

5. 亜急性毒性

- (1) マンデストロビン原体のラットを用いた飼料混入投与による 13 週間反復経口投与毒性試験 (資料 5-1)

試験機関 : Covance Laboratories Ltd.

[GLP 対応]

報告書作成年 : 2011 年

検体 : マンデストロビン原体

検体純度 :

供試動物 : CrI:WI (Han) 系ラット、1 群雌雄各 12 匹、投与開始時週齢 : 約 7 週齢、

投与開始時体重 : 雄 170.1~214.7 g、雌 127.5~179.2 g

投与期間 : 13 週間 (投与開始 : 2009 年 2 月 6 日、最終屠殺 : 2009 年 5 月 11 日 (雄) あるいは 2009 年 5 月 12 日 (雌))

投与方法 : 検体を 0、800、4000、10000 および 20000 ppm の濃度で飼料に混入し、少なくとも 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 1 週間に 1 回調製した。

用量設定根拠 :

観察・検査項目および結果 :

一般状態および死亡率 ; 毎日 2 回、全動物について、一般状態および生死を観察し、詳細な症状観察を週 1 回の頻度で実施した。

検体投与に関連した毒性臨床所見または行動異常は認められなかった。

4000 ppm 群において雌 1 匹の死亡が認められた。肉眼的病理検査および病理組織学的検査において検体投与に起因する所見は認められなかった。

体重変化 ; 投与前 7 日、投与初日の投与前、それ以降は週 1 回および剖検前に全生存動物の体重を測定した。

項目	検査時期	投与量 (ppm)									
		雄					雌				
		800	4000	10000	20000		800	4000	10000	20000	
体重増加量	投与開始～投与13週	109	103	98	85	A	95	95	103	89	A

A：一元配置分散分析後、Dunnett 検定を用いて対照群との有意差検定を行った。

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

統計学的に有意ではなかったものの、体重増加量の低値が 20000 ppm 群の雌雄で認められた。

その他の群では検体投与による影響は認められなかった。

摂餌量；飼料摂餌量を投与1週間前から週1回測定した。

週ごとの摂餌量において群間でばらつきが認められたが、検体投与の影響を示唆する一貫したパターンは認められなかった。

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)		800	4000	10000	20000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	54.0	282.6	742.7	1544.6
	雌	61.6	320.1	788.5	1886.5

行動機能 (FOB) 観察および自発運動量検査；投与開始前、およびその後は週1回、全動物を対象として以下の行動機能 (FOB) 観察を行った。

ホームケージ内での観察 (姿勢、活動性、歩行、振戦、痙攣、過度の発声、ケージを開けたときの覚醒状態)、ケージから取り出しての観察 (取り出しやすさ、取り扱いやすさ、過度の発声、振戦、痙攣、眼瞼閉鎖、眼球突出、流涙、流涙の種類、流涎、呼吸、立毛、被毛の様子、その他)、オープンフィールドでの観察 (第一歩までの時間、姿勢、覚醒状態、回転運動、歩行状態、歩行状態の程度、常同行動、振戦、痙攣、立ち上がり回数、糞および尿だまりの数、糞の硬さおよび多尿の有無、その他)

また、投与13週に以下の評価を行った。

オープンフィールドでの観察 (接近反応、接触反応、尾の痛覚反応、空中立ち直り能力、瞳孔反応、角膜反射、聴覚驚愕反応、後肢の開脚幅、前肢および後肢の握力)、自発運動量 (2分間隔で30分間)

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							
		0	800	4000	10000	20000		0	800	4000	10000	20000			
第一歩までの 時間 (秒)	3	2	0	0	↓0	↓0	A	0	0	0	0	0	X		
	10	1	0	0	↓1	↓0	A	0	0	0	0	0	X		
立ち上がり回数	6	100	100	145	73	109	A	100	↑153	126	121	116	A		
	8	100	100	↑156	89	144	A	100	105	110	105	100	A		
	9	100	85	123	↓69	100	A	100	105	115	115	110	A		
	11	100	69	115	77	92	A	100	↑159	124	124	112	A		
	12	100	138	↑162	108	131	A	100	111	100	94	111	A		
前肢握力	13	100	99	103	105	↓74	A	100	105	94	101	99	A		
自 発 運 動 量	AMB	2~4分	13	100	100	108	92	100	A	100	44	↓33	↓22	67	A
		2~4分	13	100	108	115	92	105	A	100	↓53	↓44	↓31	59	A
	TOT	20~22分	13	100	217	↑383	150	67	A	100	150	83	217	117	A
		22~24分	13	100	225	450	↑525	75	A	100	↑375	150	275	200	A

A: 一元配置分散分析後、Dunnell 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)。

X: 統計解析実施せず (異なる値が少なかったため)。

AMB: 1秒以内に光ビーム2つ以上が遮断された場合の数。

TOT: 測定期間中、光ビーム1つが遮断された場合の数。

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 (ただし、第1歩までの時間を除く)。

検体投与に関連した影響は、雌雄ともにいずれの投与量においても認められなかった。

自発運動量のデータについては、雌雄ともに、一貫性のあるパターンが認められず、明らかな用量相関性もなかったことから、明確な投与の影響は認められなかった。

以上のように、いずれの検査によっても検体による神経毒性的影響を示唆する所見は認められなかった。

申請者注:

雄で認められた第一歩までの時間の有意な低値について、本変化はいずれも軽微な短縮であり、発現時期も3および10週のみの一過性の変化であったことから、検体投与の影響とは考えられなかった。また、雌雄で認められた立ち上がり回数の有意な変動については用量相関性が認められず、検体投与の影響とは考えられなかった。

血液学的検査：投与 13 週に全動物を対象として、一晩の絶食後、外側尾静脈から血液を採取し、以下の項目の測定を行った。

ヘモグロビン濃度、赤血球数、血中血球容積、絶対網状赤血球数、平均赤血球容積、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、総白血球数、白血球分類、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間

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。

項目	投与量 (ppm)										
	雄					雌					
	800	4000	10000	20000		800	4000	10000	20000		
ヘモグロビン濃度	99	99	99	↓97	A	100	97	100	↓96	A	
MCH	99	99	98	↓96	A	98	99	100	98	A	
MCHC	100	98	99	↓97	A	98	99	97	98	A	
白血球分類	好中球	77	85	92	↓69	A	83	100	100	100	A
	単球	100	100	50	↓50	B	100	100	100	100	B

A：一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Dunnett 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)。

B：Kruskal-Wallis ANOVA 後、Wilcoxon の順位和検定を用いて対照群との有意差検定を行った (↑ ↓: 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。

20000ppm 群の雄でヘモグロビン濃度、MCH、MCHC、好中球数および単球の低値、20000ppm 群の雌でヘモグロビン濃度の低値が認められた。

平均値および背景値を次表に示す。

雄			
投与量 (ppm)	0	20000	背景値
ヘモグロビン濃度 (g/dL)	16.7	16.2	14.5-18.0
MCH (pg)	18.2	17.5	16.6-19.8
MCHC (g/dL)	35.5	34.6	31.5-36.2
好中球数 (10 ⁹ /L)	1.3	0.9	0.5-3.0
単球数 (10 ⁹ /L)	0.2	0.1	0.0-0.3
雌			
投与量 (ppm)	0	20000	背景値
ヘモグロビン濃度 (g/dL)	15.7	15.0	14.2-17.0

背景値：試験機関の背景値 (95%信頼区間) で、試験報告書に記載された値
 検体投与による明らかな影響あるいは毒性影響は認められなかった。

検体投与群において認められた統計学的に有意な変化については全て背景値の範囲内であり（本文表1）雌雄間で一貫性がないことから、毒性学的意義はないと考えられた。

血液生化学検査；投与13週に全動物を対象として、一晩の絶食後、外側尾静脈から血液を採取し、血漿を用いて、以下の項目の測定を行った。

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）、アルカリ性ホスファターゼ、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ（GGT）、ナトリウム、カリウム、カルシウム、無機リン、クロール、総蛋白、アルブミン、グロブリン、アルブミン/グロブリン比、総コレステロール、血糖、尿素、総ビリルビン、クレアチニン、トリグリセライド

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。

項目	投与量 (ppm)									
	雄					雌				
	800	4000	10000	20000		800	4000	10000	20000	
AST	↓87	88	92	↓83	A	96	94	91	↓82	A
ALT	↓72	↓70	85	↓70	A	100	110	103	97	A
GGT	100	100	100	↑250	B	100	100	150	↑200	B
ナトリウム	↓99	99	↓99	100	A	99	99	99	100	A
カリウム	102	100	100	104	A	100	100	↑115	↑115	A
カルシウム	99	98	100	101	A	99	99	↑104	↑105	A
総蛋白	101	101	103	103	A	99	99	104	↑108	A
アルブミン	100	102	104	104	A	102	98	104	↑106	A
総コレステロール	110	115	↑130	↑140	A	113	120	↑167	↑173	A
総ビリルビン	95	↓71	↓67	↓67	B	86	↓67	95	105	B
クレアチニン	95	95	97	97	A	100	95	100	↓85	A

A：一元配置分散分析（ANOVA）後、Dunnnett 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、↑↑↓↓：P < 0.001）。

B：Kruskal-Wallis ANOVA 後、Wilcoxon の順位和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）。

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。

20000 ppm 群の雌雄において GGT の統計学的に有意な増加が認められた。

10000 および 20000 ppm 群の雌雄で総コレステロールの統計学的に有意な増加が認められたが、10000 ppm 群における変化については、その他の血液生化学検査項目に影響が認められないことから、毒性影響とは考えられなかった。

平均値および背景値の範囲を次表に示す。

雄						
投与量 (ppm)	0	800	4000	10000	20000	背景値
AST (IU/L)	75	65	-	-	62	50-87
ALT (IU/L)	46	33	32	-	32	26-69
ナトリウム (mmol/L)	145	144	-	144	-	132-148
総ビリルビン ($\mu\text{mol/L}$)	2.1	-	1.5	1.4	1.4	0.5-2.9
雌						
投与量 (ppm)	0	800	4000	10000	20000	背景値
AST (IU/L)	68	-	-	-	56	49-103
カリウム (IU/L)	4.1	-	-	4.7	4.7	3.5-5.0
カルシウム (IU/L)	2.73	-	-	2.85	2.88	2.54-2.91
総蛋白 (g/L)	71	-	-	-	77	63-78
アルブミン (g/L)	48	-	-	-	51	34-56
総ビリルビン ($\mu\text{mol/L}$)	2.1	-	1.4	-	-	1.0-3.5
クレアチニン ($\mu\text{mol/L}$)	40	-	-	-	34	26-51

背景値：試験機関の背景値（95%信頼区間）で、試験報告書に記載された値

-：有意差認めず。

その他、検体投与群において認められた統計的に有意な変化については全て、対照群との差は小さく、背景値範囲内であり（本文表 2）、雌雄間で一貫性がなく、一部は用量相関性も認められなかったことから検体投与の影響ではないと考えられた。

尿検査；投与 12 週に各群雌雄各 6 匹を対象として 6 時間にわたり採取した尿について以下の項目を検査した。

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

検体投与の影響を示唆する明らかな変化は認められず、また、統計的に有意な変化も認められなかった。

眼科学的検査；投与開始前に全ての動物について、また、投与 12 週に対照群および 20000 ppm 群の動物について検査した。

検体投与に関連した眼科学的異常は認められなかった。

臓器重量；試験終了時の全生存動物を対象として、以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。なお、左右の臓器は合わせて測定した。

脳、心臓、肝臓、胸腺、腎臓、副腎、脾臓、精巣（精巣上体を含む）、卵巣

および子宮

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)	800	4000	10000	20000		800	4000	10000	20000	
最終体重		103	99	96	92	A	97	97	98	96	A
肝臓	重量	108	↑↑114	↑↑122	↑↑144	B	95	105	↑↑117	↑↑144	A
	対体重比	105	↑↑115	↑↑128	↑↑157	AT	98	108	↑↑119	↑↑150	A
心臓	重量	102	101	105	105	A	93	95	95	95	A
	対体重比	100	102	110	↑↑114	A	96	98	97	99	A
脳	重量	101	98	98	↓95	A	99	99	99	99	A
	対体重比	98	99	103	104	A	102	102	101	103	A

A: 一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Dunnett 検定を用いて対照群との有意差検定を行った (↑ ↓ : P < 0.01, ↑↑ ↓↓ : P < 0.001)。

B: Kruskal-Wallis ANOVA 後、Wilcoxon の順位和検定を用いて対照群との有意差検定を行った (↑ ↓ ↓↓ : P < 0.001)。

T: 対数変換した値について統計解析を行った。

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

肝臓の絶対重量および対体重比の高値が雄の 4000 ppm 以上の群および雌の 10000 ppm 以上の群で認められた。病理組織学的検査では、これらの肝臓重量の増加に対応して肝細胞肥大が認められたが、4000 ppm および 10000ppm 群では、血液生化学検査において検体投与に関連する変化が認められなかったことからこれらの肝細胞肥大を伴う肝臓重量の増加は適応性変化であり検体投与の毒性影響ではないと考えられた。一方、20000 ppm 群においては血液生化学検査において総コレステロール値および GGT の増加が認められているため、肝臓の変化は毒性学的意義があるものと考えられた。

雄の 20000ppm 群で認められた心臓および脳の統計学的に有意な変化については、背景値の範囲内であり、関連する肉眼的あるいは病理組織学的所見も認められないことから、検体投与の影響ではないと考えられた。

平均値および背景値の範囲を次表に示す。

雄			
投与量 (ppm)	0	20000	背景値
心臓 (対体重比)	0.273	0.312	0.2425-0.3408
脳 (重量)	2.053	1.956	1.780-2.144

背景値: 試験機関の背景値 (95%信頼区間) で、試験報告書に記載された値

肉眼的病理検査；途中死亡および試験終了時の全生存動物について剖検を行った。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

性別		雄					雌				
		0	800	4000	10000	20000	0	800	4000	10000	20000
肝臓	所見\検査動物数	12	12	12	12	12	12	12	11	12	12
	肥大	0	0	2	7**	10***	0	0	0	0	4
	斑	0	0	1	3	5*	0	0	0	0	0

Fisherの直接確率検定(両側検定)を用いて対照群との有意差検定を行った(*:P<0.05, **:P<0.01, ***:P<0.001)。

肝臓では、肥大が4000、10000および20000 ppm群の雄、20000 ppm群の雌に認められ、また、斑が4000、10000および20000 ppm群の雄で認められた^{申請者注}。

病理組織学的検査；対照群、20000 ppm群および死亡動物を対象として、以下の全組織について病理標本を作製し、鏡検を実施した。

副腎、大動脈、脳、盲腸、結腸、十二指腸、眼球、大腿骨(骨髄および関節面を含む)、ハーダー腺、心臓、回腸、空腸、腎臓、喉頭、肝臓、肺(主気管支および細気管支を含む)、乳腺、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、筋肉(大腿四頭筋)、鼻甲介、鼻咽頭/鼻孔、食道、視神経、卵巣、膵臓、パイル板、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺(顎下腺、舌下腺および耳下腺)、坐骨神経、精囊、皮膚、頸髄、腰髄、胸髄、脾臓、胸骨(骨髄を含む)、胃、精巣および精巣上体、胸腺、甲状腺および上皮小体、舌、気管、膀胱、子宮および膈、肉眼的病変

また、対照群および20000 ppm群の検査結果より、肝臓、甲状腺および腎臓に投与に起因すると考えられる所見が認められたため、800、4000および10000 ppm群の動物を対象として、以下の組織について病理標本を作製し、鏡検を実施した。

肝臓、甲状腺、腎臓(雄のみ)および肉眼的病変

さらに、対照群の雄2匹および20000 ppm群の雄2匹の腎臓について、 $\alpha_2\text{u}$ グロ

申請者注：肝臓の肥大および斑について

4000および10000 ppm群の雄で認められた肝臓の肥大については、血液生化学検査において検体投与に関連する変化が認められなかったことから適応性変化であると考えられた。一方、20000 ppm群の雄で認められた肝臓の肥大は、血液生化学検査において総コレステロール値およびGTTの増加が認められたことから検体投与の毒性影響であると考えられた。20000 ppm群の雄で認められた肝臓の斑は、組織学的に死戦期のうっ血あるいは出血に対応するものと考えられた。

プリンに関する免疫組織化学染色を実施した。

統計学的有意差が認められた主な所見および腎臓における免疫組織化学的検査結果を、次表に示す。

性 別		雄					雌					
投与量 (ppm)		0	800	4000	10000	20000	0	800	4000	10000	20000	
肝臓	所見\検査動物数	12	12	12	12	12	12	12	11	12	12	
	肝細胞肥大	合計	0	0	12	12	12	0	0	4	9	12
		軽微	0	0	5	0	0	0	0	4	6	0
		軽度	0	0	7	0	0	0	0	0	3	0
		中等度	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0
		やや重度	0	0	0	5	1	0	0	0	0	3
		重度	0	0	0	0	11	0	0	0	0	9
				***	***	***		*	***	***		
	死戦期うっ血/出血	0	0	1	3	5*	2	0	0	0	0	
甲状腺	所見\検査動物数	12	12	12	12	12	12	12	11	12	12	
	濾胞細胞肥大	合計	2	2	6	9	7	2	1	4	5	6
		軽微	2	2	6	8	5	2	1	4	5	6
		軽度	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0
				*								
腎臓	所見\検査動物数	12	12	12	12	12	12	0	0	0	12	
	硝子滴	合計	10	9	11	11	12	0	0	0	0	0
		軽微	6	6	6	3	2	0	0	0	0	0
		軽度	4	3	4	7	8	0	0	0	0	0
		中等度	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0
					*							
腎臓- 免疫組 織化学 的検査	所見\検査動物数	2	-	-	-	2	-	-	-	-	-	
	α _{2u} グロブリン 陽性	合計	2	-	-	-	2	-	-	-	-	
		軽微	1	-	-	-	0	-	-	-	-	
		軽度	1	-	-	-	0	-	-	-	-	
		中等度	0	-	-	-	2	-	-	-	-	

程度分類のある所見については Wilcoxon の順位和検定 (両側検定)、程度分類のない所見については Fisher の直接確率検定 (両側検定) を用いて対照群との有意差検定を行った (ただし、腎臓の免疫組織化学的検査結果を除く、* : P < 0.05、*** : P < 0.001)。

肝臓において、4000ppm 以上の群の雌雄に肝細胞の肥大が認められ、その頻度および程度は用量相関的に増強した。4000ppm および 10000ppm 群の変化は血液生化学検査において検体投与に関連する変化が認められなかったことから、適応反応として認められるものであり、毒性学的意義がないものと考えられた。しかし、20000 ppm 群では、肝臓に関連すると考えられる血液生化学的パラメータの変動を伴い、この 20000 ppm 群における肝臓の変化は毒性学的意義があ

るものと考えられた。また、肝臓で検体投与群の雄で認められたうっ血あるいは出血については死戦期の変化であり、検体による毒性影響とは考えられなかった。

甲状腺で濾胞細胞肥大の発現頻度が、4000ppm以上の群で増加した。ラットにおける甲状腺濾胞細胞の肥大は肝臓における甲状腺ホルモンの代謝亢進に伴う適応変化であり、毒性影響とは考えられなかった。さらにラットおよびヒト間の甲状腺ホルモン代謝に対する感受性の違いを示唆する甲状腺機能における生化学的、生理学的な差異があることから、この甲状腺の変化はヒトのリスク評価にはほとんど関連性がないと考えられた。

腎臓において雄で硝子滴沈着が認められ、その程度は10000ppm以上の群で対照群と比較して強かった。これに対応して免疫組織化学染色により α_{2u} グロブリン陽性が認められたが、20000ppm群での程度は対照群よりも強いものであった。腎臓での α_{2u} グロブリンの蓄積は生体異物に対する反応として雄ラットでは通常認められる所見であるが、雄ラットに特異的でありヒトには関連性がない変化であることから、本試験における無毒性量の判断には考慮しなかった^{中略}者注。

以上の結果から、マンデストロピン原体のラット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、20000ppm群において体重増加量の減少、肝臓重量の増加、肝細胞肥大、血液生化学検査における総コレステロールおよび γ -グルタミルトランスフェラーゼの増加が認められた。なお、詳細な行動機能(FOB)観察で神経毒性は認められなかった。

これらの結果から、本試験における無毒性量は雌雄とも10000ppm(雄742.7mg/kg/日、雌788.5mg/kg/日)であると判断された。

申請者注：

α_{2u} グロブリンは性成熟したラットの雄の肝臓で合成されるミクログロブリンであり、正常の雄ラットの腎臓尿細管上皮細胞内ライソゾームで認められる。数多くの化合物が α_{2u} グロブリンに結合し、雄ラットに硝子滴を蓄積させるが、ヒトを含め他の動物種には存在せず、このミクログロブリンによる腎症発症や、それによる腎腫瘍発生もヒトに外挿しないと考えられている(以下文献参照)。

- ・ Hamamura M, Hirose A, Kamata E, et al. Semi-quantitative immunohistochemical analysis of male rat-specific alpha2u-globulin accumulation for chemical toxicity evaluation. J Toxicol Sci. 2006, 31, 35-47.
- ・ Doi AM, Hill G, Seely J, et al., alpha 2u-globulin nephropathy and renal tumors in national toxicology program studies. Toxicol Pathol. 2007, 35, 533-40.

(2) マンデストロピン原体の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5-2)

試験機関: Covance Laboratories Ltd.

[GLP 対応]

報告書作成年: 2011 年

検体: マンデストロピン原体

検体純度:

供試動物: CrI:CD1 (ICR) 系マウス、1群雌雄各12匹、投与開始時週齢: 約7週齢、

投与開始時体重: 雄 30.6~38.1 g、雌 22.2~28.9 g

投与期間: 13週間 (投与開始: 2009年2月10日、最終屠殺: 2009年5月14日)

投与方法: 検体を0、1750、3500および7000 ppmの濃度で飼料に混入し、少なくとも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1週間に1回調製した。

用量設定根拠;

観察・検査項目および結果:

一般状態および死亡率; 毎日、全動物について、一般状態および生死を観察し、さらに、週1回、詳細な症状観察を行った。

途中死亡は認められなかった。また、検体投与に関連した毒性臨床所見または行動異常は認められなかった。

体重変化; 投与前7日、投与初日の投与前、それ以降は週1回および剖検前に全生存動物の体重を測定した。

雄では、体重および体重増加量において統計学的に有意な影響は認められなかった。

雌では対照群と比較して平均総体重増加量が投与群において低値(1750、3500、7000 ppm群でそれぞれ90%、89%、73%)であり、7000 ppm群の動物では統計学的に有意であった(一元配置分散分析およびDunnett検定、 $P < 0.05$) が、変化の程度から雌の増加量の抑制に毒性学的意義はないと考えられた。

摂餌量；飼料摂餌量を投与1週間前から週1回測定した。

全投与期間において統計学的に有意な摂餌量の変化は認められなかった。

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)		1750	3500	7000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	204.1	404.9	807.3
	雌	251.8	529.1	1111.2

血液学的検査；投与13週目に各群雌雄各6匹を対象として、眼窩静脈叢穿刺法で血液を採取し、以下の項目の測定を行った。

ヘモグロビン濃度、赤血球数、血中血球容積、絶対網状赤血球数、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、血小板数、総白血球数、白血球分類

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。

項目	投与量 (ppm)					
	雄			雌		
	1750	3500	7000	1750	3500	7000
ヘモグロビン	98	↓90	97	102	101	97
血中血球容積	100	↓93	100	102	102	98
血小板数	↑136	112	↑129	87	89	98

二元配置分散分析後、Dunnett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)。

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。

3500 ppm 群の雄でヘモグロビン濃度および血中血球容積に統計学的に有意な減少が認められた。しかし、用量相関性がないこと、また、平均値(ヘモグロビン 13.2 g/dL、血中血球容積 41.6%)が背景値の範囲内(ヘモグロビン 12.0~15.1 g/dL、血中血球容積 38.0~50.4%)であることからこれらの変化は投与に起因するものではないと考えられた。

1750 および 7000 ppm 群の雄で認められた血小板数の統計学的に有意な増加は、用量相関性がなく、7000 ppm 群の値(1666 × 10⁹/L)が背景値の範囲内(941 × 10⁹~1721 × 10⁹/L)であることから投与に起因するものではないと考えられた。

平均赤血球血色素濃度において、有意な用量相関性のある変化が認められたが、変化が小さく、対照群との間に有意差は認められないことより、投与に起因するものではないと考えられた。

血液生化学検査：投与 13 週目に各群雌雄各 6 匹を対象として、眼窩静脈縦穿刺法で血液を採取し、得られた血漿を用いて、以下の項目の測定を行った。

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

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。

項目	投与量 (ppm)					
	雄			雌		
	1750	3500	7000	1750	3500	7000
血糖	109	104	102	95	86	↓84

二元配置分散分析後、Dunnell 検定を用いて対照群との有意差検定を行った (↑ ↓: $P < 0.05$)。

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の。

7000 ppm 群の雌で平均血糖値に統計学的に有意な減少が認められたが、7000 ppm 群の値 (9.1 mmol/L) が背景値の範囲内 (7.9~12.0 mmol/L) であることから投与に起因するものではないと考えられた。

クロール、尿素および総ビリルビンにおいて、有意な用量相関性のある変化が認められたが、対照群との間に有意差は認められないことより、投与に起因するものではないと考えられた。

臓器重量；試験終了時の全生存動物を対象として、以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。なお、左右の臓器は合わせて測定した。

副腎、腎臓、脾臓、肝臓、心臓、脳、胸腺、精巣 (精巣上体を含む)、卵巣および子宮

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。

項目	投与量 (ppm)						
	雄			雌			
	1750	3500	7000	1750	3500	7000	
最終体重	101	98	102	98	96	94	
脾臓	重量	108	119	108	105	92	104
	対体重比	107	↑124	106	107	96	111
肝臓	重量	105	107	↑↑117	110	104	114
	対体重比	104	↑109	↑↑115	↑112	108	↑↑122

一元配置分散分析後、Dunnett 検定を用いて対照群との有意差検定を行なった (↑↓: P < 0.05, ↑↓: P < 0.01, ↑↑ ↓↓: P < 0.001)。

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

肝臓の絶対重量および対体重比の平均値はすべての群で雌雄ともに増加した。肝臓に病理組織学的所見は認められず、薬物代謝に関連する適応性変化であり、毒性影響ではないと考えられた。

3500 ppm 群の雄で脾臓の体重比重量が対照群と比較して統計学的に有意に増加した。しかし、用量相関性がないことから投与に起因するものではないと考えられた。

他の全臓器において認められた変化は、通常の個体差を反映した偶発的なものと考えられた。

肉眼的病理検査；試験終了時に全動物について剖検を行った。

対照群と比べ統計学的に有意な変化は認められなかった。

病理組織学的検査；対照群、7000 ppm 群の以下に示す全組織、1750 および 3500 ppm 群の肝臓および甲状腺、すべての動物の病変部位について、病理標本作製し、検鏡した。

副腎、大動脈、脳、盲腸、結腸、十二指腸、眼球、大腿骨（骨髄および膝関節を含む）、胆嚢、ハーダー腺、心臓、回腸、空腸、腎臓、涙腺、喉頭、肝臓、肺（主気管支および細気管支を含む）、乳腺、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、筋肉（大腿四頭筋）、鼻腔、鼻咽頭／鼻孔、食道、視神経、卵巣、膵臓、パイエル板、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺（顎下腺、舌下腺および耳下腺）、坐骨神経、精嚢、皮膚および皮下組織、頸髄、腰髄、胸髄、脾臓、胸骨（骨髄を含む）、胃、精巣および精巣上体、胸腺、甲状腺および上皮小体、舌、気管、膀胱、子宮、膈、ジンバル腺および肉眼的病変

対照群と比較して統計学的有意差が認められた病理組織学的所見を次表に示した。

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		0	1750	3500	7000	0	1750	3500	7000
顎下リンパ節	所見\検査動物数	12	0	2	12	12	1	1	12
	リンパ組織過形成 軽微	0	0	2*	0	0	0	0	0
卵巢	所見\検査動物数	-	-	-	-	12	5	4	12
	嚢胞	-	-	-	-	0	4**	1	0
副腎	所見\検査動物数	12	3	1	12	12	0	0	12
	皮髄境界部空胞化 合計	0	0	0	0	12	0	0	9
	軽微	0	0	0	0	6	0	0	7
	軽度	0	0	0	0	3	0	0	1
	中等度	0	0	0	0	3	0	0	1

-: 該当臓器なし

程度分類のある所見については Wilcoxon の順位和検定 (両側検定)、程度分類のない所見については Fisher の直接確率検定 (両側検定) を用いて対照群との有意差検定を行った (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$)。

ほとんどの組織に病理組織学的な異常は認められず、発現した所見は同系統・同週齢のマウスに通常認められるものであった。検体投与に起因する病理組織学的所見は認められなかった。

マンデストロピン原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いて、投与に関連すると考えられる毒性影響は認められなかった。

以上の結果から、本試験における無毒性量は雌雄とも 7000 ppm (雄 807.3 mg/kg/日、雌 1111.2 mg/kg/日) であると判断された。

(3) マンデストロピン原体のイヌ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 5-3)

試験機関: Covance Laboratories Ltd.

[GLP 対応]

報告書作成年: 2011 年

検体: マンデストロピン原体

検体純度:

供試動物: ビーグル犬、1群雌雄各4匹、投与開始時週齢; 20~24週齢、

投与開始時体重; 雄 10.21~12.01 kg、雌 8.38~10.74 kg

投与期間: 13週間 (投与開始; 2009年8月19日、最終屠殺; 2009年11月18日 (雄) あるいは2009年11月19日 (雌))

投与方法: 検体を0、4000、12000および40000 ppmの濃度で飼料に混入し、少なくとも13週間にわたって毎日約8時間、約300gの飼料を自由に摂食させた。検体を混入した飼料は1週間に1回調製した。

用量設定根拠;

観察・検査項目および結果:

一般状態および死亡率; 毎日2回全動物について、一般状態および生死を観察した。

40000 ppm群において、雄3匹および雌1匹に消瘦が認められたが、これは体重あるいは体重増加量の減少、摂餌量の減少、ならびに機能観察総合検査 (FOB) における筋緊張低下と概ね相関していた。

その他、検体投与に関連する変化は認められなかった。

すべての動物において途中死亡は認められなかった。

体重変化；投与-3週から剖検前まで、週1回全動物の体重を測定した。

主な測定時点の体重を次表に示した。

性別	雄			雌		
	4000	12000	40000	4000	12000	40000
5週	98	99	↓88	100	100	↓85
6週	97	99	↓87	101	99	↓83
7週	95	99	↓86	99	98	↓81
8週	97	99	↓85	99	98	↓79
9週	98	98	↓84	98	98	↓78
10週	98	100	↓84	98	99	↓77
11週	97	98	↓81	97	98	↓76
12週	97	97	↓79	97	97	↓74
13週	96	97	↓74	97	97	↓73

二元配置分散分析後、Dunnett 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、↓↓↓: P<0.001)。

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの。

40000 ppm 群の雌雄で統計学的に有意な平均体重の低値または平均体重増加量の減少が認められた。

摂餌量；群分け時より毎日、全動物の摂餌量を測定し、g/匹/週を算出した。

摂餌量の平均を次表に示した。

性別	雄			雌		
	4000	12000	40000	4000	12000	40000
総平均	100	100	↓↓92	100	98	↓↓68

二元配置分散分析後、Dunnett 検定を用いて対照群との有意差検定を行った (↓↓: P<0.001)。

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの。

40000 ppm 群の雌雄で統計学的に有意な平均摂餌量の低値が認められ、体重および体重増加量の低下と相関していた。

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)		4000	12000	40000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	90.9	267.8	933.1
	雌	102.7	304.4	820.4

行動機能 (FOB) 観察；投与開始前、およびそれ以降、週1回、全動物を対象として行動機能 (FOB) 観察検査を行った。非拘束下での行動を約1~2分間観察し、以下の項目について調べた。

意識レベル、全体的な活動レベル、頭位、頭部協調性、首の姿勢、旋回、四肢の姿勢 (立位)、歩行、振戦、異常行動、固視反応、聴覚性驚愕反応検査

また、非拘束下観察後に、神経学的検査を実施し、以下の項目について調べた。

固有受容性位置反応、立ち直り反応、半跳び直り反応、手押し車反応、筋緊張、眼瞼閉鎖状態、瞬膜、眼瞼反射、眼球位置、眼球運動、瞳孔の大きさ、瞳孔対光反射、流涙、流涎、全身反応、一般状態観察*

*: 体重、一般状態、心拍数および直腸温を神経行動学的影響評価の一環として測定した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示した。

平均体温において、12000 ppm 群の雌雄および 40000 ppm 群の雄で、散発的に対照群と比較して統計学的に有意な変化が認められた。また、3 週目に雌で有意な用量相関性が認められたが、対照群との間に有意差は認められないことにより、投与に起因するものではないと考えられた。これらの変化は一過性で一貫性がなく、検体投与と関連がないと考えられた。

平均心拍数において、4000 ppm 群の雄および 12000 ppm 群の雌で散発的に対照群と比較して有意な変化が認められた。雌では 13 週目に有意な用量相関性が認められたが、対照群との間に有意差は認められないことにより、投与に起因するものではないと考えられた。これらの変化は一過性で一貫性がなく、検体投与と関連がないと考えられた。

非拘束下観察で認められた行動の発生頻度において、対照群と投与群で明らかな違いはなかった。

全体として、いずれの検査においても検体の神経毒性作用を示唆する所見はみられなかった。

項目	検査 時期 (週)	投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		4000	12000	40000	4000	12000	40000
体温	4	101	101	↓ 98	101	↓ 98	99
	6	99	↓ 98	99	99	↓ 98	99
	12	100	↑ 102	101	101	101	101
	13	101	101	↑ 102	101	101	101
心拍数	4	97	111	109	125	↑ 135	124
	6	98	94	104	112	↑ 119	113
	10	↓ 83	90	85	102	100	99

二元配置分散分析後、Dunnett 検定 (両側) を用いて対照群との有意差検定を行った (↑ ↓ : 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

血液学的検査 ; 投与前 (投与-1週)、4、8 および 13 週目に全動物を対象として、頸静脈から血液を採取し、以下の項目の測定を行った。

ヘモグロビン濃度、赤血球数、血中血球容積、血小板数、網状赤血球数、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、総白血球数、白血球分類、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示した。

項目	検査 時期 (週)	投与量 (ppm)								
		雄				雌				
		4000	12000	40000		4000	12000	40000		
赤血球数	8	95	95	94	A	95	99	↓ 93	A	
MCHC	8	99	99	↓ 97	A	101	101	100	A	
血小板数	4	115	116	↑ 135	A	127	110	127	A	
	8	110	107	↑ 147	A	127	115	↑ 153	A	
	13	119	117	145	A	128	122	↑ 169	A	
プロトロンビン時間	4	108	105	↑ 110	A	100	100	108	A	
	8	105	105	105	A	98	102	↑ 108	A	
白血球数	13	102	105	↑ 134	A	105	112	116	A	
白血球分類	好中球	13	109	104	↑ 155	A	106	106	110	A
	リンパ球	4	88	113	98	A	109	126	↑ 146	A
	単球	13	100	100	↑ 183	B	83	83	100	B
	好酸球	4	100	200	↑ 300	B	150	200	150	B

A : 二元配置分散分析 (ANOVA) を行い、Dunnett 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)。

B : Kruskal-Wallis ANOVA 検定を行い、Wilcoxon の順位和検定を用いて対照群との有意差検定を行った (↑ : 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

40000ppm 群の雄で MCHC の低値、プロトロンビン時間、白血球数、好中球数、単球数および好酸球数の高値、40000ppm 群の雌で赤血球数の低値、プロトロンビン時間およびリンパ球数の高値が認められた。これらの統計学的に有意な変化については全て背景値の範囲内であり雌雄間で一貫性がないことから毒性学的意義はないと考えられた。

平均値および背景値の範囲を次表に示す。

雄			
投与量 (ppm)	0	40000	背景値
MCHC (g/dL)	34.3	33.4	31.2-34.6
プロトロンビン時間	6.2	6.8	5.4-11.4
白血球数 ($10^9/L$)	9.4	12.6	8.0-16.6
好中球数 ($10^9/L$)	4.7	7.3	4.2-10.9
単球数 ($10^9/L$)	0.6	1.1	0.0-1.1
好酸球数 ($10^9/L$)	0.2	0.6	0.1-1.0
雌			
投与量 (ppm)	0	40000	背景値
赤血球数 ($10^{12}/L$)	6.90	6.40	6.18-7.93
プロトロンビン時間	6.0	6.5	5.5-10.4
リンパ球数 ($10^9/L$)	3.5	5.1	2.4-6.7

血小板数の統計学的に有意な増加が、投与 4 週に 40000 ppm 群の雄、投与 8 および 13 週に 40000 ppm 群の雌雄で認められたが、その変化の程度は小さく、他の関連する血液学的パラメーターの異常がみられず、また、関連する病理組織学的変化もなかったことから有害な変化ではないと考えられた。

血液生化学検査；投与前（投与-1 週）、投与 4、8 および 13 週に全動物を対象として、頸静脈から血液を採取し、得られた血漿を用いて、以下の項目の測定を行った。

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)、アルカリ性ホスファターゼ (ALP)、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT)、ナトリウム、カリウム、カルシウム、無機リン、クロール、トリグリセリド、総蛋白、アルブミン、グロブリン、アルブミン/グロブリン比 (A/G 比)、総コレステロール、血糖、尿素、総ビリルビン、クレアチニン

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示した。

項目	検査 時期 (週)	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		4000	12000	40000		4000	12000	40000	
AST	4	52	63	130	A	97	131	↑ 207	A
	8	119	135	↑↑ 208	A	100	128	↑↑ 207	A
	13	116	113	↑↑ 156	A	103	130	↑ 157	A
ALT	4	74	271	743	A	97	354	↑ 917	A
	8	82	306	↑ 679	A	95	341	↑ 722	A
	13	81	278	↑↑ 581	A	119	327	↑ 535	A
ALP	4	93	144	↑↑ 328	A	94	150	↑ 243	A
	8	102	↑ 163	↑↑ 332	AT	109	↑ 189	↑↑ 308	AT
	13	107	↑ 174	↑↑ 294	AT	134	↑↑ 229	↑↑ 349	AT
GGT	4	100	100	↑ 300	B	100	100	200	B
	8	100	100	300	B	100	150	350	B
	13	75	75	↑ 250	B	133	167	↑ 267	B
ナトリウム	4	102	↑ 103	101	A	101	100	99	A
カルシウム	8	97	98	↓ 94	A	101	99	98	A
	13	97	98	↓ 94	A	101	100	99	A
無機リン	4	114	↑ 114	↑ 114	A	104	104	104	A
トリグリセライド	4	108	140	168	B	91	98	↑ 221	B
	8	103	110	↑ 156	A	100	110	↑ 151	A
	13	126	124	↑ 182	A	103	111	↑ 176	A
アルブミン	4	100	100	↓ 85	A	97	92	92	A
	8	92	94	↓↓ 78	A	100	97	↓ 86	A
	13	89	94	↓↓ 75	A	100	95	↓↓ 78	A
グロブリン	13	110	100	↑ 145	A	113	113	138	A
A/G比	4	93	93	↓ 71	A	88	88	↓ 88	A
	8	94	100	↓ 61	A	86	91	↓ 68	A
	13	89	94	↓↓ 56	A	83	83	↓↓ 58	A
総コレステロール	4	97	97	↓ 63	A	93	83	97	A
	8	88	86	↓↓ 49	A	95	80	80	A
	13	82	84	↓↓ 48	A	91	78	↓ 73	A
血糖	4	96	96	↓↓ 86	A	96	92	↓↓ 85	A
	8	106	102	↓ 89	A	98	102	↓↓ 83	A
	13	100	102	↓↓ 79	A	104	104	↓ 88	A
クレアチニン	4	91	91	↓ 82	A	102	112	100	A
	13	106	103	87	A	111	↑ 119	107	A

太枠内は検体投与による影響と考えられた変化を示す。

A: 二元配置分散分析 (ANOVA) 後、Dunnell 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, ↑↑ ↓↓: P < 0.001)。

B: Kruskal-Wallis ANOVA 検定を行い、Wilcoxon の順位和検定を用いて対照群との有意差検定を行った (↑: P < 0.05)。

T: 対数変換した値について統計解析を行った。

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値

12000ppm以上の群の雌雄でALTおよびALPの増加、40000ppm群の雌雄でASTおよびトリグリセライドの増加、アルブミン、A/G比および血糖の減少が認められた。

40000ppm群の雄でGGT、グロブリンの増加および総コレステロールの減少、12000ppm以上の群の雌でGGTの増加および総コレステロールの減少が認められた。

その他、12000ppm群の雄でナトリウムの高値、12000ppm群の雌でクレチアニンの増加、40000ppm群の雄でカルシウムの低値およびクレチアニンの減少が認められたが、これらの変化はいずれも背景値の範囲内であり雌雄間で一貫性がないことから毒性学的意義はないと考えられた。

平均値および背景値の範囲を次表に示す。

雄					
投与量 (ppm)		0	12000	40000	背景値
ナトリウム (mmol/L)		143	148	-	141-150
カルシウム (mmol/L)	8週	2.78	-	2.61	2.54-2.98
	13週	2.80	-	2.64	
クレアチニン ($\mu\text{mol/L}$)		55	-	45	52-84
雌					
投与量 (ppm)		0	12000	40000	背景値
クレアチニン ($\mu\text{mol/L}$)		51	68	-	49-77

統計学的に有意な無機リンの増加が12000ppm群および40000ppm群の雄で投与4週に認められたが、その平均値が投与前値と同程度であったこと、ならびに一過性の変化であったため、この変化は検体投与と関連がないと考えられた。

尿検査：投与前（投与-1週）、投与3、7および12週に全動物を対象として採取した尿について以下の項目を検査した。

尿量、色、濁度、比重、pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビン、潜血、尿沈渣

検体の影響を示唆するような一貫した変動パターンは認められなかった。

眼科学的検査：投与開始前（投与-1日）と投与12週（投与80日）に全動物について検査した。

投与開始前および投与12週に眼科学的検査に異常は認められなかった。

臓器重量；試験終了時、全動物を対象として、以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。なお、左右の臓器は合わせて測定した。

副腎、腎臓、脾臓、肝臓、心臓、脳、下垂体、甲状腺（上皮小体を含む）、胸腺、前立腺、精巣（精巣上体を含む）、卵巣および子宮（頸部を含む）

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目および統計学的有意差はないものの、影響が認められた精巣/精巣上体について次表に示した。

性別	雄				雌				
	投与量 (ppm)	4000	12000	40000		4000	12000	40000	
体重		96	97	↓ 79	A	96	96	↓↓ 73	A
腎臓	重量	93	96	103	B	102	100	95	B
	対体重比	96	100	↑ 130	B	107	104	↑ 133	B
脾臓	重量	94	98	148	B	97	116	88	B
	対体重比	98	101	↑ 192	B	104	124	126	B
肝臓	重量	102	115	114	B	124	124	106	B
	対体重比	106	120	↑ 146	B	↑ 131	↑ 131	↑ 148	B
心臓	重量	93	100	↓ 74	B	107	104	79	B
	対体重比	88	100	88	B	114	114	114	B
脳	重量	102	99	103	B	96	96	91	B
	対体重比	100	100	↑ 133	BT	100	100	↑ 133	B
下垂体	重量	103	89	82	B	110	109	93	BT
	対体重比	100	100	100	B	100	100	↑ 100	B
胸腺	重量	83	81	↓ 44	B	101	99	↓ 43	B
	対体重比	87	84	↓ 54	B	108	105	58	B
前立腺	重量	87	66	↓ 26	D	—	—	—	—
	対体重比	91	69	↓ 34	BT	—	—	—	—
精巣/ 精巣上 体	重量	76	85	71	A	—	—	—	—
	対体重比	79	88	89	A	—	—	—	—

A：二元配置分散分析を行い、Dunnett 検定を用いて対照群との有意差検定を行った（↓：P < 0.01、↓↓：P < 0.001）。

B：一元配置分散分析を行い、Dunnett 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、↑↑↑：P < 0.001）。

C：剖検時体重を共変数として、共分散分析を行い、Dunnett 検定を用いて対照群との有意差検定を行った（↑：P < 0.01、↑↑：P < 0.001）。

D：Kruskal-Wallis 検定を行い、Wilcoxon の順位和検定を用いて対照群との有意差検定を行った（↓：P < 0.05）。

T：対数変換した値について統計解析を行った。

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値

肝臓の補正後重量および対体重比の高値が 12000 ppm 以上の群の雄および 4000 ppm 以上の群の雌で認められたが、4000ppm 群の雌では病理組織学的検査におい

て小葉中心性肝細胞腫大がみとめられたものの、関連する血液生化学的検査項目において変化がみられなかったため、4000ppm 群の雌における肝臓重量の高値は毒性学的意義のないと考えられた。

前立腺の絶対重量と対体重比の低値が 40000 ppm 群の雄で認められた。

胸腺重量では 40000 ppm 群の雄（特に 2 匹）と雌で絶対重量や対体重比の低値が認められた。

精巣／精巣上体の絶対重量および対体重比の低値が 40000 ppm 群の雄 3 匹に認められた。

腎臓、脳、下垂体および心臓で認められた臓器重量変化では、関連する血液生化学検査パラメーターの変化を認めず、関連する病理学的変化も認められなかったことから、毒性学的意義はないと考えられた。

脾臓の対体重比の変化は関連する肉眼的および病理学的変化を認めず、平均値が背景データの範囲内であったことから、毒性学的意義はないと考えられた。

脾臓	雄			
	0	4000	12000	40000
投与量 (ppm)	0	4000	12000	40000
対体重比 (平均値) (%)	0.334	0.327	0.336	↑0.640
対体重比の背景値* (%)	0.1883-0.6800			

Dunnett 検定または Steel 検定 (↑: p<0.05)

*背景値 (Mean±2SD, n=103)

また、その他の臓器重量における変化はいずれの通常の個体差による偶発的な変動であると考えられた。

肉眼的病理検査；試験終了時に全動物について剖検を行った。

認められた主要な肉眼的病理所見を次表に示した。

性別	雄				雌				
	0	4000	12000	40000	0	4000	12000	40000	
投与量 (ppm)	0	4000	12000	40000	0	4000	12000	40000	
所見\検査動物数	4	4	4	4	4	4	4	4	
消瘦	0	0	0	3	0	0	0	1	
肝臓	色調暗化	0	0	2	4*	0	0	2	4*
	大型	0	0	3	3	0	0	1	0
胆嚢	異常内容物	0	0	0	4*	0	0	0	3
	膨満	0	0	0	2	0	1	0	1
前立腺	小型	0	2	2	4*	0	0	0	0
胸腺	小型	0	1	0	2	0	0	0	1

Fisher の直接確率検定 (両側) を用いて対照群との有意差検定を行った (*: P<0.05)。

40000 ppm 群の雄 3 匹および雌 1 匹で消瘦が認められた。

12000 ppm 群と 40000 ppm 群の雌雄で肝臓の色調暗化や大型が認められた。

40000 ppm 群の雌雄で胆嚢に異常内容物および膨満が認められた。4000 ppm 群の雌で胆嚢膨満が認められたが、1 頭のみが発現であり、12000 ppm 群で認められなかったことから、検体投与との関連はないものと考えられた。

4000 ppm 以上の群で前立腺の小型が認められた。このうち、4000ppm 群および 12000ppm 群では、病理組織学的検査で対照群と同様に思春期状態であることが確認されており、検体の影響はないと考えられた。

胸腺の小型が 40000 ppm 群で認められた。4000ppm 群の 1 例でも本変化が認められたが、病理組織学的所見は認められず、12000 ppm 群でなんら変化がなかったことから検体投与と関連しないものと考えられた。

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

副腎、大動脈、脳、盲腸、結腸、十二指腸、眼球および視神経、骨髄および関節面を含む大腿骨、胆嚢、心臓、回腸（パイエル板を含む）、空腸、腎臓、涙腺、咽頭、肝臓、主気管支および細気管支を含む肺、乳房、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、筋肉、鼻腔、鼻咽頭、食道、視神経、卵巣、卵管、膵臓、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺（顎下腺、舌下腺、耳下腺）、坐骨神経、皮膚および皮下組織、頸髄、腰髄、胸髄、脾臓、骨髄を含む胸骨、胃、精巣および精巣上体、胸腺、上皮小体を含む甲状腺、舌、気管、尿管、膀胱、子宮（頸部を含む）、臈および肉眼的病変

認められた主要な病理組織学的所見を表に示した。

性 別		雄				雌				
		0	4000	12000	40000	0	4000	12000	40000	
投与量 (ppm)		0	4000	12000	40000	0	4000	12000	40000	
肝臓	所見\検査動物数	4	4	4	4	4	4	4	4	
	色素沈着	合計	0	0	3	4*	0	0	3	4*
		軽微	0	0	2	0	0	0	2	0
		軽度	0	0	1	1	0	0	1	3
		中等度	0	0	0	3	0	0	0	1
	門脈周囲/小葉 中心性線維化	合計	0	0	0	4*	0	0	0	1
		軽微	0	0	0	2	0	0	0	1
		軽度	0	0	0	2	0	0	0	0
	小葉中心性変性	合計	0	0	2	3	0	0	4*	4*
		軽微	0	0	2	2	0	0	4	1
		軽度	0	0	0	1	0	0	0	3
	小葉中心性肝細 胞腫大	合計	0	0	3	1	0	3	3	0
軽微		0	0	3	1	0	2	1	0	
軽度		0	0	0	0	0	1	2	0	
線維性架橋	中等度	0	0	0	1	0	0	0	0	
胆嚢	所見\検査動物数	4	4	4	4	4	4	4	4	
	胆石	0	0	0	4*	0	0	0	1	
	胆汁付着	合計	2	0	1	4	0	1	1	2
		軽微	2	0	1	1	0	1	1	1
		軽度	0	0	0	0	0	0	0	1
中等度		0	0	0	3	0	0	0	0	

程度分類のある所見については Wilcoxon の順位和検定 (両側)、程度分類のない所見については Fisher の直接確率検定 (両側) を用いて対照群との有意差検定を行った (*: P < 0.05)。

肝臓、胆嚢、前立腺、精巣、精巣上体、卵巣および胸腺に検体投与と関連すると考えられる所見が認められた。

肝臓では 4000 または 12000 ppm 投与群の雌および 12000 ppm 以上の雄で小葉中心性肝細胞腫大が、12000 ppm 以上の雌雄で色素沈着と小葉中心性変性、40000 ppm 群の雌雄で門脈周囲/小葉中心性の線維化、40000 ppm 群の雄で線維性架橋が認められた。12000 ppm 群の雄および 40000 ppm 群の雌では肝細胞空胞化が認められた。肝臓の病理所見は検体投与群の雌雄における肝臓重量の高値と一致し、血液生化学検査項目の変動の原因となっていると考えられた。4000 ppm 群では重量増加が認められたが、認められた肝臓所見が雌の小葉中心性肝細胞腫大のみであり、関連する血液生化学パラメーターの変化も認められないこと

から、毒性学的意義のないものと考えられた。

胆嚢では、40000 ppm 群で胆石が認められ、胆汁付着の発生頻度および/またはその程度が対照群と比べて高くなっていた。

40000 ppm 群において、前立腺、精巣および卵巣で臓器重量の低値および/または未成熟が認められ、精巣上体では乏精子症が認められた。これらの変化はストレス、体重低下および非特異的毒性といった検体投与による二次的影響であると考えられた。

生殖器の思春期状態が対照群を含むすべての群の動物で認められ、これは動物の月齢によるもので、検体の影響ではないと考えられた。

胸腺では、40000 ppm 群で臓器重量の低値、肉眼的病理検査において胸腺小型が認められ、病理組織学的検査では軽微または軽度の退縮/萎縮が認められた。これらの変化は、ストレス反応性に認められることから、検体の二次的影響と考えられた。

以上の結果から、肝臓および胆嚢に認められた病理学的変化に基づき、無毒性量は雌雄とも 4000 ppm (雄 90.9 mg/kg/日、雌 102.7 mg/kg/日) であると判断された。

6 反復経皮投与毒性

マンデストロビン原体のラットにおける 28 日間反復経皮投与毒性試験 (資料 6)

試験機関：三菱化学メディエンス株式会社
[GLP 対応]

報告書作成年：2011 年

検体：マンデストロビン原体

検体純度：

供試動物：Slc:Wistar ラット、1 群雌雄各 10 匹

投与開始時：8 週齢、体重：雄 191.8~230.6g、雌 128.7~163.5g

投与期間：28 日間

雄 (2010 年 9 月 29 日~10 月 26 日)、雌 (2010 年 10 月 1 日~10 月 28 日)

投与方法：初回投与の約 24 時間前に動物の背部を剪毛した。投与開始後は適当な頻度 (7、14、21 および 28 日) で剪毛した。不浸透性シートを裏打ちした 2 重のガーゼシート (約 4 cm × 5 cm) に検体を塗布し、約 0.3 mL の注射用水で十分に湿らせて、剪毛した皮膚に 100、300 および 1000 mg/kg の投与量で 1 日約 6 時間、28 日間反復して閉塞適用した。適用後は微温湯に浸したガーゼシートで適用部位を拭き、その後、乾いたティッシュペーパーで拭いた。対照群の動物には注射用水のみを適用し、試験群の動物と同様に取り扱った。

用量設定根拠：

観察・検査項目および結果：

一般状態および死亡率；一般状態および生死を 1 日 2 回、投与前および投与終了後 (検体除去後) に観察した。全ての動物を対象として、投与開始前、投与 1、2、3 および 4 週目 (投与期間中は検体除去後) に詳細な症状観察を行った。

いずれの群の雌雄のどちらにおいても、一般状態に異常は認められず、また、詳細な症状観察においても異常は認められなかった。

いずれの群においても死亡は認められなかった。

体重変化；投与 1 日目 (投与開始日)、8、15、22 および 28 日目に全ての動物の体重を測定した。また、剖検時に最終体重を測定した。

検体投与群の体重は、対照群の体重とほとんど変わらなかった。

摂餌量；全動物の 1 日の摂餌量を投与 1 日目 (投与開始日)、8、15、22 および 28 日目に

測定した。

検体投与群の摂餌量は、対照群の摂餌量とほとんど変わらなかった。

血液学的検査；投与期間終了後の剖検時に全動物を対象として、後大静脈から血液を採取し、以下の項目の測定を行った。

白血球数、白血球分類、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、網状赤血球数、血小板数、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間

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		
	100	300	1000	100	300	1000
投与量 (mg/kg/日)	100	300	1000	100	300	1000
検査時期 (週)	4			4		
血小板 数	↑ 111	106	106	102	105	106

対照群との有意差検定は Dunnett あるいは Steel の多重比較検定を用いて行った。

↑ ↓ : 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。

100 mg/kg 群の雄において血小板数の高値が認められたが用量相関性がないことより、検体投与に関連したものではないと考えられた。いずれの群においても、検体投与に関連する変化は認められなかった。

血液生化学検査；投与期間終了後の剖検時に全動物を対象として、後大静脈から血液を採取し、得られた血清を用い、以下の項目の測定を行った。

総蛋白、アルブミン、アルブミン/グロブリン比、総ビリルビン、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)、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ (γ-GTP)、アルカリホスファターゼ (ALP)、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、グルコース、血中尿素窒素、クレアチニン、無機リン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、クロライド

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		
	100	300	1000	100	300	1000
投与量 (mg/kg/日)	100	300	1000	100	300	1000
検査時期 (週)	4			4		
アルブミン	103	100	↑103	100	106	100
リン脂質	↑112	103	105	102	107	100
総コレステロール	↑110	103	103	100	105	98

対照群との有意差検定はDunnettあるいはSteelの多重比較検定を用いて行った。

↑↓: $P < 0.05$, ↑↑: $P < 0.01$

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。

1000 mg/kg 群の雄にアルブミンの高値が認められたが、この変化は非常にわずかであり、対照群とほとんど変わらないことから、検体投与に関連したものではないと考えられた。100 mg/kg 群の雄にリン脂質と総コレステロールの高値が認められたが、用量相関性がないことより検体投与に関連したものではないと考えられた。いずれの群においても、検体投与に関連する変化は認められなかった。

尿検査；投与4週時に全ての動物を対象として尿検査を実施した。

いずれの群においても、検体投与に関連のある異常は認められなかった。

眼科学的検査；投与開始前に全ての動物、投与4週時に対照群と高用量群の全動物を対象として検査した。

検体投与に関連のある異常は認められなかった。

臓器重量；剖検後、全動物を対象として以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

脳、心臓、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣上体、精巣、子宮、卵巣

いずれの群においても、検体投与に関連する変化は認められなかった。

肉眼的病理検査；投与期間終了時、全動物について剖検を行った。

いずれの群においても、検体投与に関連する変化は認められなかった。

病理組織学的検査；対照群および高用量群を対象として、以下の組織について病理標本を作成し、検鏡した。

大脳、小脳、延髄／橋、下垂体、脊髄（頸部、胸部および腰部）、眼球、視神経、ハーダー腺、顎下リンパ節、顎下腺（舌下腺を含む）、耳下腺、甲状腺（上皮小体を含む）、心臓、肺（気管支を含む）、気管、喉頭、咽頭、鼻

腔、舌、胸腺、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸（パイエル板を含む）、盲腸、結腸、直腸、腸間膜リンパ節、膀胱、精囊、前立腺、精巣上体、精巣、卵巣、子宮、膈、大腿骨（骨髄を含む）、胸骨（骨髄を含む）、乳腺、皮膚（投与部位）、皮膚（下腹部）、大動脈、坐骨神経、大腿二頭筋、その他の肉眼的病変

いずれの群においても、検体投与に関連する変化は認められなかった。

以上の結果から、マンデストロビン原体のラットにおける28日間反復経皮投与毒性試験において、毒性学的意義があると考えられる変化は認められなかった。従って、本試験の条件下、マンデストロビン原体の無毒性量は雌雄ともに1000 mg/kg/日であると判断された。

7. 反復経口投与神経毒性

マンデストロビン原体のラットを用いた 90 日間反復経口投与神経毒性試験 (資料 7)

試験機関：WIL Research Laboratories, LLC.

[GLP 対応]

報告書作成年：2012 年

検体：マンデストロビン原体

検体純度：

供試動物：Cr1:WI(Han)系ラット、1 群雌雄各 12 匹、投与開始時週齢；約 6 週齢

投与期間：約 90 日間（投与開始日；2011 年 4 月 19 日、最終安楽殺日；2011 年 7 月 22 日）

投与方法：検体を 0、1500、5000 および 15000 ppm の濃度で飼料に混入し、約 90 日間において
随時摂食させた。検体を混入した飼料は週に約 1 回調製した。

用量設定根拠：

観察・検査項目および結果：

死亡；生死を 1 日 2 回観察した。

検体投与による死亡動物は認められなかった。試験 53 日の総合機能観察および自発運動量測定を終了後、5000 ppm の雄 1 匹および対照群の雌 1 匹を取り違えて誤ったケージに収容した。試験 58 日になって取り違えていることが判明したため、試験 58 日に安楽殺死し、肉眼的病理検査に供した。試験 53 日までのこれら 2 匹の検査結果については、試験評価に含めている。

一般症状；全動物について外観、行動および運動活性などについての一般症状観察を週に約 1 回行った。

検体投与に関連していると考えられる症状所見は認められなかった。

体重変化；全動物について、投与開始 1 週間前から週 1 回の頻度で個体別に体重を測定した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示した。

項目	検査 時期 (日)	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		0	1500	5000	15000	0	1500	5000	15000
体 重	35	100	99	98	↓ 91	100	96	98	101
	42	100	98	98	↓ 91	100	97	100	100
	49	100	98	98	↓ 91	100	95	99	99
	56	100	98	99	↓ 91	100	95	98	99
体重増加量 (g)	0~7	38	38	37	↓ 29	15	18	18	19
	14~21	32	32	32	↓ 26	18	↓ 13	↓ 12	16
	28~35	21	19	21	↓ 15	9	9	9	6
	42~49	22	21	21	17	12	↓ 7	↓ 8	↓ 6
	77~84	0	1	1	↑ 5	-2	-2	-2	↑ 2
	0~91	245	239	237	211	101	99	104	102

一元配置分散分析および Dunnett's 検定を用いて対照群との有意差検定を行った
(↑ ↓: $P < 0.05$, ↓ ↓: $P < 0.01$)。

表中の体重の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値、体重増加量の数値は実数値 (g) を示す。

検体投与に関連した体重増加量の低値が 15000 ppm 群の雄で試験 0~7 日、14~21 日および 28~35 日に認められた。その結果、15000 ppm 群の雄の体重増加量は全投与期間を通して低値傾向であり、同群の体重は試験 7 日から投与期間の終了まで継続して対照群よりも 4.8%から 9.3%低く、試験 35~56 日においては統計学的に有意であった。15000 ppm 群の雄の試験 77~84 日に体重増加量の高値が認められたが、この変化は一時的なものであり、毒性学的意義はないと考えられた。

雄の 1500 および 5000 ppm 群ならびに雌の全投与群では、体重および体重増加量に検体投与に関連した影響は認められなかった。統計学的に有意な変動はすべて一時的あるいは用量反応性に欠けており、投与期間を通じた総重量にも影響は認められなかった。

摂餌量；投与開始 1 週間前から週 1 回の頻度で個別別摂餌量を測定し、g/匹/日および g/kg/日で算出した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示した。

項目	検査 時期 (日)	投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		1500	5000	15000	1500	5000	15000
摂餌量 (g/匹/日)	0~7	100	95	↓ 86	100	100	107
	7~14	100	100	96	100	107	↑ 113
	14~21	96	96	92	100	100	106
	21~28	96	96	↓ 88	94	100	106
	28~35	92	96	↓ 88	94	106	94
摂餌量 (g/kg/日)	0~7	97	96	↓ 90	101	103	104
	7~14	99	99	100	101	104	↑ 112
	56~63	100	102	↑ 108	101	101	95
	63~70	102	102	↑ 109	101	103	97

一元配置分散分析および Dunnett 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)

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。

15000 ppm 群の雄の摂餌量の低値が、試験 0~7 日 (g/匹/日および g/kg/日)、21~35 日 (g/匹/日) に認められた。この結果は、同期間中の同群の雄の体重増加量の低値と相関しており、検体投与に関係すると考えられた。これ以後、同群の摂餌量に検体投与の影響は認められなかった。15000 ppm 群の雄の摂餌量 (g/kg/日) の高値が試験 56~70 日に認められたが、これらの結果は、同群で認められた体重の低値に起因しているものと考えられた。試験 7~14 日に 15000 ppm 群の雌の摂餌量 (g/匹/日および g/kg/日) の高値が認められたが、摂餌量の増加は一時的なものであり毒性学的に重要とは考えられなかった。

検体摂取量；投与期間中の検体摂取量は以下のとおりであった。

投与量 (ppm)		1500	5000	15000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	99	338	1024
	雌	122	415	1223

総合機能観察 (FOB)；全動物について、投与開始前、試験 1、3、7 および 12 週に、以下の項目について観察した。

ホームケージ内観察：姿勢、噛み付き、痙攣/振戦、眼瞼閉鎖、便の硬さ

保定観察：ケージからの取り出し易さ、動物の取り扱いやすさ、流涙/色素涙、流涎、立毛、被毛外観、眼瞼閉鎖、呼吸数/状態、眼球突出、粘膜/眼/皮膚の色、赤色/痲皮様付着物、筋緊張

オープンフィールド観察：運動性、歩行、立ち上がり、覚醒、痙攣/振戦、排

尿／排便、毛づくろい、歩行スコア、異常行動／常同行動、後ずさり、動き出しまでの時間

感覚機能観察：接近反応、接触反応、驚愕反応、テイルピンチ反応、瞳孔反応、瞬目反応、前肢伸展、後肢伸展、空中正向反射、嗅覚機能評価

神経筋観察：後肢伸展力、握力ー前肢および後肢、後肢開脚幅、ロータロッド検査

生理学的観察：カタレプシー、体重、体温

対照群と比べ統計学的有意差の認められた評価項目を次表に示した。

投与量 (ppm)	0				1500				5000				15000				
検査時期 (週)	1	3	7	12	1	3	7	12	1	3	7	12	1	3	7	12	
検査動物数	12	12	12	11	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
ホームケージ内観察																	
雌	通常認められる座位／立位	5	3	1	0	6	5	2	↑6	8	3	1	1	6	4	2	1
	観察者への警戒/反応	7	9	10	11	5	7	10	↓6	3	9	11	10	6	8	9	11

対照群との有意差検定は、Fisherの直接確率検定を用いて行った (↓↑: $p < 0.05$)。表中の数値は所見を有する動物数を示す。

投与量 (ppm)	1500				5000				15000				
検査時期 (週)	1	3	7	12	1	3	7	12	1	3	7	12	
オープンフィールド観察													
雄	立ち上がり回数	80	92	95	94	102	↑143	125	112	81	100	104	113
雌	動き出しまでの時間 (秒)	↓67	100	67	150	↓67	100	100	150	↓67	100	100	100
筋神経観察													
雌	前肢握力 (g)	102	↓71	73	68	92	86	86	83	97	87	↓68	82
	ロータロッド検査 (秒)	↓64	86	110	82	108	85	105	86	103	100	112	92

対照群との有意差検定は、Dunnett's 検定を用いて行った (↓↑: $p < 0.05$, ↓: $p < 0.01$)。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

ホームケージ内観察において、試験 12 週の 1500 ppm 群の雌においてのみ、観察者への警戒/反応を示す動物数の減少および通常認められる座位または立位

を示す動物数の増加が認められた。これらの一時的な変化は、ホームケージ内における異常行動とは考えられず、また、用量反応性は認められなかった。従って、検体投与に関係しないと考えられた。

オープンフィールド観察において、試験 1 週に全投与群の雌で動き出しまでの時間の短縮、試験 3 週に 5000 ppm 群雄の立ち上がり回数の増加が認められた。しかし、動き出しまでの時間の短縮は変動が小さく、認められたのは試験 1 週時点のみであり、用量反応性がなく、雄では影響が認められなかった。したがって、これらの変化は検体投与に関連しないと考えられた。

神経筋観察において、試験 7 週の 15000 ppm 群の雌で前肢握力の低値が認められたが、この変化は試験 3 週および 12 週時点では認められず、関連する項目で他に付随的な影響が認められていないことより、検体投与に起因しないと考えられた。さらに、1500 ppm 群の雌において、試験 1 週のロータロッド検査の平均値および 3 週の前肢握力の低値が認められたが、いずれも用量反応性がなかった。したがって、検体投与との関連はないと考えられた。

自発運動量；全動物について、投与開始前、試験 1、3、7 および 12 週に、自発運動量を 60 分間測定した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示した。

投与量 (ppm)		1500				5000				15000			
検査時期 (週)		1	3	7	12	1	3	7	12	1	3	7	12
雄	総運動量カウント数												
	合計 (60 分間)	93	101	102	111	94	96	109	106	105	101	↑119	107
雌	総運動量カウント数												
	測定開始 51~60 分	129	109	127	108	63	80	90	51	↓41	84	111	102
	移動運動量カウント数												
	測定開始 21~30 分	121	86	104	103	94	108	105	143	82	106	87	↑115

対照群との有意差検定は、線形モデル傾向分析を用いて行った (↑: $p < 0.05$, ↓: $p < 0.01$)。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

自発運動量パターン（移動運動量および総運動量カウント数）に検体投与の影響は認められなかった。15000 ppm 群の雄の試験 7 週に 60 分間の合計総運動量カウント数の高値が認められたが試験 7 週のみの一時的な変化であった。15000 ppm 群の雌の試験 1 週に小区間（測定開始 51~60 分）の総運動量カウント数の低値および試験 12 週に小区間（測定開始 21~30 分）の移動運動量カウント数の高値が認められたが、いずれも 1 時点のみの短時間の変化であり、合計の運動量カウント数には影響しなかった。したがって、これらの変化は検体投与の影響とは考えられなかった。

眼科学的検査；全動物について、投与開始2週間前および試験12週に、間接検眼鏡とスリットランプ解剖顕微鏡を用い、散瞳薬で散瞳させた後に実施した。
検体投与の影響は認められなかった。

肉眼的病理検査；試験終了時に全生存動物についてペントバルビタールナトリウム投与による深麻酔下で、4.0%パラホルムアルデヒド/0.1Mリン酸緩衝液を用いて灌流固定を行った。脳および脊髄の変色または病変などの肉眼的変化について検査した。
いずれの動物にも異常は認められなかった。

脳重量およびサイズ；全動物の脳について固定後の重量およびサイズ（長さおよび幅）（嗅球を除く）を測定した。
脳の重量ならびにそのサイズ（長さおよび幅）に検体投与の影響は認められなかった。

病理組織学的検査；対照群および15000 ppm群の雌雄各6匹から以下の神経組織を採取した。中枢神経系はパラフィン包埋、末梢神経はプラスチック包埋し、薄切後、ヘマトキシリンおよびエオジンで染色を施した。

脳（嗅球、大脳皮質、海馬、基底核、視床、視床下部、中脳、小脳、橋および延髄）、脊髄（頸膨大部C₃~C₇および腰膨大部T₁₃~L₄）、三叉神経節/神経、腰部後根神経節T₁₃~L₄、腰部後根線維T₁₃~L₄、腰部前根線維T₁₃~L₄、頸部後根神経節C₃~C₇、頸部後根線維C₃~C₇、頸部前根線維C₃~C₇、頸部脊髄神経、腰部脊髄神経、坐骨神経（大腿部腿部、坐骨切痕部）、腓腹神経、脛骨神経、腓骨神経、視神経、眼球、骨格筋（腓腹筋）

15000 ppm群の6匹/性から検査した中枢および末梢神経系組織のいずれにおいても、検体投与に関連する病理組織学的所見は認められなかった。

以上の結果から、マンデストロビン原体を約90日間飼料混餌投与した神経毒性に対する無毒性量（NOAEL）は、雌雄とも15000 ppm（雄1024 mg/kg/日、雌1223 mg/kg/日）と考えられた。15000 ppm群の雄では体重、体重増加量、摂餌量の低値が認められ、雌ではいずれの投与群においても検体投与の影響が認められなかったことから、全身毒性のNOAELは、雄では5000 ppm（338 mg/kg/日）、雌では15000 ppm（1223 mg/kg/日）と考えられた。