

ラットを用いた混餌投与 90 日間反復経口毒性試験

毒性資料 No. 原体-18

試験機関：

報告書作成年：1981 年

検体の純度：

供試動物：Fischer 系ラット (F344; Charles River)、5 週齢、1 群雌雄各 20 匹

投与期間：90 日間 (13 週間、1980 年 8 月～11 月)

投与方法：検体を 0、50、500 及び 5000ppm の濃度で飼料に混入し、13 週にわたって摂食させた。飼料調製は週 1 回行った。

用量設定根拠：

観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡率：一般状態及び生死を毎日 2 回観察した。

投与期間を通じて、雌雄各投与群で検体投与に起因したと思われる外徴や行動の変化、死亡は観察されなかった。

体重：投与期間中、すべての動物を対象に毎週測定した。

体重の推移を次図に示した。また、投与 1、4、7 及び 13 週時と投与期間中の体重増加量を表に示した。

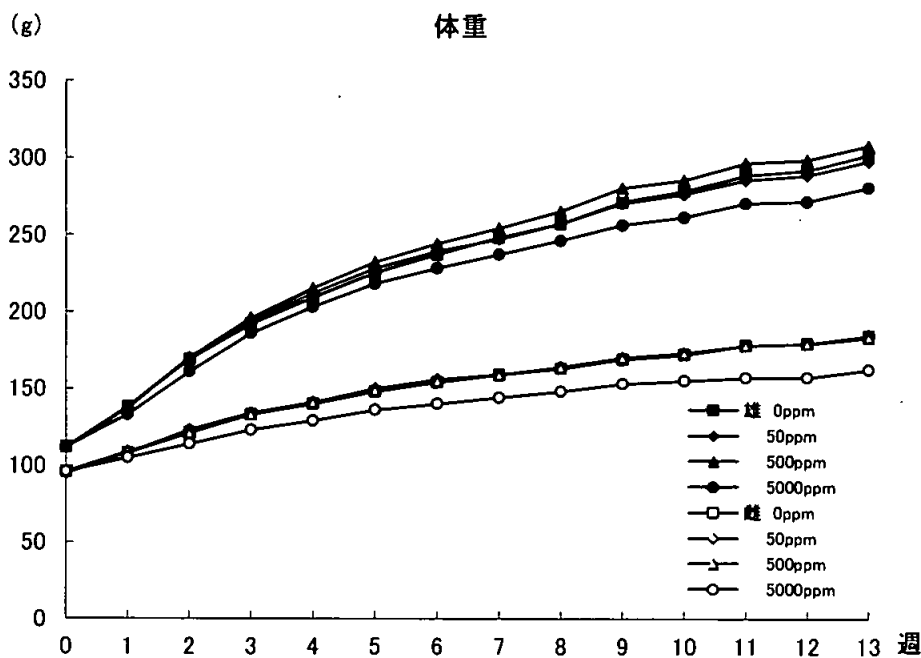


表. 平均体重及び平均体重増加量

性別	雄			雌		
投与量 (ppm)	50	500	5000	50	500	5000
平均体重						
1週			↓96			↓97
4週						↓92
7週			↓96			↓91
13週			↓93			↓88
体重増加量						
0 - 13週	98	103	↓88	101	101	↓76

↑ ↓ : P<0.05、▲ ▼ : P<0.01 (Student t検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したものの。

雌雄共に5000ppm群で投与期間を通じて対照群に比し低体重に推移した。また投与期間中の体重増加量も低く、有意な体重増加抑制が認められた。500ppm以下の投与群では雌雄共に対照群との間に差は認められなかった。

摂餌量及び飼料効率: 投与期間中、すべての動物を対象に毎週摂餌量を測定した。また体重増加量から飼料効率[#]を算出した。

[#] (飼料効率%) = (投与期間中の体重増加量(g) / 総摂餌量(g)) × 100

投与1、4、7及び13週の平均摂餌量ならびに投与期間中の総摂餌量、平均飼料効率を次表に示した。

表. 平均摂餌量及び平均飼料効率

性別	雄			雌		
投与量 (ppm)	50	500	5000	50	500	5000
平均摂餌量						
1週			↓95			↓93
4週						↓93
7週						↓94
13週						↓93
総摂餌量						↓94
平均飼料効率						
0 - 13週	99	101	↓90	101	100	↓82

↑ ↓ : P<0.05、▲ ▼ : P<0.01 (Student t検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したものの。

5000ppm群の雄では投与1週のみ統計学的有意な摂餌量の減少がみられたが、雌では投与期間を通じて、対照群に比べ平均摂餌量及び総摂餌量の統計

学的有意な減少が認められた。

投与期間中の平均飼料効率では雌雄共に5000ppm群で有意な減少が観察された。

検体摂取量：投与期間中の平均検体摂取量は次表のとおりであった。

投与量 (ppm)		50	500	5000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	3.52	35.4	366
	雌	3.75	37.4	378

飲水量：雌雄各群5匹を対象に毎週測定した。

雌雄共に飲水量に対する検体投与の影響はみられなかった。

血液学的検査：投与7及び13週時に雌雄各群10匹を対象に実施した。採血は投与7週時においては眼窩静脈叢より、最終の13週には腹部大動脈より行い、以下の項目について測定した。

赤血球数(RBC)、ヘモグロビン濃度(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、網状赤血球数(Retic; 13週のみ)、白血球数(WBC)、白血球百分比、血小板数(PLT)

対照群と比べて統計学的有意差を示した項目を表に示した。

表. 血液学的検査結果

性別	雄			雌		
	50	500	5000	50	500	5000
RBC	7週	↓95	↓84		↓92	↓86
	13週	↓95	↓87		↓96	↓86
Hb	7週	↓96	↓89		↓96	↓91
	13週	↓98	↓93			↓90
Ht	7週	↓94	↓86		↓93	↓87
	13週	↓95	↓88			↓88
MCH	7週	↑101	↑106	↑102	↑106	↑107
	13週	↑102	↑103	↑106	↑102	↑104
MCV	7週		↑102	↓98		↑102
	13週				↑102	↑101
MCHC	7週	↑102	↑103	↑105	↑104	↑105
	13週		↑102	↑105		↑102

↑ ↓ : P<0.05、↑↓ : P<0.01 (Student t検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。

表. 血液学的検査結果 (続き)

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		50	500	5000	50	500	5000
Retic [#]	13週		▲153	▲270			▲205
WBC	7週		↑111	▲139			▲159
	13週			▲130			
Lym% [§]	7週		↑105	▲106	↑105		↑106
Neu% [§]	7週		▼69	▼62	↓64		↓55
PLT	13週			↑127			

↑↓ : P<0.05、▲▼ : P<0.01 (Student t検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。

Lym%[§] : リンパ球%、Neu%[§] : 好中球%

[#]13週のみ測定

投与7週及び最終の13週の検査において、雌雄共500ppm以上の投与群でRBC、Hb及びHtの明らかな減少が認められた(13週の雌500ppm群のHbとHtを除く)。またこれらの変動に伴い、雌雄各投与群で赤血球恒数(MCH、MCV、MCHC)の変動がみられた。しかし、雌雄50ppm群における赤血球恒数の統計学的有意な変動についてはRBC、Hb、Htで影響がみられなかったことから、毒性影響とは捉えられなかった。

RBC、Hb及びHtの減少を反映し、13週の検査で雌雄5000ppm群及び雄の500ppm群ではReticの有意な増加が認められた。

投与7週には雄の500ppm以上の投与群、雌の5000ppm群でWBCの増加、Lym%の増加とNeu%の減少が統計学的有意に認められた。

さらに投与13週の検査では雄5000ppm群でWBC及びPLTの有意な増加が観察された。7週でみられた雌50ppm群でのLym%及びNeu%の変動はWBCに影響がなく用量との関連もみ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。

血液生化学的検査 : 投与7及び13週時に雌雄各群10匹を対象に実施した。採血は投与7週時においては眼窩静脈叢より、最終の13週には腹部大動脈より行い、以下の項目について測定した。

尿素窒素(BUN)、グルコース(Glu)、尿酸[#](UricA)、総コレステロール(T.Chol)、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)、アルカリホスファターゼ(ALP)、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)、総蛋白(TP)、アルブミン(A1b)、A/G、総ビリルビン(T.Bil)、クレアチニン[#](Cre)、ナトリウム[#]、カリウム[#]、クロール[#]、無機リン[#](P)、カルシウム[#](Ca)

[#] (13週時のみ検査)

表に対照群と比べて統計学的有意差を示した項目を示した。

7週時の検査では各項目で統計学的有意な変動を散見したが、用量との関連がなく、変動の幅も小さいことからいずれも毒性影響とは捉えられなかった。

投与最終の13週時の検査においては、5000ppm群の雌雄と500ppm群の雌でT. Cholの増加、5000ppm群の雌雄でTP及びT. Bilの増加、5000ppm群の雌でALTの増加、さらに5000ppm群の雌雄と500ppm群の雄でPの増加が統計学的に有意に観察された。その他の項目でも統計学的に有意な変動を散見したが、用量との関連がなく、変動の幅も小さいことから上記項目も含めいずれも毒性影響とは判断しなかった。

表. 血液学的検査結果

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		50	500	5000	50	500	5000
BUN	7週	↓95					
	13週					↓83	↓83
Glu	13週						↑118
T. Chol	13週			↑109		↑116	↑129
ASAT	7週	↑132					
ALAT	13週						↑190
ALP	7週			↓72			↓86
	13週	↑109	↑111	↑118			↓72
LDH	7週		↓71				
	13週	↑265		↑156	↑195		↑172
TP	7週			↑105		↓91	
	13週			↑106			↑112
Alb	7週	↓95	↓95			↓92	↓92
	13週	↑108		↑111			
A/G	7週	↓90	↓86	↓88			↓86
	13週	↑119				↓89	↓77
T. Bil	7週						↓78
	13週	↓90		↑134			↑126
UricA [#]	13週						↓87
Cre [#]	13週				↑108	↑114	↑112
P [#]	13週		↑112	↑143	↓90		↑126
Ca [#]	13週	↑109					↓96

↑ ↓ : P<0.05, ↑ ↓ : P<0.01 (Student t検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。

[#] 13週のみ測定

コリンエステラーゼ活性検査：投与7及び13週時に雌雄各群10匹を対象に血漿、赤血球のコリンエステラーゼ (ChE) 活性を測定した。また13週時には剖検後に脳のChE活性も測定した。採血は血液学的検査で得られたものを用いた。

次表に対照群と比べて統計学的有意差を示した項目を表記した。

表. コリンエステラーゼ活性測定結果

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		50	500	5000	50	500	5000
血漿ChE	7週			↑107			↓89
	13週	↑107	↑107	↑120			
赤血球ChE	7週		↑112	↑123		↑110	↑115
	13週	↑107	↑122	↑115		↑118	↑134
脳ChE [#]	13週	↑118	↑115	↑136	↑111		↑125

↑↓ : P<0.05、↑↓ : P<0.01 (Student t検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。

[#] 13週のみ測定

投与7週時の検査では雌雄共に500ppm以上の投与群で赤血球ChE活性の有意な増加が認められた。また血漿ChE活性が5000ppm群の雄で増加、雌で低下が統計学的有意にみられた。

投与13週時では雄で血漿、赤血球及び脳のChE活性が全投与群で統計学的有意に増加したが、いずれも用量に依存した明らかな変動ではなかった。雌においては500ppm以上の投与群で赤血球ChE活性の有意な増加が認められた。

総じて神経薬理学的観点*から毒性学的意義が高いと考えられるChE活性低下所見はみられず、投与群でChE活性の増加傾向を示し、コリンエステラーゼ活性に及ぼす阻害作用はみられなかった。

*申請者注：13週雄の全ての投与群で血漿ChEが有意に増加していたが、関連した他の生化学的検査項目に肝への影響を示唆する変動がなく、肝への影響の観点からも毒性学的意義があるものとは考えられなかった。

尿検査：投与7週及び13週時に雌雄各群10匹を対象に実施した。採尿時間は24時間とし、以下の項目について測定した。

尿量、比重（以上、計測）、色調、濁度（以上、目視）、pH、潜血、ケトン体、糖、蛋白、ウロビリノーゲン、ビリルビン（以上、試験紙による半定量分析）、沈渣（鏡検）

次表に対照群と比べて統計学的有意差を示した項目を示した。

表. 尿検査結果

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		0	50	500	5000	0	50	500	5000
尿量 ^{a)}	7週							↓70	↓74
	13週							↓71	↓67
尿比重 ^{a)}	13週							↑101	↑101
尿色調 ^{b) #}	13週	0	1	1	3	1	1	↑9	↑10
ビリルビン [#]	7週	1	2	3	↑10	7	10	10	10
	13週	3	3	6	↑10	6	8	9	10

↑↓ : P<0.05、↑↓ : P<0.01 (Student t検定)

*変化または陽性を示した例数、検査数は各群10匹、カイ2乗検定 (申請者実施)

^{a)}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。

^{b)} 黄褐色～赤褐色

投与7週の検査では雌の500ppm以上の投与群で尿量の減少、雄の5000ppm群でビリルビン陽性頻度の増加が統計学的有意にみられ、これら所見は投与13週時にも観察された。

投与13週の検査では、雌の500ppm以上の投与群で尿比重の増加、黄褐色～赤褐色尿の頻度の増加が統計学的有意に認められた。

眼科学的検査: 試験開始前にすべて動物、投与13週時に雌雄各群10匹を対象に、視覚機能について肉眼的観察を実施した。

検体投与に関連したと思われる異常所見は全く観察されなかった。

臓器重量: すべての生存動物を対象に、屠殺・剖検後、以下の各臓器の重量測定を実施し、また、対体重比を算出した。

肝臓、腎臓、心臓、肺、脾臓、脳、下垂体、胸腺、副腎、精巣、卵巣、甲状腺

以下に対照群と比べて統計学的有意差を示した項目を示した。

表. 臓器重量

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		50	500	5000	50	500	5000
最終体重				↓93			↓89
肝臓	実重量			↑110			↑124
	対体重比			↑118			↑140
腎臓	実重量			↓89		↓96	↓88
	対体重比		↓96	↓95		↓96	

↑↓ : P<0.05、↑↓ : P<0.01 (Student t検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。

表. 臓器重量 (続き)

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		50	500	5000	50	500	5000
脾臓	実重量		↑108	▲138		▲108	▲115
	対体重比		↑104	▲147		▲108	▲132
心臓	対体重比			▲106			▲112
肺	実重量						▼89
脳	実重量			↓97			↓97
	対体重比			▲105			▲109
副腎	実重量		↑110	↑112			
	対体重比	↑107		▲121			▲113
胸腺	実重量						▼85
精巣	実重量		↑103	↑104			
	対体重比			▲112			
卵巣	対体重比						▲114

↑↓ : P<0.05、▲▼ : P<0.01 (Student t検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したものの。

5000ppm群雌雄で脾臓および肝臓実重量及び対体重比が有意に増加した。

また、腎臓の実重量 (雌雄) 及び対体重比 (雄) が有意に減少した。

雄の副腎及び精巣で重量増加が、また雌雄で腎臓重量の減少が統計学的有意にみられたが、いずれも病理組織学的所見で特記すべき所見が見られなかったことから毒性影響とは捉えられなかった。

その他雌雄5000ppm群でみられた臓器重量の統計学的有意な変動については同群の低体重に関連した二次的な変動と判断した。

申請者注：雌雄500ppmにおいて脾臓の実重量及び対体重比が有意に増加しており、血液学的検査でも影響が認められていることから500ppmの脾重量の変化は投与に関連するものと考えられる。

肉眼的病理検査：投与期間終了後、すべての動物を屠殺し剖検を行った。

表に示したように5000ppm群の雌雄で脾臓の黒色調と肥大が高頻度に観察された。また500ppm群でも両所見を散見した。

表. 肉眼的病理検査結果

性 別	雄				雌			
	0	50	500	5000	0	50	500	5000
投与量 (ppm)	0	50	500	5000	0	50	500	5000
脾臓： 検査数	20	20	20	20	20	20	20	20
黒色調	0	0	4	↑18	0	0	↑6	↑13
肥大	0	0	1	↑15	0	0	2	↑7

↑↓ : P<0.05、↑↓ : P<0.01 (カイ2乗検定、申請者実施)

病理組織学的検査：投与期間終了後、すべての動物を屠殺、剖検後、以下の組織について病理組織学的検査を行った。

肝臓、腎臓、心臓、肺、脾臓、脳、下垂体、甲状腺、胸腺、副腎、精巣、卵巣、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、大腸、膵臓、膀胱、前立腺、リンパ節、子宮体部及び頸管、骨格筋、骨髄、肉眼的異常部位

統計学的有意に頻度が増加した所見を次表に示した。

表. 主な病理組織学的検査結果

性 別	雄				雌			
	0	50	500	5000	0	50	500	5000
投与量 (ppm)	0	50	500	5000	0	50	500	5000
検査動物数	20	20	20	20	20	20	20	20
所見								
脾臓： 検査数	20	20	20	20	20	20	20	20
ヘモジデリン沈着：合計	20	20	20	↑20	20	20	20	↑20
軽度	19	17	17	1	18	20	13	1
中等度	1	3	3	12	2	0	7	18
重度	0	0	0	7	0	0	0	1
骨髄： 検査数	20	19	20	19	19	20	19	20
造血亢進：合計	0	0	0	↑14	0	0	0	↑20
軽度	0	0	0	12	0	0	0	20
中等度	0	0	0	2	0	0	0	0
腎臓： 検査数	20	20	20	20	20	20	20	20
石灰沈着：合計	7	2	4	0	20	20	↑20	20
(皮髄境界部) 軽度	7	2	4	0	12	15	0	9
中等度	0	0	0	0	8	5	19	11
重度	0	0	0	0	0	0	1	0

↑↓ : P<0.05、↑↓ : P<0.01 (累積カイ二乗検定、申請者実施)

雌雄の5000ppm群で、脾臓に中等度から重度のヘモジデリン沈着を高頻度に観察した。また骨髄では造血亢進が雌雄共に5000ppm群で認められた。

雌の500ppm群で腎臓に中等度から重度の皮髄境界部石灰沈着が観察され

た。しかしこの所見では用量に依存した頻度の増加はみられず、検体投与との関連はないと考えられた。

以上、検体のラットに対する13週間混餌投与において、雌雄共に5000ppmで体重増加抑制がみられ、雌で摂餌量が減少した。また、雌雄500ppm以上で赤血球パラメーター（主にRBC、Hb及びHt）の減少がみられ、雄500ppm以上、雌5000ppmでReticが増加した。雌雄5000ppmの肝臓および脾臓の実重量および対体重比が増加し、雌雄500ppmでも脾臓の実重量および対体重比が増加していた。雌雄5000ppmの腎臓実重量が減少し、雄では対体重比も減少した。雌雄500ppm以上で脾臓の黒色調や肥大が観察され、5000ppmでその頻度は高かった。さらに、雄5000ppmで尿ビリルビン陽性頻度が増加し、雌の500ppm以上の投与群では尿量減少、尿比重増加、黄褐色～赤褐色尿の頻度が増加した。病理組織学的検査では5000ppm雌雄に骨髄の造血亢進、脾でのヘモジデリン沈着が高頻度に観察された。本試験における無毒性量は雌雄共に50ppm（雄：3.52mg/kg/日、雌：3.75mg/kg/日）であった。

ラットにおける 90 日間混餌投与毒性試験

毒性資料 No. 原体-19

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2002 年

検体の純度：

供試動物：Wistar ラット (RJ:WI (IOPS HAN))、6 週齢、1 群雌雄各 10 匹

投与期間：13 週間 (2000 年 9 月～12 月)

投与方法：検体を 0、1000、3000、10000 及び 20000 ppm の濃度で飼料に混入し、90 日間にわたって摂食させた。飼料調製は 3 週ごとに行った。

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：全動物について瀕死及び死亡の有無を毎日 2 回観察し、1 日 1 回、一般症状観察を行った。さらに投与前と投与期間中週 1 回、詳細な臨床観察を行った。

投与期間を通じて、雌雄各投与群で検体投与に起因したと思われる外徴や行動の変化、死亡は観察されなかった。

なお投与最終の 13 週における採血時に 1000 ppm 群の雄 1 例が過麻酔によって死亡した。

神経毒性学的検査：投与前及び投与 12 週時に、神経毒性をみる目的で以下の反射テストを行った。

握り反射 (ざらついた表面の反対側から引っ張ったときの反応)、立ち直り反射、角膜反射、瞳孔反射、聴覚驚愕反射、首振り反射 (耳に息を吹きかけた時の反応)

神経毒性を示唆する変化は認められなかった。

体重：投与期間中、すべての動物を対象に毎週測定した。

体重の推移を次図に示した。また、投与 1、4、7 及び 13 週時と投与期間中の体重増加量を表に示した。

雄の 3000 ppm 以上、雌の 10000 ppm 以上の投与群で対照群に比し低体重に推移した。また投与期間中の体重増加量は雌雄共に 3000 ppm 以上の投与群で統計学的有意に減少した。一方、1000 ppm 群では雌雄共に検体による体重への影

響はみられなかった。

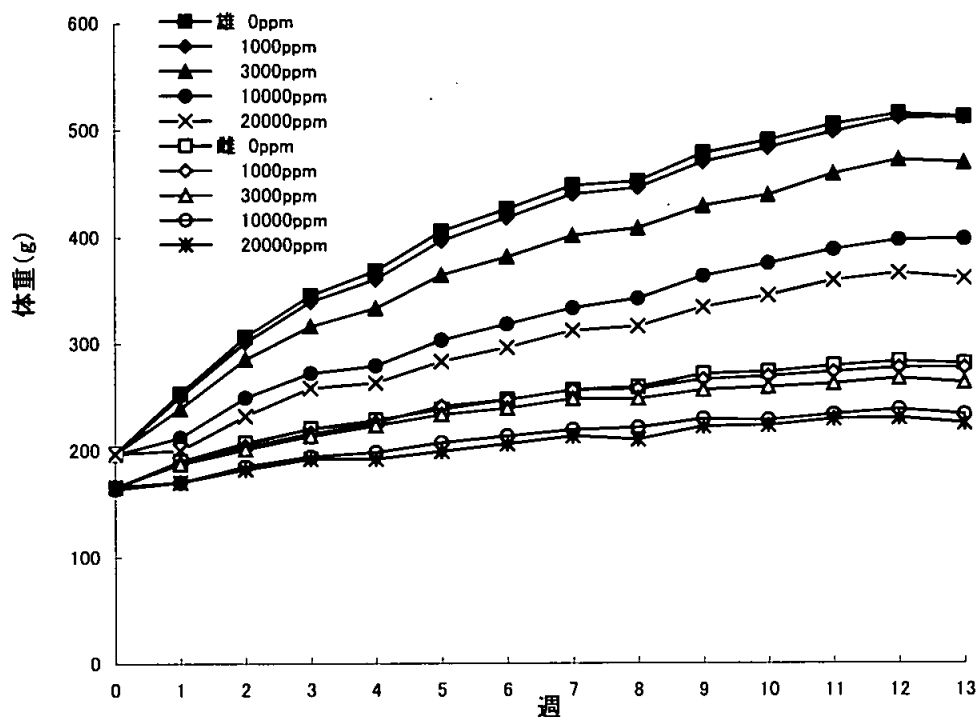


表. 平均体重及び平均体重増加量

性別	雄				雌			
投与量 (ppm)	1000	3000	10000	20000	1000	3000	10000	20000
平均体重								
1 週			↓84	↓79			↓89	↓89
4 週		↓90	↓76	↓71			↓87	↓84
7 週		↓90	↓74	↓70			↓85	↓83
13 週			↓78	↓71			↓83	↓80
体重増加量								
0 - 13 週		↓86	↓64	↓52		↓84	↓60	↓52

↑ ↓ : P<0.05、▲ ▼ : P<0.01 (Dunnett検定)
 表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。

摂餌量：投与期間中、すべての動物を対象に毎週測定した。

雌雄共に10000ppm及び20000ppm群で摂餌量の減少がみられた。また雌の3000ppm群では投与期間を通した摂餌量に有意差を認めなかったが、投与8～9週及び10～11週で統計学的有意な減少(いずれもP<0.05、対照100に対して92)を認めた。3000ppmの雄と1000ppmの雌雄では摂餌量への影響はみられな

かった。

表. 摂餌量

性別	雄				雌			
	1000	3000	10000	20000	1000	3000	10000	20000
0 - 13 週			↓83	↓73	(97)		↓80	↓79

↑↓ : P<0.05、▲▼ : P<0.01 (Dunnett検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。

() 内は参考値 (有意差なし)

検体摂取量 : 投与期間中の平均検体摂取量は次表のとおりであった。

投与量 (ppm)		1000	3000	10000	20000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	60.6	189	636	1239
	雌	71.0	214	658	1309

血液学的検査 : 投与4、8及び13週の投与終了時にすべての生存動物を対象に、眼窩静脈叢より採血した血液を用い、以下の項目について測定した。

赤血球数(RBC)、ヘモグロビン濃度(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、網状赤血球数(Retic)、ハインツ小体(Hz)、メトヘモグロビン濃度(MHb)、白血球数(WBC)、白血球百分比、血小板数(PLT)、プロトロンビン時間(PT, 13週のみ)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT, 13週のみ)、赤血球形態

また、投与期間終了の剖検後に生存動物すべてを対象に大腿骨骨髓の塗抹標本を作製し、これを鏡検した。

次表に対照群と比べて統計学的有意差を示した項目を示した。

雌雄共に全投与群でRBC、Hb及びHtの有意な減少が認められた。またこれに伴い20000ppmで赤血球恒数 (MCV, MCH) の統計学的有意な増加がみられた。赤血球形態の観察では雌雄全投与群で色調不同、大小不同がみられ、雄では全投与群、雌では3000ppm以上で大赤血球を伴っていた。

また、雌雄共、全投与群でReticとHzの用量に依存した有意な増加がみられた。さらに雄の全投与群、雌の3000ppm以上の投与群でMHbの有意な増加または増加傾向がみられた。

雌雄の3000ppm以上の投与群ではPLT、WBC及びLymがいずれも有意な増加を示した。さら雌雄の10000ppm以上ではNeuの統計学的有意な増加が観察された。骨髓塗抹標本の鏡検の結果、雌雄共に各投与群で特記すべき所見は観察されなかった。

表. 血液学的検査結果

性別	雄				雌				
	1000	3000	10000	20000	1000	3000	10000	20000	
RBC	4週			↓85	↓83	↓92	↓82	↓67	↓77
	8週	↓93	↓93	↓83	↓83	↓93	↓87	↓82	↓81
	13週	↓91	↓91	↓86	↓81	↓92	↓86	↓80	↓78
Hb	4週			↓88	↓90	↓92	↓83	↓83	↓83
	8週	↓95	↓94	↓88	↓89		↓89	↓86	↓87
	13週	↓94	↓93	↓91	↓90	↓94	↓87	↓82	↓83
Ht	4週		↓94	↓87	↓91	↓90	↓82	↓84	↓85
	8週	↓93	↓92	↓86	↓89	↓94	↓87	↓85	↓87
	13週	↓92	↓91	↓90	↓89	↓94	↓85	↓81	↓84
MCV	4週				↑109			↑107	↑111
	8週				↑107				↑107
	13週				↑110				↑108
MCH	4週				↑109			↑105	↑108
	8週			↑106	↑108				↑108
	13週			↑106	↑111				↑107
MCHC	4週		↑103			↑103	↑102	↓98	↓98
	8週	↑102	↑102	↑103		↑103	↑103		
	13週		↑102				↑102		
Retic	4週	↑315	↑520	↑1125	↑1236	↑488	↑1122	↑2089	↑2393
	8週	↑203	↑502	↑981	↑1330	↑292	↑775	↑1363	↑1819
	13週		↑470	↑1121	↑1435	↑319	↑596	↑1146	↑1520
Hz (%)	4週	↑350	↑700	↑1550	↑1950	↑533	↑1200	↑2125	↑2825
	8週	↑400	↑900	↑1450	↑1750	↑515	↑1069	↑2008	↑2431
	13週	↑450	↑800	↑1500	↑1950	↑773	↑1418	↑2382	↑3027
MHb (%)	4週	↑225	↑275	↑300	↑325		(132)	(136)	
	8週		(130)	(130)	↑160			(127)	(124)
	13週				(115)			↑160	↑154
WBC	4週		↑168	↑166	↑172		↑134	↑188	↑194
	8週		↑147	↑158	↑175		↑131	↑202	↑232
	13週			↑152	↑164		↑151	↑209	↑249
Lym ^s	4週		↑155	↑167	↑168		↑137	↑193	↑194
	8週		↑148	↑152	↑168		↑142	↑219	↑237
	13週			↑151	↑161		↑161	↑228	↑259
Neu ^s	4週		↑233		↑194	↑160		↑175	↑203
	8週			↑191	↑212			↑147	↑137
	13週			↑173	↑190				↑226
PLT	4週		↑122	↑141	↑139	↑122	↑126	↑140	↑150
	8週		↑126	↑143	↑142			↑133	↑146
	13週		↑123	↑130	↑131			↑142	↑149

↑ ↓ : P<0.05, ↑ ↓ : P<0.01 (Dunnett検定または線形回帰モデルを介したt検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。

() 内は参考値 (有意差なし)

血液生化学的検査：投与終了時（13週時）にすべての生存動物を対象に、眼窩静脈叢より採血し、血漿あるいは血清を用い、以下の項目について測定した。

尿素窒素(BUN)、グルコース(Glu)、総コレステロール(T. Chol)、トリグリセリド、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(ALT)、アルカリフォスファターゼ、ガンマグルタミルトランスフェラーゼ、クレアチニン、総ビリルビン(T. Bil)、ナトリウム(Na)、カリウム(K)、クロール、無機リン(P)、カルシウム(Ca)、総蛋白(TP)、アルブミン(Alb)、グロブリン(Glb)、A/G (Glb、A/GはTPとAlbから算出)

対照群と比べて統計学的有意差を示した項目を表に示した。

表. 血液生化学的検査結果（13週時に実施）

項目	投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	1000	3000	10000	20000	1000	3000	10000	20000
BUN			↑124					↑117
Glu		↓79	↓77	↓77				
T. Chol		↑125	↑138	↑139			↑140	↑222
T. Bil								↓64
ALAT							↑156	↑171
Na			↑101	↑102				
K		↓93						
Ca								↑104
P								↑126
Alb		↓94	↓92	↓89	↓92	↓86	↓84	↓86
Glb		↑114	↑121	↑118		↑128	↑138	↑141
A/G	↓90	↓82	↓77	↓76	↓80	↓68	↓61	↓61

↑ ↓ : P<0.05、↑ ↓ : P<0.01 (Dunnett検定または線形回帰モデルを介したt検定)
 表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。
 () 内は参考値 (有意差なし)

雌の20000ppmでのみPの有意な増加が認められた。また、雄3000ppm以上、雌10000ppm以上でT. Cholの増加がみられた。加えて、雌雄3000ppm以上ではAlb減少、Glb増加がみられ関連してA/Gが減少した。雌の1000ppmではAlbならびA/Gの減少も認められた。

その他の項目でみられた変動は用量に依存したものではないか、あるいは変動幅が小さく、毒性学的意義を有するものとは思われなかった。

申請者注：雌10000ppm以上で認められたALATの増加は用量との関連もうかがわれることから投与の影響と思われた。一方、雄3000ppm以上で認められたGluの減少には用量に関連した傾向がなく、毒性学的意義を有するものとは思われなかった。

尿検査：投与終了後、すべての生存動物を対象に屠殺前夜より採尿し、得られた尿について以下の項目について検査した。

尿量、比重、pH（以上、計測）、潜血、ケトン体、糖、蛋白、ウロビリノーゲン、ビリルビン（以上、試験紙による半定量分析）、沈渣（鏡検）

次表に対照群と比べて統計学的有意差を示した項目を表記した。

雌の10000ppm以上の投与群で尿量の有意な増加がみられ、20000ppm群でこれに関連して極めてわずかな比重の減少がみられ有意差を認めた。

表. 尿検査結果

性別	雄				雌			
投与量 (ppm)	1000	3000	10000	20000	1000	3000	10000	20000
尿量							▲194	▲276
比重								▼99.6

↑↓：P<0.05、▲▼：P<0.01（Dunnett検定または線形回帰モデルを介したt検定）
表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。

眼科学的検査：試験開始前にすべて動物、投与12週時に対照群と20000ppm群のすべての生存動物を対象に、間接検眼鏡を用いて検査を実施した。

検体投与に関連したと思われる異常所見は全く観察されなかった。

臓器重量：すべての生存ラットを対象に、屠殺・剖検後、以下の臓器の重量測定を実施し、また、対体重比を算出した。

肝臓、腎臓、心臓、脾臓、脳、下垂体、胸腺、副腎、精巣、精巣上体、前立腺、卵巣、子宮、甲状腺

対照群と比べて統計学的有意差を示した項目を次表に示した。

3000ppm以上の投与群で雄では脾臓の実重量及び対体重比が有意に増加した。また、雌では肝臓実重量及び対体重比が有意に増加した。

前立腺の実重量の減少が全投与群で、対体重比の減少が10000及び20000ppm群で統計学的有意に認められたが、病理組織学的検査で関連した所見がみられなかったことから、毒性影響ではないと判断した。

その他、雌雄共10000ppm以上の投与群でみられた統計学的有意な変動については、両群でみられた最終体重が低かった事による二次的な変化と考えられた。

表. 臓器重量

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		1000	3000	10000	20000	1000	3000	10000	20000
最終体重			(92)	↓77	↓70		(95)	↓83	↓80
肝臓	実重量						↑111	↑115	↑118
	対体重比		↑118	↑131	↑134		↑118	↑138	↑147
腎臓	実重量			↓83	↓85				
	対体重比			↑108	↑121			↑111	↑122
脾臓	実重量		↑127	↑130	↑126				
	対体重比		↑140	↑170	↑180			↑141	↑154
心臓	実重量			↓85	↓82			↓90	↓86
	対体重比			↑112	↑119			↑108	
脳	実重量			↓96	↓93				↓94
	対体重比			↑125	↑133			↑115	↑117
副腎	実重量				↓77				
胸腺	対体重比								↑125
精巣	対体重比			↑132	↑146	/			
精巣上体	対体重比			↑121	↑131				
前立腺	実重量	↓78	↓78	↓56	↓49	/			
	対体重比			↓71	↓72				
卵巣	実重量	/							↓81
子宮	実重量								↓68
甲状腺	実重量				↓70				
下垂体	実重量			↓67	↓56			↓54	↓54
	対体重比							↓63	↓65

↑↓ : P<0.05、↑↓ : P<0.01 (Dunnett検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したものの。

肉眼的病理検査：投与期間終了後、すべての生存動物を屠殺し剖検を行った。

20000ppm群の雄6例、雌2例に肝臓の暗色化が観察された。その他には検体投与に関連したと思われる肉眼的異常所見は認められなかった。

表. 肉眼的病理検査所見

性別	雄					雌				
投与量 (ppm)	0	1000	3000	10000	20000	0	1000	3000	10000	20000
検査動物数	10	9	10	10	10	10	10	10	10	10
肝臓： 暗色化	0	0	0	0	↑6	0	0	0	0	2

↑↓ : P<0.05、↑↓ : P<0.01 (カイ2乗検定、申請者実施)

病理組織学的検査：投与期間終了後、すべての生存動物を屠殺、剖検後、以下の臓器・組織を摘出して常法に従い組織標本を作製した。

肝臓、腎臓、心臓、肺、脾臓、脳、脊髄(頭部、胸部、腰部)、下垂体、甲状腺(上皮小体含む)、胸腺、副腎、精巣、精巣上体、前立腺、卵巣、気管、舌、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膵臓、膀胱、前立腺、精囊、リンパ節(下顎、腸間膜)、子宮(頸部含む)、膣、大動脈、関節面(大腿脛骨)、骨(胸骨)、眼及び視神経、ハーダー氏腺、坐骨神経、乳腺、骨格筋、皮膚、顎下腺、骨髄(胸骨)、肉眼的異常部位

肝臓、副腎、脾臓、胸骨骨髄、腎臓については全動物を対象に病理組織学的検査を行った。その他の組織については対照群と20000ppm群の動物について実施した。

統計学的有意に頻度の増加を認めた所見を表に示した。

表. 主な病理組織学的検査所見

性別	雄					雌				
	0	1000	3000	10000	20000	0	1000	3000	10000	20000
投与量 (ppm)	0	1000	3000	10000	20000	0	1000	3000	10000	20000
肝臓： 検査数	10	9	10	10	10	10	10	10	10	10
肝細胞肥大： 合計	0	0	0	0	↑5	0	0	0	1	3
(小葉中心性) 軽微	0	0	0	0	5	0	0	0	1	2
軽度	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
色素沈着： 合計	0	4	↑6	▲10	▲10	0	↑5	▲9	▲9	▲10
(主にクッパー細胞) 軽微	0	4	6	6	4	0	5	9	5	2
軽度	0	0	0	4	6	0	0	0	4	8
脾臓： 検査数	10	9	10	10	10	10	10	10	10	10
ヘムデリン沈着： 合計	10	9	↑10	▲10	▲10	10	10	▲10	10	▲10
軽微	8	7	1	0	0	5	0	0	1	0
軽度	2	2	7	4	1	5	9	5	7	5
中等度	0	0	2	6	9	0	1	5	2	5
髓外造血： 合計	10	9	↑10	10	10	10	10	10	10	↑10
軽微	5	3	0	1	1	5	1	2	2	0
軽度	5	6	10	9	9	5	8	8	8	9
中等度	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
副腎： 検査数	10	9	10	10	10	10	10	10	10	10
束状帯空胞変性： 合計	10	9	10	▲10	▲10	10	10	10	10	10
軽微	10	6	6	1	0	10	10	10	10	10
軽度	0	3	3	3	7	0	0	0	0	0
中等度	0	0	1	6	3	0	0	0	0	0

↑ ↓ : P<0.05、▲ ▼ : P<0.01 (累積カイ二乗検定、申請者実施)

小葉中心性の肝細胞肥大が20000ppm群の雄5例、雌3例、10000ppm群の雌1例に認められ、その殆どは軽微な変化であった。また主としてクッパー細胞に琥珀色の色素沈着がびまん性に雌雄共に全投与群で認められ、10000ppm以上の投与群では軽微～軽度の所見がみられた。

脾臓では雌雄共に対照群を含むすべての動物にヘモジデリン沈着と髓外造血がみられたが、両所見共、雄では3000ppm以上、雌では1000ppm以上の投与群で所見の程度が対照群に比べて強くあらわれた。

副腎では雌雄共に束状帯におけるびまん性の空胞変性が全動物にみられたが、雄の10000ppm以上の投与群で中等度に移行する頻度が増加した。

以上、検体のラットに対する90日間混餌投与において、雌雄共に全投与群でRBC、Hb及びHtの有意な減少、20000ppmで赤血球恒数(MCV, MCH)の増加がみられ、雌雄全投与群でReticとHzが用量に関連して増加し、赤血球色調の不同や大小不同、雄では全投与群、雌では3000ppm以上で大赤血球が観察された。また、雌雄共に全投与群でA/Gの減少、肝クッパー細胞に色素沈着所見(雌で有意)が認められた。さらに雄ではMHbが増加し、雌ではAlb減少、脾臓のヘモジデリン沈着と髓外造血所見が対照群に比べて強かった。

さらに3000ppm以上の投与群においては雌雄共に体重増加量が減少し、PLT、WBC、Lym、及びGlbが増加し、AlbならびA/Gが減少した。また、雌は1000ppmでもAlbならびA/Gが減少した。3000ppm以上ではさらに雄でT.Cholの増加、脾臓の実重量及び対体重比が増加し、ヘモジデリン沈着と髓外造血が対照群に比べて強くあらわれた。雌では摂餌量減少傾向、MHbの増加が認められ、肝臓実重量及び対体重比が有意に増加した。

さらに10000ppm以上の群では雌雄共に摂餌量の減少が認められ、Neuが増加した。また、雄では副腎束状帯の空胞変性が中等度に移行する頻度が増加した。雌ではT.Chol、ALATが増加し、また尿量増加もみられ、肝で軽微な小葉中心性肝細胞肥大が認められた。

加えて、20000ppm投与群においては雌雄で肝臓の肉眼的な暗色化が観察され、雄で軽微な小葉中心性肝細胞肥大が認められた。雌ではPが増加し、極めてわずかな尿比重の減少がみられた。

本試験は慢性毒性/発がん性試験(毒性資料No. 原体-30)における最大耐量(MTD)の知見を得る目的でも行われたが、結果から10000ppmは明らかに、また3000ppmでもわずかにMTDを上回る用量と考えられた。さらに本試験から神経毒性を示唆する所見は高用量投与にもかかわらず全く認められなかった。

申請者注：本試験における無毒性量は雌雄共1000ppm以下(雄：60.6mg/kg/日以下、雌：71.0mg/kg/日以下)にあると考えられる。

イヌを用いた 18 週間反復経口投与毒性試験

毒性資料 No. 原体-20

試験機関：

報告書作成年：1968 年

検 体：

供試動物：ビーグル犬、17～18 ヶ月齢、雌雄各 2 匹

投与期間：18週間

投与方法：投与期間中は毎日、給餌1時間後に検体をゼラチンカプセルに入れて経口的に与えた。投与量は初めの9週までは250mg/kg/日、13週までは500mg/kg/日、そして最終18週までは1000mg/kg/日とし、いわゆる漸増法で雄2匹、雌2匹に投与した。

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毎日 1 回観察した。

500mg/kg投与時（投与10週）に、雌1例で嘔吐が認められたが、一過性であり、検体投与の影響とは考えられなかった。他には特記すべき異常所見は観察されなかった。また投与期間を通じて死亡はみられなかった。

体 重：投与期間中、すべての動物を対象に毎週測定した。

雌雄共に検体投与に起因したと思われる体重の変動は認められなかった。

摂餌量：投与期間中、全動物の摂餌量を毎日測定した。

投与最終週（1000mg/kg投与時）で雌雄共にやや減少傾向がみられたが、検体投与の影響とは捉えられなかった。

申請者注：この最終週のみでのわずかな摂餌量の減少傾向は、最終週の摂餌量を個体別にみても持続した減少はみられず、一般状態や体重にも変化はなく、毒性影響を示唆するものとは認められなかった。

循環器系検査：投与前、投与 12 週及び 17 週時に全動物を対象に血圧、心拍数及び心電図を測定した。

いずれの検査時においても異常は認められなかった。

血液学的検査：投与前、投与3、5、9、13及び17週時に以下の項目について測定した。

赤血球数(RBC)、ヘモグロビン濃度(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、平均赤

血球ヘモグロビン量(MCH)、網状赤血球数、血小板数、凝固時間、トロンビン時間、白血球数、白血球百分比、赤血球形態

次表に投与に関連したと思われる項目を示した。

表. 血液学的検査結果

項目	背景 [#] 対照	投与前	投与期間				
			3週	5週	9週	13週	17週
RBC (10 ⁶ /mm ³)		5.4	5.4	5.0	5.3	6.6	4.9
Hb (g/100mL)		14.8	13.7	12.9	14.7	14.7	14.7
Ht (%)		48	46	46	46	47	47
MCH (fg)		27.2	25.4	26.4	27.6	22.1	-
Hypochromic.		0	2	2	0	0	0
Anisocytosis		0	0	1	2	0	0

N=4 (雌雄合計の平均) # : 無処理動物(雄15匹、雌15匹)の平均

Hypochromic. : 鏡検で低色素性赤血球を認めた動物の頻度

Anisocytosis : 鏡検で赤血球の大小不同を認めた動物の頻度

投与3~5週時 (250mg/kg投与) にHbの減少が窺われた。また投与3~9週時 (250mg/kg投与) に赤血球形態検査で低色素性の赤血球や赤血球の大小不同が観察され、いずれの所見共、検体投与との関連を否定できなかった。

血液生化学的検査 : 投与前、投与3、5、9、13及び17週時に以下の項目について測定した

グルコース、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、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、アルカリフォスファターゼ、コリンエステラーゼ (血漿:PChE、血球:EChE)、総脂質、コレステロール、ビリルビン、尿素、尿素窒素、残余窒素、クレアチニン、ナトリウム(Na)、カリウム、クロール

次表に投与に関連したと思われる項目を示した。

表. 血液生化学的検査結果

項目	背景 [#] 対照	投与前	投与期間				
			3週	5週	9週	13週	17週
EChE (Δ pH/h)		-	0.05	0.21	0.15	0.10	0.16
Na (mg/dl)		341	325	-	339	345	347

N=4 (雌雄合計の平均)

: ChE-無処理動物(雄7匹、雌8匹)の平均、Na-無処理動物(雄15匹、雌15匹)の平均

投与3週時 (250mg/kg投与) 及び13週時 (500mg/kg投与) に血球ChE活性の減

少、また投与3週時 (250mg/kg投与) にNaの減少が窺われた。しかし、いずれも経時的な関連性がないことから毒性影響とは考えられなかった。

その他の項目についてはいずれも明らかな変動は観察されなかった。

肝機能及び耐糖能検査：全動物を対象として肝機能をみるためのBSP排泄検査を投与13週時 (500mg/kg投与) 及び18週時 (1000mg/kg投与時) に、また耐糖能 (グルコース負荷) 検査を投与12週時 (500mg/kg投与) 及び18週時 (1000mg/kg投与時) に行った。

両検査共、検体投与に関連すると思われる変動は認められなかった。

尿検査：全動物を対象に投与前、投与3、5、9、13及び17週時に採尿し、以下の項目について検査した。

比重、pH(定量)、グルコース、蛋白、ビリルビン、潜血(半定量)、沈渣(鏡検)

いずれの検査時においても特記すべき所見は観察されなかった。

眼科学的検査：全動物を対象に投与前、投与12及び18週時に眼科学的検査を実施した。

異常な所見は認められなかった。

臓器重量：全動物を対象に、屠殺・剖検後、下記の各臓器の重量測定を実施した。また最終体重から対体重比を算出した。

肝臓、腎臓、心臓、脾臓、副腎、甲状腺、精巣、卵巣、眼球、下垂体

臓器重量の変動は認められなかった。

肉眼的病理検査：18週の投与期間終了後、すべての生存動物について剖検が行われた。

検体投与に関連したと思われる肉眼的異常所見は観察されなかった。

病理組織学的検査：全動物を対象とし、投与終了時に剖検を行った後、以下の組織について組織標本を作製して鏡検した。

肝臓、腎臓、心臓、肺、脾臓、大脳、小脳、延髄、脊髄、下垂体、甲状腺、胸腺、副腎、精巣、卵巣、胃、十二指腸、空腸、結腸、膵臓、胆嚢、膀胱、リンパ節、前立腺、子宮、骨髄、皮膚、唾液腺、肉眼的異常部位

検体投与に関連したと思われる所見を次表に示した。

表. 病理組織学的検査所見

性別	雄	雌
投与量 (mg/kg/日)	250(～9週), 500(～13週), 1000(～18週)	
検査動物数	2	2
肝臓：黄褐色色素沈着	2	2
脾臓：髓外造血	0	1

全動物で肝臓の実質細胞に微細な褐色色素沈着を認めた。また雌1例の脾臓に髓外造血像を観察し、投与との関連が示唆された。しかし骨髄を含む他の組織においては検体投与に関連したと思われる異常所見は観察されなかった。

以上、幾つかの変動が認められたが、いずれも僅かな変化であるか一過性のものであり投与に関連する毒性影響とはみなさなかった。

申請者注：イヌに対する検体の18週間にわたる漸増投与（250～1000mg/kg/日）において、Hbの減少が認められ、低色素性赤血球や赤血球の大小不同、肝臓における黄褐色色素沈着、脾臓での髓外造血像（雌の1例のみ）がみられており、投与との関連が示唆されるものと考えられた。

イヌを用いた混餌投与による 60 日間反復経口投与毒性試験

毒性資料 No. 原体-21

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2000 年

検体の純度：

供試動物：Beagle イヌ (Harlan UK)、7~8 ヶ月齢、1 群雌雄各 4 匹

投与期間：60 日間 (2000 年 3 月~5 月)

投与方法：検体を 0、300、3000 及び 30000 ppm の濃度で飼料に混入し、60 日にわたって摂食させた。飼料調製は毎週行った。

観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡率：投与開始前と投与終了後にすべての動物を対象に体温測定等を含む臨床観察を行った。また全動物について毎朝、異常行動の有無、神経一筋肉協調性、外徴の観察を行い、平日は午後も同様に観察した。切迫殺が必要な場合は直ちに死後検査を行った。

30000 ppm 群で試験 42 日に雄 1 例、試験 59 日に雄 2 例、雌 1 例を切迫殺した。これらの動物は食欲不振や活動性低下、蒼白な歯茎や冷たい四肢を示した。他の動物では投与期間を通じていずれも異常は認められなかった。

体重：投与期間中、すべての動物を対象に毎週測定した。

体重の推移を次図に示した。また、投与 4、6 及び 8 週後と投与期間中の体重増加量を表に示した。

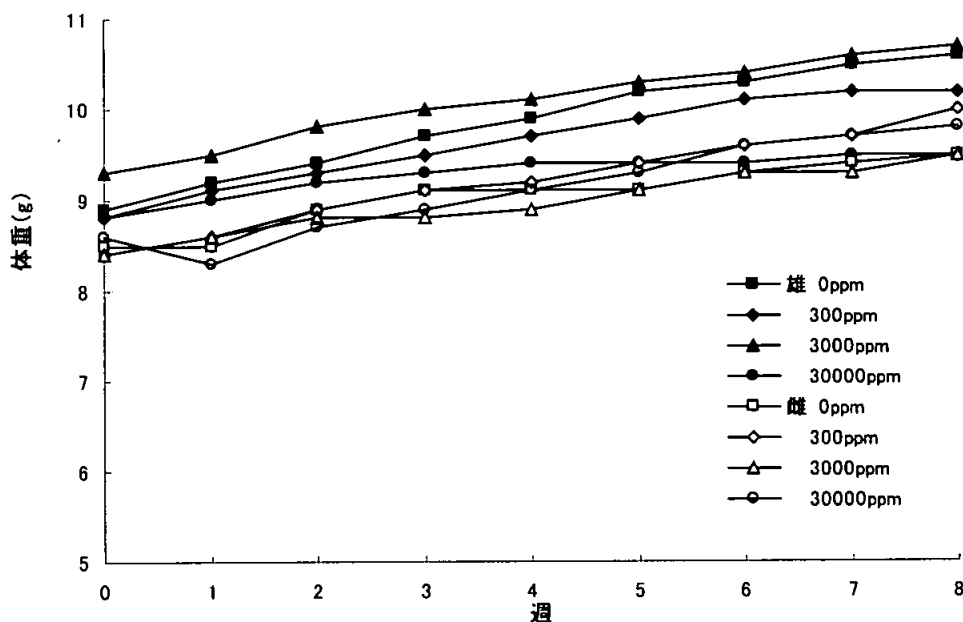


表. 体重の推移

性別	雄			雌		
投与量 (ppm)	300	3000	30000	300	3000	30000
平均体重						
4週			(95)			
6週			(91)			
8週			(90)			
体重増加量						
0 - 4週			(60)			
0 - 8週			↓53			

↓ : P<0.05 (Dunnett検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。

()は参考値 (有意差なし)

雄の30000ppm群では投与後半で対照群に比べ低体重傾向を示した。また、全投与期間中 (0 - 8週) の体重増加量は統計学的有意に減少した。

雌では体重への影響はみられなかった。

摂餌量 : 投与期間中、すべての動物を対象に毎週測定した。

雌雄各投与群共、摂餌量への影響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次表のとおりであった。

投与量 (ppm)		300	3000	30000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	11.3	118	1199
	雌	11.8	123	1086

血液学的検査 : 投与開始前、投与4週及び8週後にすべての生存動物を対象に、頸静脈より採血した血液を用い、以下の項目について測定した。また、投与期間中に切迫殺した動物及び投与期間終了の生存動物のすべてを対象に大腿骨骨髓の塗抹標本を作製し、これを鏡検した。

赤血球数(RBC)、ヘモグロビン濃度(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、網状赤血球数(Retic)、ハインツ小体(Hz ; 8週のみ)、メトヘモグロビン濃度(MHb ; 8週のみ)、白血球数(WBC)、リンパ球数、好中球数(Neu)、単球数、好酸球数、好塩基球数、血小板数(PLT)、プロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)、赤血球沈降速度

対照群と比べて統計学的有意差を示した項目を表に示した。

表. 血液学的検査結果

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		300	3000	30000 [§]	300	3000	30000
RBC	4週			↓76			↓77
	8週		(93)	↓69			(72)
Hb	4週			↓82			↓82
	8週			(73)			(76)
Ht	4週			↓86			↓87
	8週			(80)			(78)
MCV	4週			↑113			↑112
	8週			↑119			↑111
MCH	4週			↑108			↑107
	8週			↑107			↑109
MCHC	4週			↓95			↓96
	8週			(91)			
Retic	4週		↑233	↑536		(162)	↑301
	8週			(179)			(148)
Hz (%)	8週 [#]			↑580			(440)
MHb (%)	8週 [#]		↑580	↑840		↑400	↑850
WBC	8週			↑129			
Neu	8週			↑136			
PLT	4週			↑177			↑180
	8週			↑145			↑177
骨髓検査							
Myelo	8週 [#]	↑320					
Metamy	8週 [#]		↑236				
Neu	8週 [#]	↓79	↓71	↓65			
Lym	8週 [#]	↑231					
Norm	8週 [#]			↑153		↑144	↑156
M/E	8週 [#]			↓45			↓45

↑ ↓ : P<0.05、↑↓ : P<0.01 (Dunnett検定または変法t検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。

§: N=3、他の群はすべてN=4。 ()は参考値 (有意差なし)

: 8週後のみ実施

骨髓検査 : Myelo=Myeloblast(骨髓芽球) Norm=Late normoblast(後期正赤芽球)
 Metamy=Metamylocyte(後骨髓球) M/E=骨髓球/赤芽球比
 Neu=Neutrophil(好中球)
 Lym=Lymphocyte(リンパ球)

投与4及び8週後、雌雄共に30000ppm群でRBC、Hb及びHtの有意な減少ないし減少傾向（有意差なし）が認められた。これに伴い赤血球恒数の統計学的有意な変動がみられた。投与8週後には雄の3000ppm群でもRBCの減少傾向（有意差なし）が観察された。またReticの増加が投与4週後に3000ppm以上の雌雄投与群でみられ、8週後では有意差を認めなかったものの30000ppm群雌雄で増加が窺われた。さらに8週後に調べられたMHbとHzでは、雌雄共に3000ppm以上の投与群でMHbの増加、30000ppmでHzの増加が観察された。また、30000ppmでは雌雄で投与4及び8週後のPLT増加が統計学的有意に認められた。その他、投与8週後の検査で30000ppm群の雄でWBC及びNeuの増加が有意であった。

投与8週後に実施された骨髄検査では、雌雄の30000ppm群において後期正赤芽球の増加とM/E比の減少が有意に認められ、雌の3000ppm群でも後期正赤芽球の有意な増加がみられた。

申請者注：骨髄好中球の統計学的有意でかつ用量に依存した減少が雄の全投与群で観察されたが、末梢血では3000ppm以下の投与群で明らかな変動をみていないことから、3000ppm以下の群の変動については毒性影響とは捉えられなかった。また、骨髄検査ではMyelo、Metamy及びLymで有意な増加もみられたが、用量と関連がなく偶発的な変化と考えられた。

血液生化学的検査：投与開始前、投与4週及び8週後にすべての生存動物を対象に、頸静脈より採血した血液の血漿あるいは血清を用い、以下の項目について測定した。

総蛋白(TP)、アルブミン(Alb)、グロブリン(Glb)、A/G、尿素窒素(BUN)、グルコース、総コレステロール(T. Chol)、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、アルカリフォスファターゼ、ガンマグルタミルトランスフェラーゼ、クレアチンキナーゼ、クレアチニン(Cre)、総ビリルビン(T. Bil)、ナトリウム、カリウム(K)、クロール(Cl)、無機リン、カルシウム

対照群と比べて統計学的有意差を示した項目を表に示した。

表. 血液生化学的検査結果

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		300	3000	30000 [§]	300	3000	30000
TP	8週					↑105	↑106
Alb	4週			↓89			↓89
	8週			↓84			↓88
Glb	4週		↑114	↑127		↑113	↑122
	8週					↑116	↑128
A/G	4週			↓73		↓83	↓75
	8週		↓82	↓55		↓83	↓75
BUN	4週					↑130	
Cre	4週						↑118
T. Chol	4週			↑152			↑166
	8週	↑109		(143)			↑154
T. Bil	8週		↓79	↓68			
K	8週		↓93				
Cl	4週					↓96	
	8週					↓96	

↑ ↓ : P<0.05、↑↓ : P<0.01 (Dunnett検定または変法t検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。

§: N=3、他の群はすべてN=4。

()は参考値 (有意差なし)

雌雄共、30000ppm群でAlbの減少、Glbの増加、これに伴いA/Gの減少が有意に認められた。また、3000ppm群でもGlbの増加が投与4週後の雌雄、投与8週の雌に有意に認められた。さらにA/Gの減少も投与4週の雌、投与8週の雌雄に有意に認められた。雌雄共に30000ppm群では両検査時にT. Cholの増加が有意に (雄8週は有意差なし) 観察され、投与との関連が示唆された。また雄の3000ppm以上の投与群で8週後にT. Bilの統計学的有意な減少がみられた。雌の30000ppm群では投与4週後にCreの統計学的有意な増加がみられたが、8週後にはみられていないこと、他の検査で関連した変動がみられていないことから毒性影響とは捉えられなかった。その他の項目でみられた変動も用量に依存したものではないか、わずかな変化であることから、いずれも検体投与による毒性影響とは捉えられなかった。

申請者注 : T. Bilの減少は毒性学的意義が低いものと考えられた。

尿検査 : 投与開始前、投与4週及び8週後にすべての生存動物を対象に得られた尿について以下の項目について検査した。なお投与開始前、投与4週後の検査

ではカテーテル導入により、8週後の検査では剖検時に直接膀胱から採尿した。

外観(目視)、比重、pH(以上、計測)、潜血、ケトン体、糖、蛋白、ウロビリノーゲン、ビリルビン(以上、試験紙による半定量分析)、沈渣(鏡検)

検体投与に関連したと思われる変動はみられなかった。

投与8週後の雄3000ppm群でpHの上昇(pH=7)が対照群(pH=5)に比し統計学的有意にみられたが、用量に依存した変動でないことから検体投与との関連はないと考えられた。

眼科学的検査：試験開始前にすべて動物、投与8週後に対照群と30000ppm群のすべての生存動物を対象に、間接検眼鏡を用いて検査を実施した。

検体投与に関連したと思われる異常所見は全く観察されなかった。

臓器重量：すべての生存動物及び切迫殺動物を対象に、屠殺・剖検後、以下の各臓器の重量測定を実施し、体重比を算出した。

肝臓、腎臓、心臓、脾臓、脳、下垂体、胸腺、副腎、精巣、精巣上体、前立腺、卵巣、子宮、甲状腺

対照群と比べて統計学的有意差を示した項目を表に示した。

表. 臓器重量 (生存動物)

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		300	3000	30000 ^{\$1}	300	3000	30000 ^{\$2}
最終体重				(89)			(112)
肝臓	実重量			(116)		(119)	↑ 164
	対体重比			(132)		(118)	↑ 146
脾臓	実重量					(122)	(150)
	対体重比					(150)	(150)
副腎	実重量			(116)		(124)	(122)
	対体重比			↑ 200			
甲状腺	実重量			(144)		(133)	↑ 162
	対体重比			↑ 167		(129)	↑ 143
下垂体	実重量						↑ 127
卵巣	実重量						(416)
	対体重比						(300)
子宮	実重量						(250)
	対体重比						(214)

↑ : P<0.05 (Dunnett検定または変法t検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。

\$1: N=1, \$2: N=3, 他の群はすべてN=4。(N: 検査動物数)

()は参考値 (有意差なし)

表. 臓器重量 (切迫殺動物)

性 別		雄			雌		
		300	3000	30000 ^{\$3}	300	3000	30000 ^{\$4}
肝臓	実重量	-	-	135	-	-	158
	対体重比	-	-	161	-	-	186
脾臓	実重量	-	-	419	-	-	284
	対体重比	-	-	500	-	-	350
胸腺	実重量	-	-	49	-	-	34
	対体重比	-	-	58	-	-	43
甲状腺	実重量	-	-	127	-	-	118
	対体重比	-	-	150	-	-	143

統計解析は未実施

表中の数値は計画殺の対照群を100とした場合の値を示したもの。

\$3: N=3、\$4: N=1。(N:検査動物数)

-: 対象なし

- 最終屠殺動物 -

肝臓実重量及び対体重比の増加が雄30000ppm群、雌3000ppm以上の投与群で認められた (雌30000ppm群でのみ有意)。

脾臓実重量及び対体重比の増加傾向 (有意差なし) が雌の3000ppm以上の投与群で窺われた。

副腎、甲状腺について雄30000ppm群、雌3000ppm以上の投与群で実重量及び対体重比の有意な増加あるいは有意差を認めないものの増加傾向がみられた。

雌30000ppm群の下垂体の実重量が統計学的有意に増加したが、対体重比では有意な差はみられなかった。また30000ppm群の卵巣及び子宮の実重量及び対体重比が統計学的有意ではないものの明らかな増加を示した。しかし肉眼的及び病理組織学的検査から性周期に伴うものと考えられ、検体投与による毒性影響とは考えられなかった。

- 切迫屠殺例 (30000ppm群雄3例、雌1例) -

肝臓、脾臓及び甲状腺の実重量及び対体重比の明らかな増加が雌雄でみられた。胸腺実重量及び対体重比の減少も雌雄でみられたが、これは一般状態の悪化に伴う二次的な変化と考えられた。

肉眼的病理検査: 投与期間終了後、すべての生存動物を屠殺し剖検を行った。また切迫殺動物 (30000ppm群雄3例、雌1例) については発見時に直ちに剖検した。

生存動物における剖検では、雌の30000ppm群で3例中1例に肝臓の肥大を、2

例にその明瞭な小葉構造を観察した。また同群の3例中1例に卵巣と子宮の肥大、他1例に卵巣嚢腫(液貯留)を認めた。その他の群では特記すべき肉眼的異常所見は認められなかった。

切迫殺動物ではいずれも血の気のひいた四肢を示した。また雄2例に肝臓肥大、1例に明瞭な小葉構造を観察した。さらに雄2例と雌1例に脾臓の肥大が認められた。その他には検体投与に関連したと思われる所見はみられなかった。

表. 肉眼的病理検査所見

性別	雄				雌			
	0	300	3000	30000	0	300	3000	30000
投与量 (ppm)	0	300	3000	30000	0	300	3000	30000
最終屠殺動物数	4	4	4	1	4	4	4	3
肝臓: 肥大	0	0	0	0	0	0	0	1
明瞭な小葉構造	0	0	0	0	0	0	0	2
卵巣: 肥大	/				0	0	0	1
嚢腫(液貯留)					0	0	0	1
子宮: 肥大					0	0	0	1
切迫屠殺動物数	0	0	0	3	0	0	0	1
四肢: 蒼白	-	-	-	3	-	-	-	1
肝臓: 肥大	-	-	-	2	-	-	-	0
明瞭な小葉構造	-	-	-	1	-	-	-	0

病理組織学的検査: 切迫殺動物(30000ppm群雄3例、雌1例)及び投与期間終了後、すべての生存動物について、以下の臓器または組織を摘出し、常法に従い組織標本を作製した。なお、肝臓についてはOROによる脂肪染色標本も作製した。すべての動物を対象とし鏡検を実施した。

肝臓、腎臓、心臓、肺、脾臓、脳、脊髄(頭部、胸部、腰部)、下垂体、甲状腺(上皮小体含む)、胸腺、副腎、精巣、精巣上体、前立腺、卵巣・卵管、気管、舌、唾液腺、扁桃、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、胆嚢、膵臓、膀胱、前立腺、リンパ節(下顎、腸間膜)、子宮(頸部含む)、膈、大動脈、関節面及び骨(大腿骨)、骨(胸骨)、眼及び視神経、坐骨神経、乳腺、骨格筋、横隔膜、外涙腺、皮膚・皮下、骨髓(肋骨または胸骨)、肉眼的異常部位

以下に投与に関連したと思われる所見を示した(表には計画殺及び切迫殺を合計した頻度を示した)。

表. 主な病理組織学的検査所見

性別	雄				雌			
	0	300	3000	30000	0	300	3000	30000
投与量 (ppm)	0	300	3000	30000	0	300	3000	30000
所見/ 検査動物数	4	4	4	4	4	4	4	4
肝臓: 検査数	4	4	4	4	4	4	4	4
褐色色素沈着 ^{a)} : 合計	0	0	0	↑4	0	0	0	↑4
(クッパー細胞) 軽微	0	0	0	0	0	0	0	1
軽度	0	0	0	2	0	0	0	2
中等度	0	0	0	2	0	0	0	1
髓外造血: 合計	0	0	0	3	0	0	0	0
軽微	0	0	0	1	0	0	0	0
中等度	0	0	0	2	0	0	0	0
肝細胞壊死: 合計	0	0	0	3	0	0	0	1
(限局性) 軽微	0	0	0	1	0	0	0	0
軽度	0	0	0	1	0	0	0	1
中等度	0	0	0	1	0	0	0	0
腎臓: 検査数	4	4	4	4	4	4	4	4
褐色色素沈着 ^{b)} : 軽微	0	0	0	↑4	0	0	0	3
(皮質尿細管)								
脾臓: 検査数	4	4	4	4	4	4	4	4
髓外造血: 合計	0	1	1	3	0	0	1	2
軽微	0	1	0	0	0	0	1	1
軽度	0	0	1	1	0	0	0	0
重度	0	0	0	0	0	0	0	1
極重度	0	0	0	2	0	0	0	0
副腎: 検査数	4	4	4	4	4	4	4	4
びまん性過形成: 合計	0	0	1	3	0	0	↑4	↑4
(球状帯) 軽微	0	0	1	3	0	0	3	2
軽度	0	0	0	0	0	0	1	2
甲状腺: 検査数	4	4	4	4	4	4	4	4
びまん性過形成: 合計	1	0	2	↑4	0	1	3	↑4
(濾胞上皮) 軽微	1	0	2	0	0	0	3	1
軽度	0	0	0	4	0	1	0	3
骨髓: 検査数	4	4	4	4	4	4	4	4
細胞成分増多: 合計	4	4	4	↑4	4	4	4	↑4
軽度	1	3	2	0	2	1	0	0
中等度	3	1	2	0	2	3	3	0
重度	0	0	0	0	0	0	1	2
極重度	0	0	0	4	0	0	0	2

↑: P<0.05 (累積カイ二乗検定、申請者実施)

^{a)}ヘモジデリン

^{b)}リボフスチン

肝臓において雌雄共30000ppm群で全例にクッパー細胞に褐色色素沈着の増加がみられ、Perl's Prussian Blue陽性であったことからヘモジデリン沈着であると示唆された。

また雄で髄外造血が3例にみられた。さらに、30000ppm群の雄3例、雌1例（全て切迫殺動物）に限局性の肝細胞壊死が観察された。

腎臓では30000ppm群の雄全例、雌3例の皮質尿細管に褐色色素沈着をみた。この色素沈着はPerl's Prussian Blueに陰性で、Schmorl染色で陽性であったことから、リポフスチンであろうと推察された。

脾臓において軽度以上の髄外造血が3000ppm群の雄で1例、30000ppm群の雄3例、雌1例に認められた。また軽微な髄外造血も散見されたが、この程度の所見は通常みられる範囲のものであり、毒性影響とは捉えられなかった。

副腎の球状帯における過形成や甲状腺の濾胞上皮の過形成が雌雄共に3000ppm以上の投与群で散見され、投与との関連が窺われた。

また骨髄における細胞成分の増多の程度が雄の30000ppm群と雌の3000ppm以上の投与群で対照群に比べより強く認められた。

以上、検体のイヌを用いた60日間混餌投与において、3000ppmでは雄でRBCの減少、雌で後期正赤芽球の増加がみられた。3000ppm以上では雌雄共にRetic、MHb、Glbの増加、A/Gの減少がみられ、副腎球状帯あるいは甲状腺濾胞上皮に過形成が認められた。また、雄ではT. Bilの減少、脾臓の髄外造血亢進、雌で肝臓、脾臓、副腎及び甲状腺重量の増加、骨髄細胞成分の増多が認められた。

加えて30000ppm群では雌雄共にAlb、RBC、Hb、Ht及びM/E比が減少し、T. Chol、Hz、PLT及び後期正赤芽球が増加した。また、脾臓及び肝臓の肥大、肝の明瞭な小葉構造を観察し、肝のヘモジデリン沈着及び壊死、腎皮質尿細管のリポフスチン沈着を認めた。また、雄では体重増加量抑制がみられ、WBC及びNeuが増加し、肝臓、脾臓、副腎及び甲状腺重量増加、肝髄外造血、骨髄細胞成分の増多も認めた。雌では脾臓の髄外造血亢進が認められた。

30000ppm群では一般状態の悪化から雌雄で切迫殺に至り、最大耐量（MTD）を超えていた。本試験における無毒性量は雌雄共に300ppm（雄：11.3mg/kg/日、雌：11.8mg/kg/日）であった。

申請者注： イヌの90日間反復経口投与毒性試験について

イヌの90日間反復経口投与毒性試験成績としてイヌを用いた2報の試験成績を提出しているが、1報は検体をゼラチンカプセルに入れ投与量250mg/kg（9週まで）から500mg/kg（13週まで）、1000mg/kg（最終まで）へと段階的に増加させた漸増法で標準動物数雌雄各4匹以上に満たない雌雄各2匹に18週間投与（No. 原体-20）を行っており、もう一報の試験では混餌による投与期間が60日間（No. 原体-21）であり標準投与期間90日には不足していた。

しかしながら、No. 原体-20の試験では、血液学的あるいは血液生化学的検査、尿検査など一連の検査を90日（13週）においても実施（投与前、3、5、9、13、17週に実施）しており、9週（投与时250mg/kg）には軽度ながらヘモグロビン減少や低色素性あるいは大小不同な赤血球が認められており、2匹と動物数は少ないものの血液系への投与の影響が認められている。また、No. 原体-21の60日間混餌投与試験では3000ppm（雄：118、雌123mg/kg相当）以上で雌雄に網状赤血球増加や雄で赤血球減少、雌で赤芽球が増加し、30000ppm（雄：1199、雌1086mg/kg相当）では雌雄で、赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリット減少などがみられており、No. 原体-20の試験と同様に血液への影響が示唆され、両試験より本検体投与による影響は十分に検出されているものと考えられる。

以上のことより、イヌを用いた18週間投与用量漸増経口投与及び60日間反復経口投与毒性試験の二つの試験結果を以って、90日間反復経口投与試験の代替となるものと考えた。

また、総合的無毒性量としてNo. 原体-21の試験成績をもとに雄：11.3mg/kg/日、雌：11.8mg/kg/日と判断した。この数値は250mg/kg/日の約20分の1に満たない量であることから、250mg/kg/日の毒性影響の程度が軽度であることを考慮に入れると、特に投与期間60日と90日の差が無毒性量に影響することはないものと考えられた。

なお、イヌの慢性毒性試験（No. 原体-32）の無毒性量が雄：27mg/kg/日、雌：25mg/kg/日であることから、イヌの亜急性影響に対する無毒性量として上記の通りとすることに特段の影響はないものと考えた。

(7) 反復経皮投与毒性

ラットを用いた21日間反復経皮投与毒性試験

毒性資料No. 原体-22

「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「4. 試験成績の提出の除外について」（2）⑩イの規定により下記の理由が該当することから試験を省略した。

本剤の急性経皮毒性試験の結果から、強い経皮毒性等を有するおそれがないと考えられるため。

(8)反復吸入毒性

ラットを用いた90日間反復吸入毒性試験

毒性資料No. 原体-23

「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「4. 試験成績の提出の除外について」（2）①イの規定により下記の理由が該当することから試験を省略した。

本剤の急性吸入毒性試験の結果から、強い吸入毒性等を有するおそれがないと考えられるため。

(9) 反復経口神経毒性

ラットを用いた反復経口投与神経毒性試験

毒性資料No. 原体-24

以下の理由から、反復経口神経毒性試験について除外申し出書とする。

1. ラットの90日間反復経口投与毒性試験

ラットの90日間反復経口投与毒性試験において、致死量以下の用量で特異的な神経毒性を示唆する所見はない。

2. その他の試験（90日より長期の試験）

ラット慢性毒性／発がん性併合試験、イヌ1年間反復経口投与毒性試験、マウス慢性毒性／発がん性併合試験及びラット繁殖試験において、致死量以下の用量で特異的な神経毒性を示唆する所見はない。

3. 既知神経毒性物質との化学構造の相関について

現在の科学的知見において、フェンメデイファムは既知神経毒性物質との化学構造の相関はない。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある

(10) 反復投与遅発性神経毒性

ニワトリを用いた28日間反復経口投与遅発性神経毒性試験

毒性資料No. 原体-25

「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「4. 試験成績の提出の除外について」(2)⑬の規定により下記の理由が該当することから試験を省略した。

本剤の急性遅発性神経毒性試験成績を提出する必要がないと考えられる場合であるため。

(11) 1年間反復経口投与毒性/発がん性

ラットにおける慢性毒性・発がん性試験

毒性資料 No. 原体-26

試験機関：

報告書作成年：1980年

検体の純度：

供試動物：Sprague-Dawley系ラット (Charles River CD)、1群雌雄各60匹 (うち雌雄各10匹は投与12ヶ月後に中間殺)

投与期間：24ヶ月 (1977年8月～1979年8月)

投与方法：検体を0、20、100及び500ppmの濃度で飼料に混入し、104週間にわたって摂食させた。飼料調製は毎週実施した。

用量設定根拠：

検査・観察項目及び結果：

一般状態及び死亡率：全動物について瀕死及び死亡の有無を毎日観察し、少なくとも1日1回、一般状態を観察した。

試験期間中の死亡率を次表に示した。

表. 試験期間中の死亡数

性別	雄				雌			
	0	20	100	500	0	20	100	500
投与量 (ppm)	0	20	100	500	0	20	100	500
動物数	60	60	60	60	60	60	59	60
12ヶ月	0 (0)	1 (1.7)	2 (3.3)	0 (0)	1 (1.7)	0 (0)	1 (1.7)	2 (3.3)
動物数	49	50	50	50	50	50	49	50
18ヶ月	1 (2.0)	2 (4.0)	4 (8.0)	4 (8.0)	6 (12)	5 (10)	4 (8.2)	3 (6.0)
24ヶ月	16 (33)	10 (20)	17 (34)	12 (24)	12 (24)	15 (30)	15 (31)	19 (38)

(Fisherの直接確率計算法、申請者実施)

()内は死亡率

雌雄各投与群共に死亡率の増加は認められなかった。

眼、鼻、口周囲の血性痂皮、尿のにごり、軟便、脱毛、粗毛、呼吸困難、後肢麻痺等の症状が対照群を含む全群にみられたが、いずれも検体投与によるものとは考えられなかった。

体重：投与開始から3ヶ月までは毎週、その後6ヶ月までは隔週、その後は4週間に1回すべての生存動物の体重を測定した。

体重の推移を図に示した。また、投与3、6、12、18及び最終24ヶ月時の平均体重を表に示した。

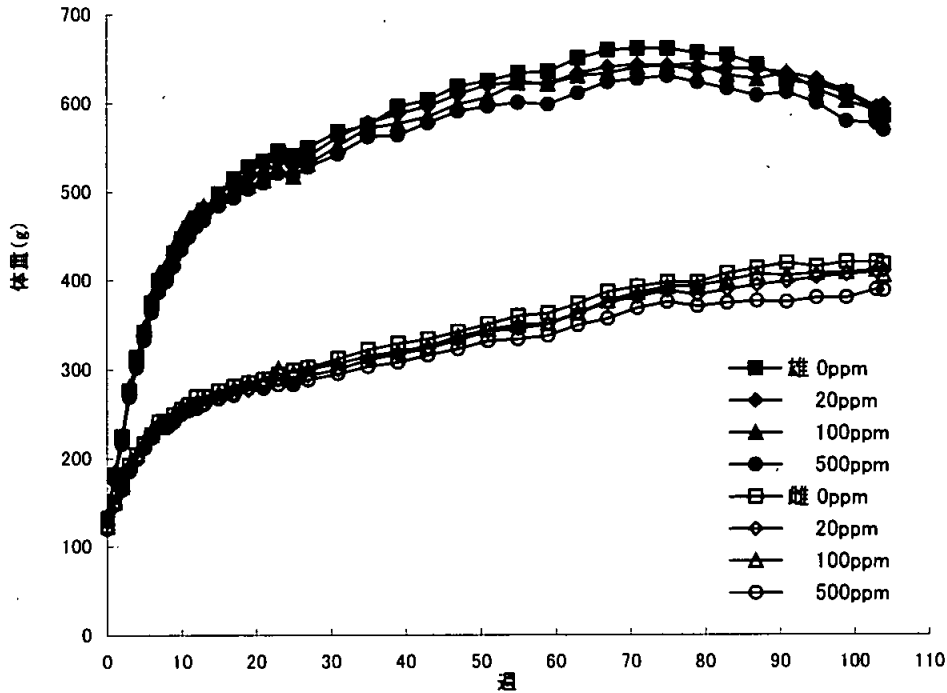


表. 平均体重の推移

性別	雄			雌		
	20	100	500	20	100	500
3ヶ月			(98)			(97)
6ヶ月			(96)			(95)
12ヶ月			(96)			(95)
18ヶ月			↓95			↓93
24ヶ月			(97)			↓93

↓ : P<0.05 (Scheffe 多重比較検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。
()は参考値 (有意差なし)

雌雄共に100ppm以下の投与群では体重に対する検体の影響はみられなかった。

500ppm群において投与12ヶ月までは雌雄共に対照群に比しやや低体重を推移したが統計学的有意な差はみられず、わずかな減少にとどまり毒性影響と

は捉えられなかった。投与18ヶ月で雌雄500ppm群では軽度ながら低体重を示し統計学的有意差を認めた。また、雌では最終の24ヶ月でも有意な低体重が認められた。

摂餌量：投与開始から3ヶ月は毎週、その後6ヶ月までは隔週、その後は4週間に1回すべての生存動物の摂餌量を測定した。

雌雄各投与で摂餌量に対する検体投与の影響はみられなかった。

検体摂取量：投与期間中の平均検体摂取量は次表のとおりであった。

投与量 (ppm)		20	100	500
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	0.94	4.9	25
	雌	1.2	6.2	31

血液学的検査：投与後3、6、12、18及び24ヶ月時に各群雌雄5匹ずつを対象に尾より採血して以下の項目を測定した。

ヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)及び白血球数百分率

表に対照群と比べて統計学的有意差を示した項目を示した。

表. 血液学的検査結果

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		20	100	500	20	100	500
WBC	3ヶ月						↑ 208
	12ヶ月			↑ 203			
RBC	18ヶ月		↑ 118				

↑ ↓ : P<0.05 (Scheffe 多重比較検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。

500ppm 群雄の12ヶ月時、雌の3ヶ月時に白血球数の増加、100ppm 群雄の18ヶ月時にRBCの増加が統計学的有意に認められたが、これらの変化は偶発性のものであり、検体投与の影響とは考えられなかった。

血液生化学的検査：投与後3、6、12、18及び24ヶ月時に、血液学的検査を実施しなかった別の各群雌雄5匹ずつの動物を対象として、眼窩静脈より採血し、血清として以下の項目を測定した。

アラニンアミノトランスフェラーゼ、アルカリフォスファターゼ、総ビリルビン(T. Bil)、尿素窒素(BUN)、グルコース、総蛋白、アルブミン[§]、グロブリン[§]及びA/G比[§] (§ : 24ヶ月時を除く)

表に対照群と比べて統計学的有意差を示した項目を示した。

表. 血液生化学的検査結果

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		20	100	500	20	100	500
T. Bil	6ヶ月					↓56	
BUN	24ヶ月					↓67	

↑↓ : P<0.05 (Scheffe 多重比較検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。

100ppm群雌の6ヶ月時にビリルビンの減少、24ヶ月時にBUNの減少が統計学的有意に認められた。しかし用量に依存した変動ではなく、いずれも偶発性的のもので検体投与の影響とは考えられなかった。

コリンエステラーゼ (ChE) 活性測定 : 投与後 3、6、12、18 及び 24 ヶ月時に、対照群及び 500ppm 群雌雄各 10 匹 (ChE 活性測定用の追加動物) を対象に血球コリンエステラーゼ活性及び血漿コリンエステラーゼ活性を測定した。なお、24 ヶ月時には脳コリンエステラーゼ活性も測定した。

3ヶ月時の検査において500ppm群の雌で赤血球コリンエステラーゼ活性の上昇 (対照 100 に対して 107) が認められたが、この変化は偶発的のもので、検体投与の影響とは考えられなかった。

尿検査 : 投与後 3、6、12、18 及び 24 ヶ月時に各群雌雄 5 匹ずつを対象として、代謝ケージで一晩採尿した尿について以下の項目を測定した。

比重、グルコース、ケトン、蛋白、ビリルビン、pH 及び沈渣

各検査時期において、各投与群共に検体投与による影響と考えられる所見は全く認められなかった。

臓器重量 : 投与後12ヵ月時の中間屠殺動物と試験終了時の全生存動物を対象として、剖検後、以下の臓器重量を測定した。また、対体重比も算出した。

心臓、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、精巣上体、甲状腺、副腎及び下垂体
対照群と比べて統計学的有意差を示した項目を表に示した。

表. 臓器重量

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		20	100	500	20	100	500
12ヶ月中間屠殺							
副腎	対体重比			↓85			
24ヶ月最終屠殺							
腎臓	実重量						↓82

↑↓ : P<0.05 (Scheffe 多重比較検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。

中間屠殺時には雄500ppm群で副腎重量の対体重比の減少、最終屠殺時には雌500ppm群で腎臓の実重量の減少が統計学的有意に認められた。しかし、実重量あるいは対体重比のいずれか一方の変化であり病理組織学的検査で関連した所見がみられなかったことから毒性影響とは捉えられなかった。その他には特記すべき所見は認められなかった。

肉眼的病理検査：投与後 12 ヶ月の中間屠殺動物、試験終了時の全生存動物及び途中死亡動物を対象として、検査を行った。

各投与群とも、検体投与による影響と考えられる異常は認められなかった。

病理組織学的検査：12ヶ月時の中間計画殺及び24ヶ月投与終了の最終計画殺したすべての動物を対象として、剖検後、以下の臓器または組織を固定した。また投与期間中に死亡あるいは切迫殺した動物についても同様に処理した。対照群と500ppm群のすべての動物について検査し、20及び100ppm群の動物については剖検で所見があった肉眼的異常部位等を対象に実施した。

肝臓、腎臓、心臓、肺、脾臓、脳(大脳、小脳、脳幹)、脊髄(胸部)、下垂体、甲状腺(上皮小体含む)、副腎、精巣、精巣上体、卵巣、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸、膵臓、膀胱、前立腺、精嚢、リンパ節(腸間膜)、子宮(頸部含む)、大動脈、関節面(肋骨)、眼球、坐骨神経、乳腺、骨格筋、皮膚、骨髄、組織塊、肉眼的異常部位

[非腫瘍性病変]

12ヶ月中間計画殺動物、投与期間中の死亡または切迫殺動物、24ヶ月最終計画殺動物でみられた主な非腫瘍性病変を表1-1～1-3に示した。

12 ヶ月時中間計画殺動物で所見を散見したが、いずれの変化も検体投与によるものとは考えられなかった。

24ヶ月屠殺動物及び途中死亡・切迫殺動物では、非化膿性心筋炎、心筋変性、肺の慢性肺炎、気管支及び血管周囲のリンパ球浸潤、肝の非化膿性胆管周囲炎等がすべての群で比較的高頻度で認められたが、統計学的に有意な所見の増加は認められず、いずれの変化も自然発生的または加齢による変化であり、検体投与に起因するものとは考えられなかった。

[腫瘍性病変]

12ヶ月中間計画殺動物、投与期間中の死亡または切迫殺動物、24ヶ月最終計画殺動物でみられたすべての腫瘍性病変を表2-1～2-4に示した。

雌雄共に対照群を含む全試験群に下垂体の腺腫が高頻度に認められた。しかし下垂体腫瘍については本系統のラットで加齢に伴い通常観察されるもの

であり、統計学的有意差もなく投与とは関連しないものと考えられた。その他の腫瘍についても頻度の増加はみられなかった。

次表に各群における腫瘍総数、悪性及び良性腫瘍数、担腫瘍動物数を示した。表にみられるように腫瘍の出現頻度の増加は観察されなかった。また担腫瘍動物数についても検体投与によると思われる増加は全く認められなかった。

表. 腫瘍数及び担腫瘍動物数

性 別		雄				雌			
投与群 (ppm)		0	20	100	500	0	20	100	500
検査動物数		50	47	47	50	50	50	49	50
腫瘍数	良性	60	28	34	53	72	61	66	70
	悪性	10	4	8	6	26	13	10	15
腫瘍総数		70	32	42	59	98	74	76	85
担腫瘍動物数	良性	40	23	26	35	42	46	38	43
	悪性	7	4	8	6	20	13	9	13
	両性	4	3	3	4	20	13	6	12
担腫瘍動物数		43	24	31	37	42	46	41	44

(担腫瘍動物数について Fisher 検定、申請者実施)
中間計画殺動物は除く

申請者注：主要な非腫瘍性病変及びすべての腫瘍性病変の出現頻度について Fisher の直接確率計算法により対照群と500ppm群との差の検定を行ったが、いずれの所見共、検体投与によると思われる出現頻度の増加は認められなかった。なお、20及び100ppm群については肉眼的異常所見を有した組織等を検査しており、比較の条件が異なることから対照群との統計解析は行わなかった。

以上、検体のラットに対する 24 ヶ月間飼料混入投与により、500ppm 雌雄でわずかな体重増加抑制がみられた。ゆえに無毒性量は雌雄共に 100ppm (雄 4.9mg/kg/日、雌 6.2mg/kg/日) であった。また、本試験の結果からは催腫瘍性を示唆する所見はみられなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある

表. 1-1 主な非腫瘍性病変（中間計画殺）

検査時期	性別	雄				雌			
	投与量 (ppm)	0	20	100	500	0	20	100	500
中間計画殺	肺：検査数	10	7	2	10	10	4	7	10
	気管支周囲リンパ球増生	10	7	2	10	10	4	7	10
	血管周囲リンパ球増生	7	7	2	9	10	4	7	10
	限局性肺炎	1	0	0	1	5	1	1	1
	腎臓：検査数	10	-	-	10	10	-	-	10
	間質性腎炎	9	-	-	10	5	-	-	6
	再生尿細管	8	-	-	8	1	-	-	5

(Fisher 検定、対照群及び 500ppm 群間について申請者実施)

表. 1-1 主な非腫瘍性病変 (死亡・切迫殺)

検査時期	性別	雄				雌				
	投与量 (ppm)	0	20	100	500	0	20	100	500	
死亡・切迫殺	心臓：検査数	19	-	2	12	13	1	2	22	
	非化膿性心筋炎	13	-	1	9	4	1	1	11	
	心筋変性	13	-	0	7	3	1	1	11	
	肺：検査数	18	8	10	12	13	8	14	21	
	気管支周囲リンパ球浸潤	1	0	1	1	1	0	0	0	
	血管周囲リンパ球浸潤	2	0	0	1	4	0	2	4	
	慢性間質性肺炎	3	0	2	2	1	2	2	6	
	肝臓：検査数	19	3	13	12	13	3	10	22	
	非化膿性胆道周囲炎	8	1	4	4	5	0	4	8	
	胆管増生	5	0	5	2	1	0	5	3	
	腎臓：検査数	19	2	5	11	13	1	8	22	
	間質性腎炎	14	2	2	8	3	1	3	8	
	再生尿細管	12	2	2	5	3	0	2	7	
	尿細管拡張	15	2	2	7	6	0	3	6	
	精巣：検査数	18	-	4	12	/				
	精細管変性	3	-	2	0					
	萎縮	2	-	3	0					
	子宮：検査数	/					13	2	5	21
	嚢胞						0	0	1	0
	嚢胞性内膜過形成						1	1	1	3
乳腺：検査数	19	-	2	12	13	8	8	20		
腺管拡張	8	-	2	4	8	4	4	13		
小葉過形成	0	-	0	0	2	0	2	4		

(Fisher 検定、対照群及び 500ppm 群間について申請者実施)

表. 1-2 主な非腫瘍性病変（最終計画殺）

検査時期	性別	雄				雌				
	投与量 (ppm)	0	20	100	500	0	20	100	500	
最終計画殺	心臓：検査数	31	2	2	34	37	-	-	28	
	非化膿性心筋炎	27	2	2	29	25	-	-	19	
	心筋変性	31	2	2	31	27	-	-	19	
	肺：検査数	31	14	8	38	37	14	7	28	
	気管支周囲リンパ球浸潤	17	2	2	7	1	2	0	4	
	血管周囲リンパ球浸潤	7	4	3	9	3	2	1	4	
	慢性間質性肺炎	11	10	3	13	6	8	4	3	
	肝臓：検査数	31	17	18	38	37	18	15	28	
	非化膿性胆道周囲炎	28	14	12	30	31	14	10	14	
	胆管増生	18	7	7	21	20	12	6	10	
	腎臓：検査数	31	17	13	38	37	7	11	28	
	間質性腎炎	30	17	13	35	27	4	6	15	
	再生尿細管	25	14	13	30	20	3	8	5	
	尿細管拡張	24	14	11	30	18	3	7	10	
	精巣：検査数	31	7	7	38	/				
	精細管変性	5	6	6	10					
	萎縮	2	4	3	8					
	子宮：検査数	/					37	11	6	28
	嚢胞						7	2	0	3
	嚢胞性内膜過形成						13	9	3	6
乳腺：検査数	31	4	3	38	37	21	23	26		
腺管拡張	15	2	3	13	31	12	15	15		
小葉過形成	2	0	2	1	13	8	6	8		

(Fisher検定、対照群及び500ppm群間について申請者実施)

表. 1-3 主な非腫瘍性病変 (全動物)

検査時期	性別	雄				雌				
	投与量 (ppm)	0	20	100	500	0	20	100	500	
全動物	心臓：検査数	50	2	4	46	50	1	2	50	
	非化膿性心筋炎	40	2	3	38	29	1	1	30	
	心筋変性	44	2	2	38	30	1	1	30	
	肺：検査数	49	22	18	50	50	22	21	49	
	気管支周囲リンパ球浸潤	18	2	3	8	2	2	0	4	
	血管周囲リンパ球浸潤	9	4	3	10	7	2	3	8	
	慢性間質性肺炎	14	10	5	15	7	10	6	9	
	肝臓：検査数	50	20	31	50	50	21	25	50	
	非化膿性胆道周囲炎	36	15	16	34	36	14	14	22	
	胆管増生	23	7	12	23	21	12	11	13	
	腎臓：検査数	50	19	18	49	50	8	19	50	
	間質性腎炎	44	19	15	43	30	5	9	23	
	再生尿細管	37	16	15	35	23	3	10	12	
	尿細管拡張	39	16	13	37	24	3	10	16	
	精巣：検査数	49	7	12	50	/				
	精細管変性	8	6	8	10					
	萎縮	4	4	6	8					
	子宮：検査数	/					50	13	11	49
	嚢胞						7	2	1	3
	嚢胞性内膜過形成						14	10	4	9
乳腺：検査数	50	4	5	50	50	29	31	46		
腺管拡張	23	2	5	17	39	16	19	28		
小葉過形成	2	0	2	1	15	8	8	12		

(Fisher検定、対照群及び500ppm群間について申請者実施)

表 2-1 腫瘍性病変（中間計画殺）

検査時期	性別	雄				雌			
	投与量 (ppm)	0	20	100	500	0	20	100	500
中間計画殺	下垂体：検査数	10	-	-	10	10	-	-	10
	腺腫 (B)	0	-	-	0	1	-	-	1
	精巣：検査数	10	-	1	10				
	間質細胞腫 (B)	1	-	0	0				
	子宮：検査数					10	-	1	10
	ポリープ (B)					0	-	1	0
	乳腺：検査数	8	-	-	8	10	1	1	10
	線維腺腫 (B)	0	-	-	0	1	0	0	0
	胸腺：検査数	-	-	-	-	-	-	-	1
	リンパ腫 (M)	-	-	-	-	-	-	-	1

(Fisher検定、対照群及び500ppm群間について申請者実施)

表 2-2 腫瘍性病変（死亡・切迫殺）

検査時期	性別	雄				雌			
	投与量 (ppm)	0	20	100	500	0	20	100	500
死亡・切迫殺	脳：検査数	19	3	5	12	13	12	9	22
	星状膠細胞腫 (B)	1	0	1	0	0	0	0	0
	下垂体：検査数	17	4	7	9	13	12	9	22
	腺腫 (B)	11	4	6	6	7	10	9	15
	腺癌 (M)	1	0	1	0	0	0	0	0
	甲状腺：検査数	17	1	1	12	13	1	-	22
	傍濾胞細胞腺腫 (B)	2	0	0	0	0	0	-	0
	濾胞細胞腺腫 (B)	0	0	0	1	0	0	-	0
	副腎：検査数	13	3	6	12	13	10	7	22
	皮質腺腫 (B)	2	0	1	2	3	0	0	6
	褐色細胞腫 (B)	0	1	0	1	0	0	0	0
	皮質癌 (M)	0	0	0	0	0	1	0	0
	脾臓：検査数	19	6	5	12	13	5	6	21
	線維肉腫 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0
	肝臓：検査数	19	3	13	12	13	3	10	22
	血管腫 (B)	0	0	0	1	0	0	0	0
	肝細胞癌 (M)	2	0	0	1	0	1	0	0
	膵臓：検査数	19	-	1	12	13	-	-	22
	島細胞腺腫 (B)	1	-	0	0	0	-	-	1
	精巣：検査数	18	-	4	12	/			
間質細胞腫 (B)	1	-	0	0					
子宮：検査数	/					13	2	5	21
ポリープ (B)						0	1	2	2
内膜基質肉腫 (M)						0	0	1	1
子宮頸部：検査数	/					-	-	-	1
管状腺癌 (M)						-	-	-	1
乳腺：検査数	19	-	2	12	13	8	8	20	
線維腺腫 (B)	0	-	0	0	2	3	4	6	
腺癌 (M)	0	-	0	0	5	0	1	3	

(Fisher検定、対照群及び500ppm群間について申請者実施)

表 2-2 腫瘍性病変（死亡・切迫殺）-続き-

検査時期	性別	雄				雌			
	投与量 (ppm)	0	20	100	500	0	20	100	500
死亡・切迫殺	皮下織：検査数	3	1	1	-	-	1	-	3
	線維肉腫(M)	2	1	0	-	-	0	-	1
	線維腫(B)	0	1	1	-	-	0	-	0
	神経線維肉腫(M)	1	0	0	-	-	0	-	0
	骨肉腫(M)	0	0	0	-	-	1	-	0
	扁平上皮癌(M)	0	0	0	-	-	0	-	2
	全身性：検査数	1	-	3	1	-	1	-	2
	白血病(M)	1	-	1	0	-	0	-	0
	悪性リンパ腫(M)	0	-	2	1	-	1	-	2

(Fisher検定、対照群及び500ppm群間について申請者実施)

表 2-3 腫瘍性病変 (最終計画殺)

検査時期	性別	雄				雌			
	投与量 (ppm)	0	20	100	500	0	20	100	500
最終計画殺	脳：検査数	31	6	1	38	37	7	8	28
	顆粒細胞腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0
	下垂体：検査数	31	13	10	38	36	25	21	28
	腺腫 (B)	18	12	5	18	28	22	20	19
	腺癌 (M)	0	0	2	1	3	1	0	0
	甲状腺：検査数	31	5	2	38	37	0	1	28
	傍濾胞細胞腺腫 (B)	1	1	0	3	2	-	1	0
	濾胞細胞腺腫 (B)	0	1	1	1	1	-	0	0
	傍濾胞細胞癌 (M)	1	0	0	0	2	-	0	0
	濾胞乳頭癌 (M)	0	0	0	0	1	-	0	0
	副腎：検査数	31	10	7	38	37	23	24	28
	皮質腺腫 (B)	3	3	4	0	8	11	9	7
	褐色細胞腫 (B)	4	1	3	5	2	0	1	0
	皮質癌 (M)	0	0	0	0	0	0	1	0
	肺：検査数	31	14	8	38	37	14	7	28
	腺癌 (M)	0	0	0	1	0	0	0	0
	脾臓：検査数	31	3	3	38	37	2	4	28
	血管内皮腫 (B)	0	0	1	0	0	0	0	0
	未分化肉腫 (M)	0	0	0	1	0	0	0	0
	肝臓：検査数	31	17	18	38	37	18	15	28
	腫瘍結節 (B)	1	1	1	1	6	5	1	3
	肝細胞癌 (M)	1	2	1	0	1	2	0	1
	腎臓：検査数	31	17	13	38	37	7	11	28
	管状腺癌 (M)	0	0	0	0	0	0	1	0
	移行上皮癌 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1
	胃：検査数	30	4	2	38	37	2	5	28
	神経線維肉腫 (M)	0	0	0	0	1	0	0	0
	膵臓：検査数	31	1	1	38	37	3	2	28
脂肪腫 (B)	0	0	0	0	0	1	0	0	
島細胞腺腫 (B)	4	0	0	5	0	0	2	0	
島細胞癌 (M)	0	0	0	0	0	1	0	0	

(Fisher検定、対照群及び500ppm群間について申請者実施)

表 2-3 腫瘍性病変（最終計画殺）-続き-

検査時期	性別	雄				雌							
	投与量 (ppm)	0	20	100	500	0	20	100	500				
最終計画殺	腸間膜リンパ節：検査数	31	1	4	38	37	2	5	28				
	血管内皮腫(B)	0	0	2	0	0	0	0	0				
	リンパ管腫(B)	1	0	0	0	0	0	0	0				
	精巣：検査数	31	7	8	38								
	間質細胞腫(B)	7	2	3	6								
	精巣上体脂肪：検査数	1	0	1	0								
	脂肪腫(B)	1	-	1	-								
	子宮：検査数									37	11	6	28
	ポリープ(B)									4	0	1	3
	血管腫(B)									0	1	0	0
	内膜間質肉腫(M)									1	0	1	2
	平滑筋肉腫(M)					1	0	0	0				
	乳腺：検査数	31	4	3	38	37	21	23	26				
	線維腺腫(B)	0	0	0	1	8	7	15	7				
	腺癌(M)	0	0	0	0	10	5	5	1				
	盲腸：検査数	-	-	1	-	-	-	-	-				
	平滑筋肉腫(M)	-	-	1	-	-	-	-	-				
	皮下織：検査数	-	1	1		1	-	-	1				
	線維肉腫(M)	-	0	0	1	1	-	-	0				
	線維腫(B)	-	0	0	1	0	-	-	1				
脂肪腫(B)	-	0	0	1	0	-	-	0					
神経線維腫(B)	-	0	1	0	0	-	-	0					
神経線維肉腫(M)	-	1	0	0	0	-	-	0					
後肢：検査数	1	-	-	-	-	-	-	-					
角化棘細胞腫(B)	1	-	-	-	-	-	-	-					
ジンバル腺：検査数	-	-	1	-	-	-	-	-					
扁平上皮癌(M)	-	-	1	-	-	-	-	-					

(Fisher 検定、対照群及び 500ppm 群間について申請者実施)

表 2-3 腫瘍性病変（最終計画殺）-続き-

検査時期	性別	雄				雌			
	投与量 (ppm)	0	20	100	500	0	20	100	500
最終計画殺	組織塊/他：検査数	-	1	4	-	-	-	1	-
	扁平上皮乳頭腫(B)	-	0	1	-	-	-	0	-
	脂肪腫(B)	-	0	1	-	-	-	0	-
	神経線維腫(B)	-	0	1	-	-	-	1	-
	線維肉腫(M)	-	0	1	-	-	-	0	-
	乳頭腫(B)	-	1	-	-	-	-	-	-
	全身性：検査数	-	-	-	-	-	1	-	-
悪性線維性組織球腫(M)	-	-	-	-	-	1	-	-	

(Fisher検定、対照群及び500ppm群間について申請者実施)

表 2-4 腫瘍性病変 (全動物)

検査時期	性別	雄				雌			
	投与量 (ppm)	0	20	100	500	0	20	100	500
全動物	脳：検査数	50	9	6	50	50	17	15	50
	顆粒細胞腫(B)	1	0	0	0	0	0	0	0
	星状膠細胞腫(B)	1	0	1	0	0	0	0	0
	下垂体：検査数	48	17	17	47	49	37	30	50
	腺腫(B)	29	16	11	24	35	32	29	34
	腺癌(M)	1	0	3	1	3	1	0	0
	甲状腺：検査数	48	6	3	50	50	1	1	50
	傍濾胞細胞腺腫(B)	3	1	0	3	2	0	1	0
	濾胞細胞腺腫(B)	0	1	1	2	1	0	0	0
	傍濾胞細胞癌(M)	1	0	0	0	2	0	0	0
	濾胞乳頭癌(M)	0	0	0	0	1	0	0	0
	副腎：検査数	50	13	13	50	50	33	31	50
	皮質腺腫(B)	5	3	5	2	11	11	9	13
	褐色細胞腫(B)	4	2	3	6	2	0	1	0
	皮質癌(M)	0	0	0	0	0	1	1	0
	肺：検査数	50	22	18	50	50	22	19	49
	腺癌(M)	0	0	0	1	0	0	0	0
	脾臓：検査数	50	9	8	50	50	7	8	49
	血管内皮腫(B)	0	0	1	0	0	0	0	0
	未分化肉腫(M)	0	0	0	1	0	0	0	0
肝臓：検査数	50	20	31	50	50	21	25	50	
腫瘍結節(B)	1	1	1	1	6	5	1	3	
血管腫(B)	0	0	0	1	0	0	0	0	
肝細胞癌(M)	3	2	1	1	1	3	0	1	
腎臓：検査数	50	19	18	49	50	8	19	50	
管状腺癌(M)	0	0	0	0	0	0	1	0	
移行上皮癌(M)	0	0	0	0	0	0	0	1	
胃：検査数	48	6	19	50	49	6	8	50	
神経線維肉腫(M)	0	0	0	0	1	0	0	0	
膵臓：検査数	50	1	2	50	50	3	2	50	
脂肪腫(B)	0	0	0	0	0	1	0	0	
島細胞腺腫(B)	5	0	0	5	0	0	2	1	

(Fisher検定、対照群及び500ppm群間について申請者実施)

表 2-4 腫瘍性病変 (全動物) -続き-

検査時期	性別	雄				雌								
	投与量 (ppm)	0	20	100	500	0	20	100	500					
全動物	脾臓：検査数	50	1	2	50	50	3	2	50					
	島細胞癌 (M)	0	0	0	0	0	1	0	0					
	腸間膜リンパ節：検査数	50	2	6	50	50	2	5	50					
	血管内皮腫 (B)	0	0	2	0	0	0	0	0					
	リンパ管腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0					
	精巣：検査数	49	7	12	50									
	間質細胞腫 (B)	8	2	3	6									
	精巣上体脂肪：検査数	1	-	1	-									
	脂肪腫 (B)	1	-	1	-									
	子宮：検査数						50	13	11	49				
	ポリープ (B)						4	0	3	5				
	血管腫 (B)						0	1	0	0				
	内膜間質肉腫 (M)						1	0	2	3				
	平滑筋肉腫 (M)						1	0	0	0				
	乳腺：検査数	50	4	5	50	50	29	31	46					
	線維腺腫 (B)	0	0	0	1	10	10	19	13					
	腺癌 (M)	0	0	0	0	15	5	6	4					
	盲腸：検査数	-	-	1	-	-	-	-	-					
	平滑筋肉腫 (M)	-	-	1	-	-	-	-	-					
	皮下織：検査数						1	1	-					
	線維肉腫 (M)						2	1	0	1	1	0	-	1
	線維腫 (B)						0	1	1	1	0	0	-	1
	脂肪腫 (B)						0	0	0	1	0	0	-	0
神経線維腫 (B)	0						0	1	0	0	0	-	0	
神経線維肉腫 (M)	1						1	0	0	0	0	-	0	
骨肉腫 (M)	0						0	0	0	0	1	-	0	
扁平上皮癌 (M)	0						0	0	0	0	0	-	2	
後肢：検査数	1	-	-	-	-	-	-	-						
角化性棘細胞腫 (B)	1	-	-	-	-	-	-	-						

(Fisher 検定、対照群及び 500ppm 群間について申請者実施)

表 2-4 腫瘍性病変（全動物）-続き-

検査時期	性別	雄				雌			
	投与量 (ppm)	0	20	100	500	0	20	100	500
全動物	ジンバル腺：検査数	-	-	-	1	-	-	-	-
	扁平上皮癌 (M)	-	-	-	1	-	-	-	-
	組織塊/他：検査数	-	1	4	-	-	-	1	-
	扁平上皮乳頭腫 (B)	-	0	1	-	-	-	0	-
	脂肪腫 (B)	-	0	1	-	-	-	0	-
	神経線維腫 (B)	-	0	1	-	-	-	1	-
	線維肉腫 (M)	-	0	1	-	-	-	0	-
	乳頭腫 (B)	-	1	0	-	-	-	0	-
	全身性：検査数	1	-	3	1	-	2	-	2
	白血病 (M)	1	-	1	0	-	0	-	0
	悪性リンパ腫 (M)	0	-	2	1	-	1	-	2
	悪性線維性組織球腫 (M)	0	-	0	0	-	1	-	0

(Fisher検定、対照群及び500ppm群間について申請者実施)

ラットを用いた混餌投与 52 週間反復経口毒性試験

毒性資料 No. 原体-27-1

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1987 年

検体の純度：

供試動物：Sprague-Dawley 系ラット (Chales River (UK))、6 週齢、1 群雌雄各 20 匹

投与期間：52 週間 (1985 年 11 月～1986 年 11 月)

投与方法：検体を 0、60、250 及び 1000ppm の濃度で飼料に混入し、52 週にわたって摂食させた。飼料調製は隔週に行った。

用量設定の根拠：

観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡率：一般状態及び生死を毎日観察した。また週 1 回の割合で触診を行った。

雌雄各投与群で検体投与に起因したと思われる外徴や行動の変化、死亡は観察されなかった。脱毛等の加齢に伴い通常みられる所見が各群で散見されたがいずれも投与に起因したものではなかった。

試験期間中に雄 5 例 (60ppm 群 1 例、250 及び 1000ppm 群各 2 例)、雌 1 例 (1000ppm 群 1 例) が死亡した。しかし検体投与に関連したものではないと判断した。

申請者注：雄の 250 及び 1000ppm 群の死亡例に一般状態や、剖検、病理検査で著変は認めなかった。雄 60ppm、雌 1000ppm の各 1 例はリンパ腫又は乳がんを伴った事によるものと考えられた。しかし、両腫瘍が用量に関連して増加する傾向はなく、同用量を 2 年間投与した発がん性試験 (毒性資料 No. 原体 27-2, 28-2) でも増加は認めない。以上のことからいずれの死亡例も投与に起因しない偶発性のものと考えた。

体重：すべての動物を対象に投与 13 週までは毎週、その後は 4 週毎に測定した。投与 13、26 及び 52 週時の体重、投与期間中の体重増加量を表に、また、体重の推移を図に示した。

雄の投与群、雌の 250ppm 以下の投与群では投与の影響は認めなかった。

雄の250ppm群では統計学的有意な低体重が投与期間を通じて観察されが、用量に依存した変動ではないこと、また、この群では投与開始時においてすでに統計学的有意に体重が低かったことから、検体投与の影響によるものではないと判断した。

雌の1000ppm群では統計学的有意ではなかったものの、投与終了時に低体重傾向がみられ、投与期間中の体重増加量も対照群に比べて明らかに減少(18%減)しており投与の影響と考えられた。

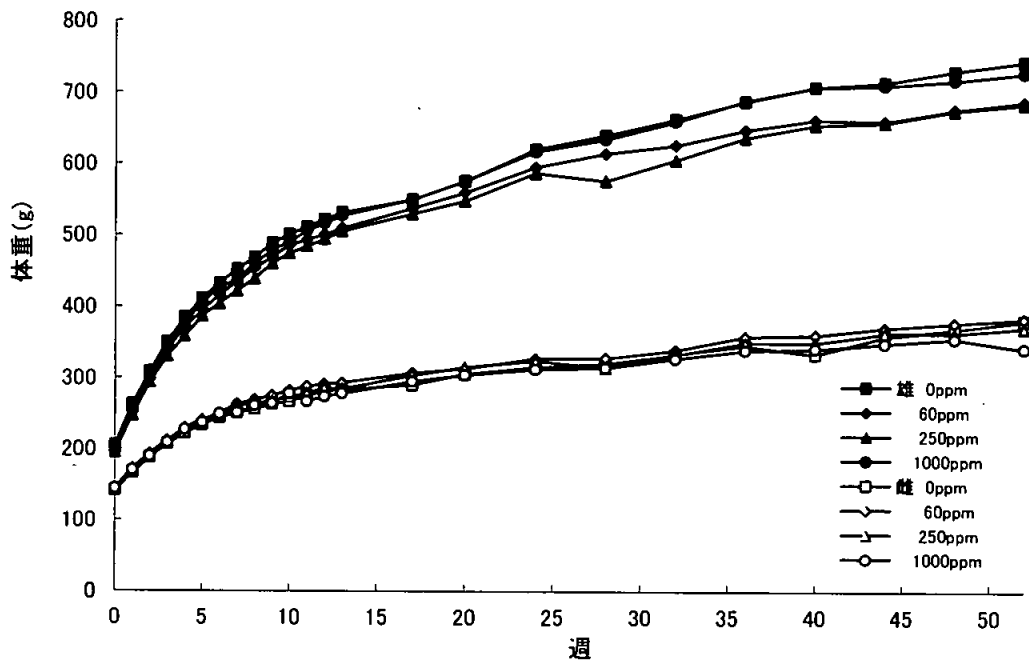
表. 体重及び体重増加量

性別	雄			雌		
投与量 (ppm)	60	250	1000	60	250	1000
平均体重						
開始時	↓95	↓95				
7週		↓93				
13週		(95)				
28週		↓90				
52週		(92)				(90)
体重増加量						
0 - 52週	91	91	98	100	95	82

↑↓ : P<0.01 (平均体重 ; ANOVA + Student t検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したものの、

()は参考値 (有意差なし)



摂餌量：全動物を対象に投与13週までは毎週、その後は4週毎に測定した。

雌雄共に投与期間を通じて検体投与による影響は認められなかった。

検体摂取量：投与期間中の平均検体摂取量は次表のとおりであった。

投与量 (ppm)		60	250	1000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	3.5	14.6	58.7
	雌	4.6	18.7	78.1

血液学的検査：投与13、25及び51週時に雌雄各群10匹を対象に実施した。採血は眼窩静脈叢より行い、以下の項目について測定した。

赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)、ヘモグロビン濃度(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、血小板数、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度、白血球分画、血液凝固時間(ヘパトクイックテスト；25及び52週時；尾より採血)

以下に対照群と比べて統計学的有意差を示した項目を示した。

表. 血液学的検査結果

性別	投与量 (ppm)	雄			雌		
		60	250	1000	60	250	1000
RBC	13週			↓91	↑104		↓93
	25週			↓93			(94)
	51週			↓91			↓93
Hb	13週			↓92			↓95
	25週			↓94	↓94		↓95
	51週		↓95	↓94			↓92
Ht	13週		↓95	↓92			↓95
	25週		↓94	↓93	↓95		↓93
	51週		↓94	↓91		↓96	↓92
MCH	13週				↓97		
	25週				↓97		
	51週				↓97		
WBC	25週			↑122			↑140
	51週	↓81					
Lym [#]	25週			↑127			↑146

↑ ↓ : P<0.05、▲ ▼ : P<0.01 (ANOVA + Student t検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。

リンパ球数

()は参考値 (有意差なし)

各検査時においてRBC、Hb及びHtの明らかな減少が雌雄共1000ppm群で認められた。また250ppm群でも雄で各検査時にHtの有意な減少がみられ、さらに51週時には雄のHb、雌のHtで統計学的有意な減少がみられた。また投与25週時に雌雄共1000ppm群でWBCとリンパ球数(Lym)の統計学的有意な増加が観察された。

60ppm群でもいくつかの項目に統計学的有意な変動を認めた。

申請者注：報告書では60ppm雌にみられた赤血球パラメーターの減少について投与の影響とみているが、60ppmでの変動は投与量に依存した減少ではないことから、検体投与に起因したものではないと考えた。

血液生化学的検査：投与25及び51週時に雌雄各群10匹を対象に実施した。採血は眼窩静脈叢より行い、以下の項目について測定した。

尿素窒素、グルコース(Glu)、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、アルカリフォスファターゼ、コリンエステラーゼ、総蛋白、アルブミン(Alb)、ナトリウム、カリウム、クロール(Cl)、無機リン、カルシウム

以下に対照群と比べて統計学的有意差を示した項目を示した。

表. 血液生化学的検査結果

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		60	250	1000	60	250	1000
Glu	25週				↑114		
Alb	51週						↓92
Cl	51週				↑106		

↑↓：P<0.05、↑↓：P<0.01 (ANOVA + Student t検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。

投与51週時の雌1000ppm群で統計学的有意なAlbの減少が観察された。

雌60ppm群ではGlu及びClの統計学的有意な増加がみられたが用量に依存しておらず、検体投与に関連しない偶発的な変動と考えられた。

その他の項目では特記すべき変動は認められなかった。

申請者注：雌1000ppmで51週でのみAlbの有意な減少がみられたが、対照群に比してもわずかな差で、総蛋白には有意な変動がないことから毒性学的に意義のある変化とは考えられなかった。

尿検査：投与25及び51週時に雌雄各群10匹を対象として、4時間尿について以下の項目について測定した。

尿量、比重、pH [以上、定量分析]、グルコース、ケトン体、蛋白、ビリ

ルビン、ウロビリノーゲン [以上、半定量分析]、沈渣 [鏡検]

25 週時雌の 1000ppm 群で統計学的有意な尿量の増加が認められた。しかし、個体変動が大きかったことや 52 週時では明らかな変動がみられなかったことから、検体投与による毒性影響とは捉えられなかった。

その他には各時期また各投与群共、検体投与による影響と考えられる所見は観察されなかった。

臓器重量：すべての生存動物を対象に、屠殺・剖検後、以下の臓器の重量を測定した。また最終体重からその補正重量を求めた。

肝臓、腎臓、心臓、肺、脾臓、脳、胸腺、副腎、精巣、卵巣

以下に対照群と比べて統計学的有意差を示した項目を表記した。

表. 臓器重量

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		60	250	1000	60	250	1000
最終体重		(93)	(93)				(95)
脾臓	実重量			▲141			
	補正重量 [#]			▲138			
腎臓	実重量						↓91
副腎	実重量		↓92				

↑ ↓ : P<0.05、▲ ▼ : P<0.01 (ANOVA + Student t検定)

: 最終体重を共変量として補正

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。

()は参考値 (有意差なし)

雄の1000ppm群で脾臓の実重量及び補正重量が共に統計学的有意に増加した。腎臓及び副腎で統計学的有意な変動がみられたが、いずれも用量との関連がないか低体重に起因した二次的なものであり組織学的変化も伴わないことから毒性影響とは捉えられなかった。

肉眼的病理検査：試験途中で死亡した動物については死亡発見時速やかに、また生存動物については投与終了時に検査した。

検体投与に関連した肉眼的異常所見は雌雄共に観察されなかった。

病理組織学的検査：試験途中で死亡した動物については死亡発見時速やかに、また生存動物については投与終了時に剖検を行った後、以下の組織を固定した。

肝臓、腎臓、心臓、肺、脾臓、脳、下垂体、甲状腺、上皮小体、胸腺、副腎、精巣、卵巣(卵管含む)、気管、食道、胃、十二指腸[#]、空腸[#]、回腸、盲腸[#]、結腸、直腸[#]、膵臓、膀胱、腸間膜リンパ節、顎下リンパ節[#]、精巣

上体、前立腺、子宮、膣[#]、精囊[#]、皮膚、脊髄(頸部、胸部、腰部)、坐骨神経、骨(胸骨、肋骨[#])、骨格筋[#]、大動脈弓[#]、眼球[#]、顎下腺、乳腺、肉眼的異常部位

検査は対照群及び1000ppm群の全動物ならびに全死亡動物を対象として、上記の組織すべてについてヘマトキシリン・エオジン(H & E)染色標本を作製し鏡検した(但し、#を付した組織は剖検時に異常のあったもののみを対象)。

また、すべての動物を対象として、肝臓、腎臓及び脾臓についてPerl's Prussian Blue染色(PB)を行い、ヘモジデリン沈着の程度を調べた。

なお、2000年のEU評価において本試験で保存されている腎臓、精巣、精巣上体及び子宮について低及び中用量群を含む再検査が求められ、その結果が報告(試験施設において再検査実施)された。従って、本抄録にはこの結果も併せ以下に掲載した。

統計学的有意に頻度の増加がみられた組織所見を表A-1～A-2に、また、認められたすべての腫瘍性病変を表B-1～B-2に示した。

[非腫瘍性病変]

雄の全投与群、雌の250ppm以上の投与群で肝臓のヘモジデリン陽性の頻度が統計学的有意に増加した。また雄の250ppm以上の投与群、雌の1000ppm群で腎臓でのヘモジデリン陽性の頻度が同様に増加した。脾臓でもヘモジデリン陽性が高頻度にみられたが、雌雄共に対照群と各投与群との間に有意な差はみられなかった。

肺と卵巣でみられた所見については他に関連する所見がみられなかったことから、検体投与による毒性影響とは捉えられなかった。

申請者注：雄60ppmでも肝臓のヘモジデリン沈着陽性の頻度が増加したが、この投与量では赤血球パラメーターの変動がみられず、また関連した所見が他に全く認められなかったことから毒性影響とはみなさなかった。

[腫瘍性病変]

種々の組織で腫瘍性病変が散見されたが、検体投与に関連した所見は認められなかった。

以上、検体のラットに対する52週間混餌投与において、250ppm雌雄でHt、雄でHb減少、1000ppm雌雄でRBC、Hb及びHt 減少、WBC、Lymの増加がみられた。病理組織学的検査で肝臓のヘモジデリン沈着陽性の頻度の増加が雌雄250ppmから、また腎臓におけるヘモジデリン沈着が雄では250ppmから、雌の1000ppmで観察された。また1000ppmでは雄で脾臓重量の増加、雌で体重増加抑制が認められた。これらの結果から、本試験における無毒性量は雌雄共に60ppm(雄：3.5mg/kg/日、雌：4.6mg/kg/日)と判断した。

表 A-1. 主な非腫瘍性病理学的検査所見

性別	雄				雌			
	0	60	250	1000	0	60	250	1000
投与量 (ppm)	0	60	250	1000	0	60	250	1000
肝臓：検査数	20	-	-	20	20	-	-	20
色素沈着 合計	9	-	-	▲17	6	-	-	▲20
(Kupffer 細胞) 軽微	3	-	-	0	5	-	-	1
軽度	5	-	-	2	1	-	-	8
中等度	1	-	-	12	0	-	-	11
重度	0	-	-	3	0	-	-	0
(PB 染色)：検査数	20	20	20	20	20	20	20	20
ヘモジデリン陽性 合計	14	▲19	▲18	▲20	19	18	▲20	▲20
軽微	7	5	3	0	14	12	4	0
軽度	6	7	9	2	5	5	14	10
中等度	1	7	6	18	0	1	2	9
重度	0	0	0	0	0	0	0	1
腎臓：検査数	20	-	-	20	20	-	-	20
鉍質沈着(乳頭部)	0	-	-	1	10	-	-	↑17
色素沈着 合計	7	-	-	▲17	6	-	-	10
(近位尿細管) 軽微	2	-	-	2	3	-	-	5
軽度	5	-	-	5	2	-	-	4
中等度	0	-	-	7	1	-	-	1
重度	0	-	-	3	0	-	-	0
(PB 染色)：検査数	20	20	20	20	20	20	20	20
ヘモジデリン陽性 合計	15	16	↑18	▲20	20	20	20	▲20
軽微	11	12	7	0	5	5	3	1
軽度	2	3	6	2	11	14	11	4
中等度	2	1	5	8	4	1	6	11
重度	0	0	0	10	0	0	0	4
脾臓：(PB 染色) 検査数	20	20	20	20	20	20	20	20
ヘモジデリン陽性 合計	20	20	20	20	20	20	20	20
軽微	0	2	0	0	0	0	0	0
軽度	4	1	5	3	4	9	7	3
中等度	9	15	13	16	13	10	12	12
重度	7	2	2	1	3	1	1	5
肺：検査数	20	-	-	20	20	-	-	20
巣状肺炎	2	-	-	▲11	2	-	-	6
卵巣：検査数					20	-	-	20
卵胞性嚢腫					1	-	-	↑7

↑：P<0.05、▲：P<0.01 (Fisher 検定、但し程度別所見は累積カイ 2 乗検定を申請者実施)

PB：Prussian Blue 染色

表 A-2. 再検査による病理学的検査所見

性別	雄				雌			
	0	60	250	1000	0	60	250	1000
投与量 (ppm)	0	60	250	1000	0	60	250	1000
腎臓 (再検査): 検査数	20	20	20	20	20	20	20	20
色素沈着 (皮質/尿細管) 合計	1	0	5	▲15	1	0	2	2
軽微	1	0	3	4	0	0	1	2
軽度	0	0	2	8	1	0	1	0
中等度	0	0	0	3	0	0	0	0
鉍質沈着 (尿路上皮) 合計	0	0	3	1	6	8	8	11
軽微	0	0	2	0	6	7	6	10
軽度	0	0	1	1	0	0	2	1
中等度	0	0	0	0	0	1	0	0

↑ : P<0.05、▲ : P<0.01 (Fisher 検定、但し程度別所見は累積カイ 2 乗検定を申請者実施)

表 B-1. 全ての腫瘍性病変

性別	雄				雌			
	0	60	250	1000	0	60	250	1000
投与量 (ppm)	0	60	250	1000	0	60	250	1000
脳：検査数	20	-	-	20	20	-	-	20
悪性神経膠腫 (M)	0	-	-	0	0	-	-	1
下垂体：検査数	20	-	-	20	20	-	-	20
腺腫 (B)	7	-	-	3	3	-	-	1
甲状腺：検査数	20	-	-	20	20	-	-	20
C細胞腺腫 (B)	0	-	-	0	0	-	-	1
副腎：検査数	20	-	-	20	20	-	-	20
褐色細胞腫 (B)	0	-	-	0	1	-	-	0
乳腺：検査数	20	-	-	20	20	-	-	20
腺癌 (M)	0	-	-	0	0	-	-	1
皮下織：検査数	20	-	-	20	20	-	-	20
上皮腫 (B)	0	-	-	1	0	-	-	0
全身性：検査数	20	1	-	20	20	-	-	20
悪性リンパ腫 (M)	0	1	-	1	0	-	-	1

(Fisher直接確率計算法)

(B)：良性腫瘍 (M)：悪性腫瘍

表 B-2. 再検査による腫瘍性病変

性別	雄				雌			
	0	60	250	1000	0	60	250	1000
精巣(再検査)：検査数	20	20	19	20	/			
間質細胞腫 (B)	0	1	0	0				
子宮(再検査)：検査数	/				20	19	20	20
ポリープ (B)					0	1	0	1

(Fisher直接確率計算法)

(B)：良性腫瘍 (M)：悪性腫瘍