、そのため尿細管上皮が拡張していた。病理組織学的な病変の程度は最小から軽度のため、臨床化学的項目には対応する異常がなく、生物学的に意義を示すほどの変化ではなかった。

その他の病理組織学的病変については、発生頻度が低い、対照群と同程度の発生頻度である、あるいは用量依存性がないなどの理由から、全て偶発的な所見と判断された。

以上の結果から、検体のビーグル犬に対する飼料混入投与による90日間反復経口投与毒性試験における影響として、3000/2500 ppmに、体重減少（雌）、摂餌量の減少（雌）、血色素量、ヘマトクリット及び活性化部分トロンボプラスチン時間の低下（雌）、ALPの増加（雌雄）、総蛋白質、総コレステロール、アルブミン、カルシウムの低下（雌雄）、T₃の低下（雌）、UDP-GT、GS-T、GLU-Tの増加（雌）、O-DEM、P450、ECOD、ALD、EHの増加（雌雄）、肝重量の増加（雌雄）、腎重量の増加（雄）、肝細胞肥大（雌雄）、腎近位尿細管上皮細胞変性（雄）がみられ、800 ppmに、体重減少（雌）、摂餌量の減少（雌）、ALPの増加（雌雄）、総コレステロールの低下（雄）、総蛋白質、カルシウム、T₃の低下（雌）、アルブミンの低下（雌雄）、UDP-GLGT、GS-T、GLU-Tの増加（雌）、O-DEM、P450、ECOD、ALD、EHの増加（雌雄）、肝重量の増加（雌雄）、肝細胞肥大（雌雄）、腎近位尿細管上皮細胞変性（雄）がみられたが、100 ppmには雌雄ともに検体投与に関連する毒性影響は認められなかった。

したがって、検体を用いた90日間反復経口投与毒性試験の無毒性量（NOAEL）は雌雄とも100 ppm（雄雌：3 mg/kg/日）と判断された。最大耐性量（MTD）は肝臓、腎臓及び臨床病理学的変化に基づき、動物愛護上での許容範囲内の2500 ppmに近いと考えられた。毒性の標的臓器は肝臓及び腎臓であ

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

り、一過性の二次的な甲状腺及び赤血球系への影響を伴っていた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

3-2) ビーグル犬を用いた飼料混入投与による低用量 90 日間反復経口投与毒性試験

(資料 No.T-14)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2001 年

検体純度: %
 %
 %

供試動物: 純系ビーグル犬、一群雌雄各 4 匹、開始時 5 ヶ月齢未満、
開始時体重 (雄) 5158~10896 g、(雌) 5432~8275 g

投与期間: 約 90 日間 (実験開始日 1999 年 12 月 23 日、最終屠殺日 2000 年 3 月 22~24 日)

投与方法: 検体をアセトンに溶解し、コーン油 (飼料の 1%w/w) とともに、0、25 及び 50 ppm の濃度で飼料に混入し、少なくとも 90 日間にわたって随時摂食させた。対照飼料 (コーン油を含む) は、検体を含まないことを除き、処理飼料と同様に調製した。混合飼料は週 1 回調製した。

用量設定根拠;

観察・検査項目及び結果:

一般状態及び死亡率; 少なくとも 1 日 1 回、臨床症状について観察し、異常な所見のみを記録した。週 1 回、全動物を対象に詳細な一般状態の観察を行った。

検体投与に起因する臨床徴候又は観察所見は認められなかった。また、全動物が計画屠殺時まで生存した。

申請者註 1

申請者註 2

体重変化；全ての動物について週1回体重を測定した。

下表のとおり、雌雄ともに、いずれの投与量においても検体投与に関連する影響はなかった。

項目	検査時期 (日)	投与量 (ppm)			
		雄		雌	
		25	50	25	50
平均体重 (g)	0	114	110	96	100
	84	108	103	92	101

分散分析 (ANOVA) を行った (両側検定、 $P \leq 0.05$)。

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

摂餌量；全動物の摂餌量を 1 日 1 回測定した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた測定日を下表に示す。

項目	検査時期 (日)	投与量 (ppm)			
		雄		雌	
		25	50	25	50
平均摂餌量 (g/匹/日)	1	(84)	(95)	(88)	(98)
	31		↓73		
	58			(89)	↑119
	72			↓63	
	82	↑164	↑168		
	89			(71)	↑148
	91	(100)	(113)	(128)	(124)

Student の t-検定：↑↓ $P \leq 0.05$

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

括弧内は参考値。

雌雄ともに、いずれの投与量においても検体投与に関連する影響はなかった。申請者註3

検体摂取量；投与期間中の平均検体 (有効成分) 摂取量は以下のとおりであった。

投与量 (ppm)		25	50
検体 (有効成分) 摂取量 (mg/kg/日)	雄	0.7	1.4
	雌	0.7	1.5

血液学的検査；投与前、投与1、2ヵ月及び3ヵ月の試験終了時に、全動物を対象として一晩絶食後に桡側又は頸静脈穿刺によって血液を採取し、以下の項目の測定を行った。

赤血球数、ハイツ小体、ヘマトクリット値、血色素量、白血球数、白血球分画、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、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、網状血球数、血球形態、赤血球分布幅 (RDW)、血色素分布幅 (HDW)

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

検査項目	検査時期 (日)	投与量 (ppm)			
		雄		雌	
		25	50	25	50
HDW	57	↓95	↓94		
網状血球数	29				↑136
白血球分画	好酸球	-8		↓62	
		85	↓61		

Student の t-検定：↑↓ P ≤ 0.05

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

血液検査値に投与と関連する変化は認められなかった。

血色素分布幅が 25 及び 50 ppm の 2 用量で有意に減少したが、対照群値が通常よりばらつきが少なかったために有意差がみられたものであり、検体投与の影響とは考えられなかった。

血液検査値に投与と関連する変化は認められなかった。^{申請者註 4}

血液生化学的検査及び特殊生化学検査（肝酵素分析）；投与前、投与1、2ヵ月目及び3ヵ月目の試験終了時に、前述のように血液を採取し、以下の項目の測定を行った。又、肝酵素（*）については剖検時に肝臓サンプルを採取して測定を行った。

血液生化学的検査：

アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルブミン、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 (AST)、総ビリルビン (T.Bil)、胆汁酸、尿素窒素、カルシウム、塩素、総コレステロール (Chol)、クレアチニン (Cre)、クレアチンキナーゼ (CK)、γ-グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT)、グロブリン、グルコース、乳酸脱水素酵素、リン、カリウム、総蛋白質、ナトリウム、トリグリセリド、尿酸、サイロキシシン (T₄)、トリヨードサイロニン (T₃)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)

* 特殊生化学検査（肝酵素分析）：

チトクローム P450 (P450)、N-デメチラーゼ (N-DEM)、O-デメチラーゼ (O-DEM)

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目及び／又は検体投与によると判断された項目の変化を下表に示す。

検査項目	検査 時期 (日)	投与量 (ppm)			
		雄		雌	
		25	50	25	50
CK	-8				↑140
乳酸脱水素酵素	-8				↑259
	29				↑226
	85				↑191
AST	-8				
	85				↑141
GGT	-8			↑120	↑160
	57				↑150
胆汁酸	-8				
	57			↑143	
総ビリルビン	-8				
	85			↓50	
グロブリン	-8	↑112	↑112		
	85			↓84	
TSH	-8				
	29	↓64			
総蛋白質	-8				
	85		↑105		
カルシウム	-8				↓96
	85	↑103	↑103		
ナトリウム	-8				
	29		↑102		
塩素	-8	↑103	↑103		
	57	↑102	↑105		↑102
	85		↑103		↑102
T ₄	-8			↓71	
	57			↓71	
A/G 比 ¹⁾	-8				
	85			↑118	

Student の t-検定：↑↓ P ≤ 0.05、↑↓ P ≤ 0.01

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

1) 申請者による算出、Dunnett 検定：↑↓ P ≤ 0.05、↑↓ P ≤ 0.01

ASTは雌のみで投与3ヵ月目のみに有意に高値を示した。他に肝臓に変化がないこと、別途行った投与前値を共分散として用いた分散分析でも有意差がみられたものの、投与開始前に比較的高い値であったため、検体の影響ではないと考えられた。カルシウムは雄のみで25 ppm以上の群の3ヵ月目のみに有意に高値を示した。投与前値の高値によるもので、投与に関連した影響ではなかった。

上記以外に幾つかの項目が、試験期間中統計学的に有意な変動を示したが、投与前値を反映、対照群の一時的な低値によるもの、単発及び/又は用量依存性がないなどの理由により、検体投与と関連があるとは考えられなかった。

尿検査；血液学的検査と同時期に採取した尿について以下の項目の測定を行った。

外観、比重、蛋白、ケトン体、ウロビリノーゲン (Urob)、亜硝酸塩、沈渣、pH、グルコース (Glu)、潜血、ビリルビン (Bil)、白血球、カルシウム、リン

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

検査項目	検査時期 (日)	投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		0	25	50	0	25	50
カルシウム (mg/dL)	-9				(3.25)		(2.03)
	56				(5.98)		↓1.15
潜血	-9	(0.00)	↑1.00				
	56	(0.75)	(1.13)				

Student の t-検定：↑↓ P ≤ 0.05

表中の数値は実測値。

括弧内は参考値。

検体投与に関連すると考えられる変化はなかった。

雌の50 ppmの投与2ヵ月目のみで、カルシウムが有意に減少したが、片性での単発例であり、検体投与との関連はないと考えられた。

眼科学的検査；投与開始前及び終了前に、全動物を対象に検査を行った。検査は、ペンライトあるいは透光装置を用いた結膜及び瞳孔反射検査、散瞳剤で散瞳させた後、角膜、虹彩、眼房水及び水晶体を、スリットランプ顕微鏡を用いて検査した。又、倒像検眼鏡及び集光レンズを用いて硝子体液、網膜、脈絡膜、視神経乳頭の検査を行った。更に、眼底検査、前眼部の圧力及び流体力学的状態を測定するために眼圧並びに角膜の異常を評価するために角膜厚測定を行った。

投与前及び試験期間終了前の眼検査において、雌雄のいずれの用量でも眼の異常は認められなかった。

神経学的検査；投与開始前及び終了前に、全ての動物について精神状態／行動、歩行の特徴、姿勢及び姿勢反応に関する神経学的検査並びに脊髄反射及び脳神経反射検査を行った。さらに、心臓及び肺に関する胸部聴診も実施し、デジタル温度計を用いて直腸温を測定した。次の項目の検査を行った。

心理的状态／行動：覚醒、自発運動、驚愕反射、聴覚反応、すくみ／恐怖、攻撃性

姿勢：立ち上がり、振戦、線維束性収縮、開脚姿勢、扁平足、頭の位置、尾の位置、背の位置、頭部傾斜

歩行：失調性、ナックリング、旋回、硬直性／棒状、推尺過大、推尺過少、歩幅、脚幅、固有位置感覚

反応姿勢：片側跳び直り、片側歩行、片側立ち、手押し車歩行（前進、後進）、位置視覚、触覚性踏み直り、脚の撤去反応

脊髄／脳神経反射：膝蓋腱反射、二頭筋反射、三頭筋反射、腓腹筋反射、(いずれも UMN：上部運動神経症、軽度興奮性、LMN：下部運動神経症、軽度抑制性)、瞳孔反射（直接、間接）、会陰反射

記述／解説

その他：ラッセル音、直腸温、心雑音

投与前及び試験期間終了前の神経学的検査において、雌雄とも異常な所見は見られなかった。又、全ての体温値は正常範囲内であった。

臓器重量；試験終了時（90 日目）に全動物を対象として以下の臓器重量を測定し、剖検直前に測定した体重に対する対体重比も算出した。

副腎、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、下垂体、胸腺及び甲状腺

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

性別		雄		雌	
投与量 (ppm)		25	50	25	50
体重 (g)		107	107	92	101
脳	重量 (mg)			↓93	
	対体重比				
肝臓	重量 (mg)				
	対体重比		↑123		↑115

Student の t-検定：↑↓ P ≤ 0.05

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

対体重比：mg/100g 体重

50 ppm 雌雄の相対肝重量が有意に増加したが、絶対肝重量は有意ではなかった。最終体重が同群の雌雄で対照群より高値を示したが、その値は有意な高値ではなかった。有意な絶対値の変化がなく、分散分析でも最終体重を共分散として有意でない結果が出たため、相対重量の高値は検体投与と関連のある影響とは考えられなかった。申請者註5

肉眼的病理検査；試験期間終了時に全動物について麻酔下で剖検を行った。剖検では、各動物の全般的身体状態、身体開口部、外表及び体内の臓器及び組織の体系的な肉眼による観察を行った。

いずれの投与群においても、検体投与の影響と考えられる所見はなかった。

病理組織学的検査；肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、以下の組織について病理標本を作成し、検鏡した。卵巣及び精巣を除く全組織を10%緩衝ホルマリン液、卵巣及び精巣をブアン液、視神経を含む右眼を Universal solution、視神経を含む左眼をダビットソン液で固定した。主に H&E 染色を行い、必要に応じて特殊染色を行った。

副腎、大動脈、大腿骨、肋骨／肋軟骨、胸骨、骨髄、脳（小脳、大脳 - 中脳、延髄 - 橋）、盲腸、頸部、結腸、耳（内耳）*、精巣上体、食道、眼、卵管、胆嚢、肉眼的病変部、心臓、関節（大腿骨 - 脛骨）、腎臓、喉頭、肝臓、肺、腸間膜リンパ節、咽頭後リンパ節、乳腺、筋肉、鼻組織、鼻咽頭、視神経、坐骨神経、卵巣、膵臓、上皮小体、個体識別票*、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺、皮膚、小腸（十二指腸、回腸、空腸）、脊髄（頸部、腰部、胸部）、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺／上皮小体、気管、膀胱、子宮、膣

*：病理組織学的検査を実施しなかった。

いずれの投与群においても検体投与の影響を示唆する病理組織学的病変はなかった。

以上の結果から、検体のビーグル犬に対する飼料混入投与による90日間反復経口投与毒性試験において、摂餌量あるいは体重（体重増加量）に検体投与に関連する影響は認められなかった。検体投与に関連すると考えられる臨床症状、臨床化学的、眼科学的あるいは病理学的所見も認められなかった。又、神経学的検査、胸部聴診及び直腸体温は全て正常範囲内であった。

したがって、検体の90日間反復経口投与毒性試験における無毒性量（NOAEL）は、雌雄とも50 ppm（雄：1.4 mg/kg/日、雌：1.5 mg/kg/日）であると判断した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(7) 28 日間反復経皮投与毒性

1) ラットを用いた 28 日反復経皮投与毒性試験

(資料 No. T-15)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2000 年

検体純度： %

供試動物：Wistar 系 (Hsd.Cpb:WU) SPF ラット、一群雄雌各 10 匹、

開始時 (雄) 約 8~9 週齢、(雌) 約 12 週齢、

開始時体重 (雄) 233~262 g、(雌) 203~249 g

投与期間：雄；28 日間 (2000 年 1 月 25 日~2 月 21 日)

雌；29 日間 (2000 年 1 月 25 日~2 月 22 日)

投与方法：検体を粉末のまま湿ったガーゼ (6.0×5.0 cm) にのせ、ラットの背部に 0、100、300、1000 mg/kg を 1 日 6 時間貼付した。その間固定包帯とジャケットでガーゼが動かないようにした。暴露終了後処理箇所を石鹼と水で洗浄した。最初の 3 週間は土、日を除く 5 日間、第 4 週は土、日も含め投与し、雄は計 22 回、雌は計 23 回投与をした。

観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡率；一般状態及び生死を少なくとも 1 日 1 回観察した。

検体投与に関連する全身臨床症状及び局所皮膚所見は何ら認められなかった。また、試験期間中死亡動物はなかった。

体重変化；個体別体重は試験開始前と計画屠殺時まで毎週測定した。

結果を次表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

項目	検査 時期 (日)	投与量 (mg/kg)							
		雄				雌			
		0	100	300	1000	0	100	300	1000
体重 (g)	0	240	240	246	246	221	218	221	219
	7	261	266	274	271	224	224	226	227
	14	275	284	↑294	290	232	231	231	230
	21	292	301	↑315	310	239	236	234	234
	28	303	312	↑330	320	242	237	239	235

Dunnett の検定を用いて対照群との有意差検定を行った (↑↓: $P \leq 0.05$)。

1000 mg/kg 以下で雌雄とも体重と体重増加量に検体投与に関連する影響はなかった。

雄 300 mg/kg 群の 14 日目以降に平均体重が対照群に比較し有意に増加したが、用量依存性がなく、検体投与に関連した影響とは考えられなかった。

摂餌量及び検体摂取量；個別別に摂餌量を毎週測定した。

結果を下表に示す。

項目	検査 時期 (日)	投与量 (mg/kg)								
		雄				雌				
		0	100	300	1000	0	100	300	1000	
平均 摂餌量	g/匹/日	7	24	24	25	25	18	18	18	18
		14	24	24	↑26	↑26	19	19	19	19
		21	25	25	↑27	↑27	20	20	20	20
		28	24	25	↑27	↑26	19	19	20	19
	g/kg/日	7	90	89	91	92	80	82	81	81
		14	86	86	89	89	81	83	84	80
		21	84	83	84	87	83	83	85	85
		28	80	80	81	81	80	82	83	82

Dunnett の検定を用いて対照群との有意差検定を行った (↑↓: $P \leq 0.05$, ↑↓: $P \leq 0.01$)。

摂餌量には、雌雄とも検体投与による影響は認められなかった。

雄の 300 及び 1000 mg/kg では動物当たり及び日当たりの摂餌量が有意に増加したが、これらの群の動物の体重が重いことによるもので、生物学的な意義はないと考えられた。

血液学的検査；投与開始後、雄第 28 日、雌第 29 日に全動物について、ジエチルエーテル麻酔下で心臓穿刺により採血し、以下の項目を測定した。

白血球分画、赤血球の形態、赤血球数 (RBC)、血色素量 (Hb)、

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

ヘマトクリット値 (Ht)、白血球数 (WBC)、血小板数、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)、血色素減少 (Hypo-chrom.)、トロンボプラスチン時間 (HQUICK)

対照と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

性別 (検査日)	雄 (28 日)				雌 (29 日)			
	0	100	300	1000	0	100	300	1000
Ht ^d (L/L)	0.488	↑0.504	0.489	0.479	0.455	0.464	0.458	0.456
MCV ^d (fL)	58.1	↑59.8	59.7	58.8	56.3	57.7	55.9	55.9
HQUICK ^u (秒)	31.5	32.0	↓30.8	30.7	29.4	29.8	29.8	30.0
リンパ球 ^u (10 ⁹ /L)	6.00	7.65	↑7.56	6.32	4.20	4.64	4.60	5.03

Dunnett (d) 及び U (u) 検定を用いて対照群との有意差検定を行った (↑↓: P ≤ 0.05)。

1000 mg/kg 以下では検体投与による影響は認められなかった。 申請者註 1

血液生化学的検査: 血液学的検査で使用した血液から得られた血清を用い、以下の項目の測定を行った。なお、グルコース測定用血液試料は、第 27 日に非絶食、無麻酔下で尾静脈から採取した。

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリホスファターゼ (ALP)、γ-グルタミルトランスフェラーゼ (GGT)、コレステロール (Chol)、クレアチン (Cre)、尿素、(総) 蛋白、アルブミン (Alb)、グルコース (Gul)、Na、K

対照と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

性別 (検査日)	雄 (28 日)				雌 (29 日)			
	0	100	300	1000	0	100	300	1000
尿素 ^d (mmol/L)	8.01	↓7.17	↓7.30	↓7.32	7.40	6.78	↓6.27	6.88
Alb ^d (g/L)	28.9	↓27.6	28.0	28.4	29.3	29.4	28.5	29.0
Na ^w (mmol/L)	144	144	↓143	↓143	144	144	↓142	↓143
K ^w (mmol/L)	5.9	6.1	6.1	↑6.6	5.9	6.0	6.0	5.7

Dunnett (d) 及び Welch (w) の検定を用いて対照群との有意差検定を行った (↑↓: P ≤ 0.05、↑↓: P ≤ 0.01)。

雄 100 mg/kg 以上及び雌 300 mg/kg で尿素、雄 100 mg/kg でアルブミン並びに雌雄 300 mg/kg 以上でナトリウムが統計学的に有意に減少した。また、雄 1000 mg/kg でカリウムが統計学的に有意に増加した。しかし、これらはごく軽度 (試験施設の背景データの平均 ± 2S.D. の範囲内)、用量依存性がないあるいは部分的に一方の性においてのみ認められている等の理由から毒性学的影響によるものではないと判断した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

臓器重量：試験終了時の全生存動物を対象に以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

脳、心臓、肝臓、脾臓、胸腺、副腎、腎臓、精巣、精巣上体、子宮、卵巣

対照と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

性別 (屠殺・検査日)		雄 (28 日)				雌 (29 日)			
投与量 (mg/kg)		0	100	300	1000	0	100	300	1000
体重 (g)		303	312	↑330	320	242	239	239	238
脳	絶対重量 (mg)	1822	1762	1780	1868	1753	1796	1819	1749
	対体重比	604	567	↓541	585	729	752	764	740
腎臓	絶対重量 (mg)	2171	2118	2199	2264	1641	1660	1658	1575
	対体重比	717	680	↓666	709	681	695	696	663

Dunnnett の検定を用いて対照群との有意差検定を行った (↑↓: $P \leq 0.05$)。

対体重比: mg/100g 体重

雄の 300 mg/kg 群の脳及び腎臓の対体重比が有意に減少したが、絶対重量には対照群との間に大きな差が認められなかったことから、この群の動物の体重が重かったことによる影響であり、検体投与の影響とは判断されなかった。

したがって、雌雄とも臓器重量に検体投与による影響は認められなかった。

肉眼的病理検査；最終屠殺の全動物について剖検を行った。

検体投与に関連した肉眼的病理所見は認められなかった。

病理組織学的検査；肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、以下の組織について病理標本を作製し、H&E 染色を施した後検鏡した。肝臓については凍結切片を作製し、オイル赤 O で染色した。

皮膚 (乳腺領域)、乳腺、頭部、胸骨 (骨髄含む)、大腿骨、骨格筋 (腿)、鼻、喉頭、咽頭、気管、肺*、心臓、大動脈、脾臓、リンパ節 (顎下及び腸間膜)、胸腺、唾液腺、食道、胃 (前胃及び腺胃)、胆嚢、膵臓、肝臓、腸 (十二指腸、回腸、空腸、盲腸、結腸、直腸及び腸の残余)、腎臓、尿道、尿管、膀胱*、卵巣、卵管、精巣、子宮 (頸部含む)、膣、精巣上体、前立腺、精囊 (凝固腺含む)、副腎、下垂体、甲状腺 (上皮小体含む)、脳 (大脳、小脳、橋/延髄)、視神経、坐骨神経、脊髓 (頸部、胸部、腰部)、眼 (眼瞼含む)、眼窩外涙腺、ハーダー腺、舌、ジンバル腺、皮膚 (無処理及び処理域)、肉眼的病変部位

* : 固定液を注入して前固定した

組織病理学的検査において、検体投与に関連する局所的、又全身的影響は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

以上の結果、4週間のラットに対する検体の経皮投与後、全身的、局所的皮膚影響は何ら認められなかった。

雌雄ラットにおける局所的皮膚及び全身影響に対する無毒性量（NOAEL）は1000 mg/kg/日と判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(8) 90 日間反復吸入毒性

90 日間反復吸入毒性試験報告書提出の除外に関する考察

90 日間反復吸入毒性試験報告書の提出を除外することが可能と判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(9) 90 日間反復経口投与神経毒性

1) ラットを用いた飼料混入投与による 13 週間反復経口投与神経毒性試験 (資料 No. T-16)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 : 2002 年

検体純度 : %
 %

供試動物 : Wistar 系 (Cri:WI [G1x/BRL/Han]) IGS BR ラット、一群雌雄各 12 匹
開始時 8 週齢、開始時体重 (雄) 204~262 g、(雌) 138~179 g

投与期間 : 13 週間 (投与開始日 2001 年 1 月 29 日~5 月 1 日)

投与方法 : 検体を 0、200、1000 及び 7500 ppm の濃度で飼料に混入し、13 週間にわたって随時摂食させた。検体の媒体として飼料重量の 1%のコーン油を使用した。

用量設定根拠 ;

観察・検査項目及び結果 :

死亡率及び一般状態 ; 1 日 2 回 (休日及び週末は 1 日 1 回) 死亡又は瀕死の有無を調べた。また、週 1 回、毒性臨床徴候の有無について詳細な一般状態検査を行った。

いずれの用量でも雌雄ともに、検体投与に関連した死亡及び臨床徴候は認められなかった。

体重変化 ; 週 1 回、全ての動物の体重を測定した。灌流動物については屠殺日にも最終体重を測定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた検査日及び／又は検体投与によると判断された検査日の変化を下表に示す。

項目	検査 時期 (日)	投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		200	1000	7500	200	1000	7500
体重 (g)	77			(95)			↓91
	84			(95)			↓92
	91	(99)	(102)	(95)	(100)	(101)	(94)

Dunnett の検定：↑↓ $P \leq 0.05$ 、↑↓ $P \leq 0.01$

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

括弧内は参考値。

7500 ppm の雌雄で体重増加抑制が認められたが、1000 ppm 以下の投与群の雌雄では影響は認められなかった。

摂餌量；全動物の摂餌量を週 1 回測定した。

いずれの投与群でも雌雄ともに試験期間中の摂餌量には投与による影響は認められなかった。

検体摂取量；投与期間中の検体（有効成分）の 1 日平均摂取量は以下のとおりであった。

投与量 (ppm)		200	1000	7500
検体（有効成分）摂取量 (mg/kg/日)	雄	12.7	59.5	473.9
	雌	15.1	71.7	582.4

機能観察総合検査（FOB）；投与開始前の週に 1 回、投与後 4 週、8 週及び 13 週に各 1 回で計 4 回、最大全 12 匹の動物を対象として、機能観察総合検査（FOB）を Moser の方法に準じて行い、以下の項目の測定を行った。

ホームケージ検査：姿勢、立毛、不随意運動—間代性、不随意運動—強直性、異常歩行、異常発声、その他

取り扱い時検査：ケージからの取り出し易さ、取り扱いに対する反応、筋緊張度、眼瞼閉鎖、流涙、流涎、鼻汁、汚れ、その他

オープンフィールド検査：立毛、異常呼吸、姿勢、不随意運動—間代性、不随意運動—強直性、常同行動、異常行動、異常歩行、異常発声、覚醒度、立ち上がり、脱糞、排尿、その他

反射／生理学的観察：接近反応、接触反応、聴覚反応、疼痛反応（テールピンチ反応）、瞳孔サイズ、瞳孔反応、正向反射、体温、体重、握力、着地開脚幅

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

運動量；投与開始前の週に1回並びに4週、8週及び13週に各1回で計4回、全12匹の動物を対象として、運動量テストを行った。自動運動測定装置（8字型迷路）を用いて、60分間テストを行い、60分間のセッション全体及び10分間の各インターバル中の移動運動量及び自発運動量を調べた。

機能観察総合検査（FOB）、移動運動量及び自発運動量の測定値では、いずれの用量でも雌雄ともに、検体投与に関連した所見は認められなかった。

眼科学的検査；投与前及び終了前（11週）に、全動物を対象に検査を行った。

いずれの投与群でも雌雄ともに検体投与に関連した所見は認められなかった。

臓器重量；試験終了時に灌流固定した各群雌雄各6匹を対象に、脳重量を測定し、対体重比を算出した。脳は頭蓋骨から摘出し、後述のホルマリン液に入れる前に重量を測定した。

いずれの投与群でも雌雄ともに脳重量に対照群と比較して差は認められず、検体投与による影響は認められなかった。

肉眼的病理学的検査；試験終了時に全ての動物を対象として剖検を行った。

いずれの投与群でも雌雄ともに検体投与に関連した肉眼的病変は認められなかった。

病理組織学的検査；試験終了時に各群雌雄各6匹を対象に、ペントバルビタールを腹腔内に投与して麻酔し、亜硝酸ナトリウム（リン酸緩衝液中）、次いでリン酸緩衝液に溶かしたUniversal固定液（1%w/v グルタルアルデヒド及び4%w/v EM級ホルムアルデヒド）を用いてin situ灌流固定した。全脳及び脊髄、両眼（視神経を伴う）及び末梢神経（坐骨、脛骨及び腓腹）、ガッセル神経節、腓腹筋、両前肢、身体識別標（尾）並びに肉眼的病変を摘出し、10%緩衝ホルマリンで後固定した。脳、脊髄、馬尾、眼、視神経及び腓腹筋はパラフィンに包埋後病理標本を作成し、ヘマトキシリン及びエオジン（H&E）染色を施し検鏡した。また、頸髄及び腰髄膨大部の後根神経節（後根及び前根線維を含む）、ガッセル神経節、末梢神経（坐骨、脛骨及び腓腹神経）はglycol methacrylate（GMA）に包埋し、改変Lee's染色を施した。対照及び高用量群の次の組織を観察した。

脳（8横断面；嗅球（横断面1）、大脳皮質（横断面2～6）、尾状核—被殻／淡蒼球（横断面2～5）、海馬（横断面5～6）、視床（横断面4～5）、視床下部（横断面4～5）、蓋、被蓋及び大脳脚を含む中脳（横断面6）、小脳（横断面7～8）、延髄（横断面7～8）、脊髄（頸部、胸部及び腰部の横断面及び縦断面）並びに馬尾（縦断面）、ガッセル神経節、脊髄神経根及び後根神経節、坐骨神経、脛骨神経、腓腹神経、視神経、眼及び腓腹筋

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

7500 ppm の雌雄に検体投与に関連した病理組織学的所見は認められなかった。したがって、中間及び低用量を投与した動物の観察は実施しなかった。

以上の結果から、検体のラットに対する 13 週間飼料混入投与による反復神経毒性試験における影響として、7500 ppm の雌雄に体重増加抑制が認められたのみで、他には検体投与の影響が認められなかった。したがって、全体的な無影響量は雌雄とも 1000 ppm (雄 : 59.5 mg/kg/日、雌 : 71.7 mg/kg/日) であると判断された。いずれの用量でも神経毒性の徴候は認められなかった。^{申請者註 1}

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(10) 28 日間反復投与遅発性神経毒性

28 日間反復投与遅発性神経毒性試験報告書提出の除外に関する考察

急性遅発性神経毒性試験報告書提出を除外することが可能と判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(11) 1年間反復経口投与毒性及び発がん性

1) ビーグル犬を用いた飼料混入投与による反復経口投与毒性試験

(資料No.T-17)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2002 年

検体純度： %
%
%
%

供試動物：純系ビーグル犬、一群雌雄各 4 匹、開始時 6 ヶ月齢未満、
開始時体重（雄）6942～11790 g、（雌）6302～9751 g

投与期間：約 1 年間（実験開始日 1999 年 12 月 14 日、最終屠殺日 2001 年 1 月 8 日の週）

投与方法：検体をアセトンに溶解し、コーン油（飼料の 1%w/w）とともに、0、25、50、250 及び 1200 ppm の濃度で飼料に混入し、少なくとも 1 年間にわたって随時摂食させた。対照飼料（コーン油を含む）は、検体を含まないことを除き、処理飼料と同様に調製した。混合飼料は週 1 回調製した。

用量設定根拠；

観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡率；少なくとも 1 日 1 回、瀕死状態及び死亡について観察し、異常な所見のみを記録した。週 1 回、全動物を対象に毒性の臨床症状に関する詳細な一般状態検査を行った。

検体投与に起因する臨床徴候又は観察所見は認められなかった。又、全動物が計画屠殺時まで生存した。

体重変化；全ての動物について週1回体重を測定した。

各投与群における体重変化を下表に示す。

項目	検査 時期 (日)	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		25	50	250	1200	25	50	250	1200
平均 体重 (g)	0				(88)			(99)	(96)
	7				(87)			(100)	(92)
	28				(90)			(97)	(91)
	56				(85)			(97)	(88)
	105				(88)			(95)	(86)
	210				(87)			(86)	(79)
	385				(85)			(90)	(82)
投与期間中の 体重増加量 (g)				(80)			(74)	(58)	

Student の t-検定：↑↓ P ≤ 0.05

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

括弧内は参考値。

250 ppm の雌及び 1200 ppm の雌雄の体重（体重増加量）に検体投与に関連する低下が認められた。その他の群では、対照群と大差なかった。

摂餌量；全動物の摂餌量を毎日測定した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた測定日及び／又は検体投与によると判断された測定日の変化を次表に示す。

項目	検査 時期 (日)	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		25	50	250	1200	25	50	250	1200
摂餌量 (g/匹/日)	1				↓42				
	2				↓49				
	3				↓62				
	4				↓65				
	5				↓59				
	10		↓71		↓75				
	20			↓72	↓70				
	22						↑148		↓65
	38						↓57	↓68	↓64
	47	↑154	↑189						
	48	↓63		↓47	↓68				
	106					↑159	↑156		
	116				↓45				
	117	↑165	↑128	↑178					
	124			↓71	↓42				
	141				↓78				
	142	↑130		↑145	↓48				
	167							↓67	
	170							↓64	
	173				↓61				
	197							↓75	
	206				↓50				
	218	↑182		↑147					
	237	↑239		↑217					
	253	↑194							
	271		↑156		↓50				
	278						↓56		↓53
	281				↓36	↑119			↓46
	305				↓67				
	314		↑187	↑156					
318					↑218	↑226	↑200	↑219	
367					↑323	↑251	↑220	↑211	
369						↑345	↑234	↑343	
384						↓41			
392					↑167			↓47	
393					↑125	↓74	↓58		

Student の t-検定 : $\uparrow\downarrow P \leq 0.05$ 、表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

1200 ppm の雌雄の摂餌量に検体投与に関連する低下が認められた。

その他の群では、測定時期により増減が認められたが、概ね対照群と大差なかった。

申請者註 1

検体摂取量；投与期間中の平均検体（有効成分）摂取量は以下のとおりであった。

投与量 (ppm)		25	50	250	1200
検体（有効成分）摂取量 (mg/kg/日)	雄	0.8	1.7	8.1	34.9
	雌	0.7	1.5	7.7	37.4

血液学的検査；暴露前、試験 3、6、9 及び 12 カ月時に、全動物を対象として一晩絶食後に桡側又は頸静脈穿刺によって血液を採取し、以下の項目の測定を行った。

赤血球数、ハイツ小体 (HZ)、ヘマトクリット値 (Ht)、血色素量、白血球数、白血球分画、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、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、網赤血球数、血球形態

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目の変化を下表に示す。

検査項目	検査時期 (日)	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		25	50	250	1200	25	50	250	1200
赤血球数	-7			(94)	(98)				
	386			↓93	↓96				
Ht	-7			(92)					
	386			↓91					
MCHC	-7	(100)		(101)	(100)	(101)	(101)		
	386	↑102		↑102	↑102	↑101	↑101		
APTT	-7								(99)
	87								↓92
白血球分画									
分葉核 白血球	-7	(101)	(90)		(101)				
	178	↓90	↓87		↓85				
リンパ球	-7		(108)		(102)				
	178		↑127		↑138				
大型 非染色性球	-7				(86)				
	273				↓67				

共分散分析+Student の t-検定：↑↓ P ≤ 0.05

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。括弧内は参考値。

申請者註 1

試験期間中、血液学的検査値に統計学的に有意な増減がみられたが、1 回のみの発生、用量依存性を示さない、投与前値と大差がないなどの理由からいずれの変化も検体投与と関連がないと判断した。

共分散分析により、250 ppm 雄の 12 ヶ月の検査において赤血球数が有意に減少した。同様に平均血色素濃度は 25 及び 250 ppm 雄において有意に増加したが、用量依存性がないことから検体投与とは関連がないと考えた。

血液生化学的検査及び特殊生化学検査；投与前、試験 3、6、9 ヶ月目及び 12 ヶ月の試験終了時に、全動物を対象として撓側又は頸静脈穿刺によって血液を採取し、以下の項目の測定を行った。

血液生化学的検査：

アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルブミン、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 (AST)、総ビリルビン (T.Bil)、胆汁酸、尿素窒素 (UN)、カルシウム、塩素、総コレステロール (Chol)、クレアチニン (Cre)、クレアチンキナーゼ (CK)、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT)、グロブリン、グルコース (Glu)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、リン、カリウム、総蛋白質、ナトリウム、トリグリセリド (TG)、尿酸、サイロキシシン (T_4)、トリヨードサイロニン (T_3)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

検査項目	検査時期 (日)	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		25	50	250	1200	25	50	250	1200
Cre	-7	↓60		(80)	(100)	(100)			(100)
	87			↓86	↓86				**71
	178	↓88		↓75	↓75	↑114			↓71
	273					↑129			
	386	↓78		↓78	↓67				
ALT	-7				(106)			(76)	(103)
	87								↑131
	178							↓73	↑168
	386				↑200				↑167
GGT	-7	↑133	↑167	(67)	(67)		(150)	(200)	(150)
	87				↑157				↑144
	273			↑133	↑150			↑150	↑188
	386						↑133	↑133	↑189

共分散分析+Student の t-検定：↑↓ P ≤ 0.05

共分散分析+Dunnett 検定：* P ≤ 0.05、** P ≤ 0.01 (Student の t-検定で有意でなく Dunnett 検定で有意な変化のみ記載)

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の。

括弧内は参考値。

(つづき)

検査項目	検査時期 (日)	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		25	50	250	1200	25	50	250	1200
ALP	-7			(81)	(89)			(101)	(103)
	87			↑157	↑190			↑142	↑253
	178			↑177	↑236			↑163	↑350
	273			↑184	↑234			↑246	↑325
	386			↑195	↑276			↑164	↑344
T.Bil	-7		(100)		(50)				
	87	↓50		↓50					
総蛋白質	-7		(98)		(100)				(105)
	178				↓90				*95
	273		↓94		↓88				↓88
アルブミン	-7				(100)				(100)
	87								↓90
	178				↓88				
	273				↓89				↓89
	386				↓92				*92
グロブリン	-7				(100)				
	178				↓91				
A/G 比 ¹⁾	-7				(99)				(94)
	87								↓89
ナトリウム	-7		(100)	(100)	(101)				
	386		↑102	↑102	↑103				
塩素	-7	(103)	(103)	(103)	(103)				
	87				↑104				
	178	*99			↑102				
	273		↑104	↑103	↑104				
	386		↑105	↑106	↑107				
カルシウム	-7							(99)	(101)
	87							↓95	↓94
	178								↓95
	273								↓94

共分散分析+Student の t-検定 : ↑↓ P ≤ 0.05

共分散分析+Dunnett 検定 : * P ≤ 0.05、** P ≤ 0.01 (Student の t-検定で有意でなく Dunnett 検定で有意な変化のみ記載)

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。

括弧内は参考値。

1) 申請者により算出。Dunnett 検定 : ↑↓ P ≤ 0.05、↑↑↓↓ P ≤ 0.01

1200 ppm の雌雄において、ALT、GGT 及び ALP が有意に増加した。又、ALP は、250 ppm の雌雄においても有意に増加した。総蛋白質及びアルブミン値が、1200 ppm の雌

雄で有意に低下した。これらは病理組織学的検査にみられた肝機能への影響に関連した変化であると判断された。

50、250 及び 1200 ppm 雄のナトリウム及び塩素に有意な増加が認められた。ナトリウム及び塩素は見かけの統計学的結果を生ずることがよく知られており、ナトリウム及び塩素値では、偶発的に投与開始前に投与群で対照群より高値を示したことが、統計学的有意差は雄のみに発生していることから投与による影響ではないと判断された。

Cre は 1200 ppm 雌雄で有意な低下を示した。25 ppm 雌の 6 ヶ月目にも一過性に有意に増加したが、投与前値が低く偶発的な変化と考えられた。1200 ppm の動物はかなり体重が減少していることから Cre 値の低下は筋肉量の減少と関連していると思われる。

カルシウムは 250 及び 1200 ppm の雌の投与 3 ヶ月に有意に低下した。この変化は持続せず、かつ雄では見られないことから投与との関連がないと考えられた。

その他の項目にも有意な変化あるいは傾向が認められたが、変化が軽微、投与前から同じ傾向がある、用量依存性がないあるいは一過性の所見であるなどの理由から、検体投与に関連した影響とは考えられなかった。

尿検査；血液学的検査と同時期に採取した尿について以下の項目の測定を行った。

外観、比重、蛋白、ケトン体、ウロビリノーゲン (Urob)、亜硝酸塩、沈渣、pH、グルコース (Glu)、潜血、ビリルビン (Bil)、白血球、カルシウム、リン

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

検査項目	検査時期 (日)	投与量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	25	50	250	1200	0	25	50	250	1200
pH	-6						(5.88)		(7.13)		
	274						(5.75)		↑7.13		
ケトン体 (mg/dL)	-6						(5.0)	(1.3)			
	90						(3.8)	↓0.0			
潜血	-6	(1.00)	(1.25)	(1.00)	(0.25)	(0.13)	(1.00)	(0.63)			
	90						(0.38)	↑2.50			
	181	(3.00)	↓1.50	↓2.00	↓1.00	↓1.38					
尿比重	-6						(1.0320)	(1.0195)			
	90						(1.0348)	1.0050↓			
亜硝酸塩	-6						(0.0)	(0.3)			
	90						(0.0)	↑0.8			
白血球	-6						(0.8)	(0.8)			
	90					↓0.3	(0.0)	↑1.5			↑1.0

共分散分析+Student の t-検定：↑↓ P ≤ 0.05

括弧内は参考値。

検体投与に関連すると考えられる変化はなかった。

統計学的有意差が散見されたが、多くは単発性で用量依存性がなかった。全投与群雄の6ヵ月目の尿中の潜血の減少は、その期間中の対照群の異常な高値によるものであった。尿中の血液の欠如には毒性学的な意義は認められなかった。

眼科学的検査；投与開始前及び終了前に、全動物を対象に検査を行った。検査は、ペンライトあるいは透光装置を用いた結膜及び瞳孔反射検査、散瞳剤で散瞳させた後、角膜、虹彩、眼房水及び水晶体をスリットランプ顕微鏡を用いて検査した。又、倒像検眼鏡及び集光レンズを用いた硝子体液、網膜、脈絡膜、視神経乳頭の検査、眼底検査、前眼部の圧力及び流体力学的状態を測定するための眼圧並びに角膜の異常を評価するための角膜厚測定が含まれた。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

検査項目	検査時期(日)	投与量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	25	50	250	1200	0	25	50	250	1200
角膜厚 (mm)	-4						0.47	0.52	0.48	0.50	0.47
	388						0.52	↑0.60	↑0.57	↑0.57	0.55

Fisherの最小有意差検定：↑↓ P ≤ 0.05

25、50及び250 ppmの雌において角膜厚が有意に高値を示したが、試験期間を通じて全ての角膜厚及び眼圧検査値は、対照群との差はわずかであったことから、検体投与の影響ではないと判断された。いずれの投与群においても検体投与に関連した眼の異常は認められなかった。

神経学的検査；投与開始前及び終了前に、全ての動物について心理的状态/行動、歩行の特徴、姿勢及び姿勢反応に関する神経学的検査並びに脊髓反射及び脳神経反射検査を行った。さらに、心臓及び肺に関する胸部聴診も実施し、デジタル温度計を用いて直腸温を測定した。以下の項目の検査を行った。

心理的状态/行動：覚醒、自発運動、驚愕反射、聴覚反応、すくみ/恐怖、攻撃性

姿勢：立ち上がり、振戦、攣縮、開脚姿勢、偏平足、頭の位置、尾の位置、背の位置、頭部傾斜

歩行：失調性、ナックリング、旋回、硬直性/棒状、推尺過大、推尺過少、歩幅、脚幅、固有位置感覚

反応姿勢：片側跳び直り、片側歩行、片側立ち、手押し車歩行（前進、後進）、位置視覚、触覚性踏み直り、脚の撤去反応

脊髓/脳神経反射：膝蓋腱反射、二頭筋反射、三頭筋反射、腓腹筋反射（いずれも

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

UMN：上部運動神経症、軽度興奮性、LMN：下部運動神経症、軽度抑制性)、瞳孔反射（直接、間接)、会陰反射

記述/解説その他：ラッセル音、直腸温、心雑音

異常な神経学的検査所見は認められなかった。全ての体温値は正常範囲内であった。

心電図及び血圧評価；検体投与3ヶ月後に、全動物を対象として、心電図検査（P波、QRS群及びT波の第2誘導心電図測定）を行った。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

検査項目	投与量 (ppm)									
	雄					雌				
	0	25	50	250	1200	0	25	50	250	1200
R波振幅(mV)	2.53	2.94	2.67	2.61	2.38	3.13	↓2.16	↓1.80	↓2.45	2.48

Fisherの最小有意差検定：↑↓ P ≤ 0.05

心電図あるいは血圧項目に、検体投与の影響は認められなかった。^{申請者註2}

臓器重量；試験終了時に全動物を対象として以下の臓器重量を測定し、剖検直前に測定した体重に対する対体重比も算出した。

副腎、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓、精巣、精巣小体、卵巣、下垂体、胸腺及び甲状腺/上皮小体、子宮

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		25	50	250	1200	25	50	250	1200
体重 (g)		102	99	105	86	112	106	89	83
腎臓	重量 (mg)								
	対体重比					↓87			↑117
肝臓	重量 (mg)				(121)				(114)
	対体重比			↑112	↑141				↑137
肺	重量 (mg)								
	対体重比			↓85					
卵巣	重量 (mg)	—	—	—	—	↑190			
	対体重比	—	—	—	—	↑171			
子宮	重量 (mg)	—	—	—	—	↑261			
	対体重比	—	—	—	—	↑235			
下垂体	重量 (mg)	↓88	↑119						
	対体重比								
甲状腺	重量 (mg)								
	対体重比						↑122	↑128	↑134
胸腺	重量 (mg)					↑229			
	対体重比					↑207			

共分散分析+Student の t-検定：

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。

括弧内は参考値。

対体重比：mg/100g 体重

—：該当なし

250 ppm の雄及び 1200 ppm の雌雄で、肝臓の相対重量が有意に増加した。絶対重量は対照群と比して有意な増加を示さなかったが、共分散分析では 1200 ppm の雌雄の絶対重量に有意な増加が確認され、これらの肝臓の変化は検体投与の影響と考えられた。

卵巣、子宮、胸腺の絶対及び相対重量が 25 ppm の雌のみで対照群と比して有意に増加した。用量依存性がなく、個別値が他の群の個別値の範囲と相似しているため、これは偶発的な結果で、投与との関連はないと考えられた。

甲状腺の相対重量は、50、250、1200 ppm の雌で有意に増加したが、絶対重量は増加しなかった。体重変動の複雑な影響を除くために共分散分析を使用した。群間に有意差は認められなかった。さらに、甲状腺相対重量が検体投与と関連していることを示唆する臨床病理学的あるいは病理組織学的所見も認められなかった。

その他にも統計学的有意差がみられたが、単発であり、反対方向への変化であり及び/又は絶対重量変化と相対重量変化が一致していなかったため、毒性学的に重要とは考えられなかった。

肉眼的病理検査；試験期間終了時に全動物について麻酔下で剖検を行った。剖検では、各動物の全般的身体状態、身体開口部、外表及び体内の臓器及び組織の体系的な肉眼による観察

を行った。

いずれの投与群においても検体投与に関連した異常は認められなかった。

病理組織学的検査；肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、以下の組織について病理標本を作成し、検鏡した。卵巣及び精巣を除く全組織を10%ホルマリン液、卵巣及び精巣をブアン液、視神経を含む右眼を Universal solution、視神経を含む左眼をダビットソン液で固定した。主に H&E 染色を行い、必要に応じて特殊染色を行った。

副腎、大動脈、大腿骨、肋骨／肋軟骨、胸骨、骨髄、脳（小脳、大脳 - 中脳、延髄 - 橋）、盲腸、子宮頸部、結腸、耳（内耳）*、精巣上体、食道、眼、卵管、胆嚢、肉眼的病変部、心臓、関節（大腿骨 - 脛骨）、腎臓、喉頭、肝臓、肺、腸間膜リンパ節、咽頭後リンパ節、乳腺、筋肉、鼻組織、鼻咽頭、視神経、坐骨神経、卵巣、膵臓、上皮小体、個体識別票*、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺、皮膚、小腸（十二指腸、回腸、空腸）、脊髄（頸部、腰部、胸部）、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺／上皮小体、気管、膀胱、子宮、膣

*：病理組織学的検査を実施しなかった。

認められた主要な病理組織学的所見を下表に示す。

性別		雄					雌				
臓器	投与量 (ppm)	0	25	50	250	1200	0	25	50	250	1200
肝臓	所見\検査動物数	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	肝細胞肥大	0	0	0	3	↑4	0	0	0	2	3
腎臓	所見\検査動物数	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	変性	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
	色素沈着	2	1	1	1	3	0	1	1	1	3
錐体喉頭筋 リンパ節	所見\検査動物数	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	リンパ球増生	0	↑4	1	0	0	1	2	2	2	1

表中の数値は所見を有する動物数を示す。

カイ二乗検定/Fisher 直接確率計算法：↑↓ P ≤ 0.05

肝細胞の肥大が 250 ppm 以上の群で確認され、1200 ppm 雄で統計学的有意差が認められた。この変化は、肝細胞の細胞質の肥大によるもので、対照群における正常範囲より多少大きかった。更に、細胞質の構造の相違は様々であったが、細胞質の均一な顆粒状として示された。核は影響を受けていないと思われた。これは細胞質内の小胞体増加の典型像で、肝臓の生体異物代謝で通常認められる。以上のことから肝臓において検体投与に関連する病理組織学的所見が認められた。

腎臓では“変性”が雄のみで確認された。高用量群の1例は核濃縮及び時折の有糸分裂像を伴う細胞の肥大を含む変化を示した。低用量群及び対照群では核濃縮を伴う尿細管が時折又は単発で認められた。肥大細胞領域は対照群を含めた全群に認められた。1200 ppm の動物1例のみが対照群の背景データと明らかに異なる変化を示した。腎皮質における色

素沈着の有意でない増加が 1200 ppm の雌雄動物で認められた。程度は全例軽微から軽度であったが、検体投与に関連する微細な原因不明の変化と思われた。

その他の病理組織学的病変については、発生頻度が低い、単発性である、対照群と同程度の発生頻度であるあるいは用量依存性がないなどの理由から、全て偶発的な所見と判断された。

以上の結果から、検体のビーグル犬に対する飼料混入投与による1年間反復経口投与毒性試験における影響として、250 ppmの雌雄で肝臓の肝細胞肥大、250 ppmの雄における肝酵素ALP及び肝臓相対重量の増加、同群雌の肝酵素ALPの増加及び体重増加抑制が認められた。1200 ppm雌雄では体重増加抑制、摂餌量の低下、ALT、GGT及びALPの増加、総蛋白質及びアルブミンの減少並びに肝臓相対重量増加、肝臓（肝細胞肥大）及び腎臓（色素沈着等）における病理所見の発生頻度増加が認められた。又、同群雄で腎臓の変性像が認められ、毒性の標的臓器は肝臓及び腎臓と判断した。

したがって、本試験の最大耐量（MTD）は1200 ppm、中間用量は250 ppmと判断した。無影響量は雌雄とも50 ppm（雄：1.7 mg/kg/日、雌：1.5 mg/kg/日）であると判断された。