

VII. 使用時安全上の注意、解毒法等

1. 使用時安全上の注意事項

ディアナ WDG

- (1) 本剤は眼に対して弱い刺激性があるので、薬剤が眼に入らないよう注意すること。
眼に入った場合は直ちに水洗し、眼科医の手当を受けること。
- (2) 本剤は皮膚に対して弱い刺激性があるので、皮膚に付着しないように注意すること。
付着した場合は直ちに石鹼でよく洗い流すこと。
- (3) かぶれやすい体質の人は取扱いに十分注意すること。

ディアナ SC

- (1) 本剤は眼に対して弱い刺激性があるので、薬剤が眼に入らないよう注意すること。
眼に入った場合は直ちに水洗し、眼科医の手当を受けること。
- (2) 本剤は皮膚に対して弱い刺激性があるので、皮膚に付着しないように注意すること。
付着した場合は直ちに石鹼でよく洗い流すこと。
- (3) かぶれやすい体質の人は取扱いに十分注意すること。

ディアナ箱粒剤

- (1) 本剤は眼に対して弱い刺激性があるので、薬剤が眼に入らないよう注意すること。
眼に入った場合は直ちに水洗し、眼科医の手当を受けること。
- (2) 本剤は皮膚に対して弱い刺激性があるので、皮膚に付着しないように注意すること。
付着した場合は直ちに石鹼でよく洗い流すこと。
- (3) かぶれやすい体質の人は取扱いに十分注意すること。

2. 解毒法及び治療法

通常の使用方法ではその該当がない。

3. 製造時、使用時等における事故例

現在までのところ、特に報告例はない。

VIII. 毒性

<毒性試験一覧表>

1. 原体を用いた試験成績

資料 No.	試験の種類・期間	供試動物	1群当り 供試数	投与方法	投与量 (mg/kg)	LD ₅₀ 値または 無毒性量(NOEL) (mg/kg)	試験機関 (報告年)	記載 頁
1-1 (GLP)	急性毒性 14日間観察	ラット	♀ 3	経口	♀ : 5000	♀ : >5000	Dow (2005年)	92
1-2 (GLP)	急性毒性 14日間観察	ラット	♂♀各 5	経皮	♀ : 5000	♂♀ : >5000	Dow (2005年)	93
1-3 (GLP)	急性毒性 14日間観察	ラット	♂♀各 5	吸入	♂♀ : 5 (mg/L) 4時間鼻部曝露	♂♀ : LC ₅₀ >5.50 (mg/L)	Dow (2005年)	94
2-1 (GLP)	皮膚刺激性 72時間観察	ウサギ	♂ : 1 ♀ : 2	皮膚貼付	0.5 g/皮膚 (6 cm ²)	刺激性なし	Dow (2005年)	96
2-2 (GLP)	眼刺激性 72時間観察	ウサギ	♂ : 2 ♀ : 1	眼への 適用	0.05 g (0.1 mL 容量) / 眼	刺激性あり 24時間以内に回復	Dow (2005年)	97
3 (GLP)	皮膚感受性 6日間観察	マウス	♀ : 6	LLNA 法	2.5, 10, 40% を1回/日で3日間適 用	弱い皮膚感受性あり	Dow (2005年)	99
4 (GLP)	急性神経毒性	ラット	♂ : 10 ♀ : 10	経口	♂♀ : 0, 200, 630, 2000	♂♀ : >2000	Dow (2005年)	101
-	急性遅発性 神経毒性	急性毒性試験等の試験成績から、コリンエステラーゼ阻害性を有さないと考えられるため、試験省略。						
5-1 (GLP)	亜急性毒性 90日間	ラット	♂♀各 10 主群および回復群	飼料混入	♂♀ : 0, 120, 500, 1000, 2000 ppm, ♀ : 4000 ppm	♂ : 500 ppm, ♀ : 120 ppm ♂ 32.4 ♀ 9.5	Dow (2005年)	105
5-2 (GLP)	亜急性毒性 90日間	イヌ	♂♀各 4	飼料混入	♂♀ : 0, 150, 300, 900 ppm	♂♀ : 150 ppm ♂ 5.73 ♀ 4.97	Dow (2005年)	131
6 (GLP)	反復経口投与 神経毒性 12ヶ月	ラット	♂♀各 10	飼料混入	♂♀ : 0, 50, 250, 500, 750 ppm	♂♀ : 750 ppm ♂ 36.7 ♀ 44.3	Dow (2007年)	141
-	28日間反復 投与遅発性 神経毒性	急性毒性試験等の試験成績から、コリンエステラーゼ阻害性を有さないと考えられ、急性遅発性神経毒性試験を提出する必要がないため、試験省略。						
7-1 (GLP)	慢性毒性・ 発がん性 2年間	ラット	慢性毒性 ♂♀各 10 発がん性 ♂♀各 50	飼料混入	♂♀ : 0, 50, 250, 500, 750 ppm	♂♀ : 250 ppm ♂ 10.8 ♀ 13.2 発がん性なし	Dow (2007年)	146
7-2 (GLP)	慢性毒性 1年間	イヌ	♂♀各 4	飼料混入	♂♀ : 0, 50, 100, 200 ppm	♂♀ : 100 ppm ♂ 2.96 ♀ 2.49	Dow (2006年)	171
7-3 (GLP)	発がん性 18カ月間	マウス	♂♀各 50	飼料混入	♂♀ : 0, 25, 80, 150, 300 ppm	♂♀ : 150 ppm ♂ 18.8 ♀ 23.9 発がん性なし	Dow (2007年)	178

(つづき)

資料 No.	試験の種類・期間	供試動物	1群当り 供試数	投与方法	投与量 (mg/kg)	LD ₅₀ 値または 無毒性量(NOAEL) (mg/kg)	試験機関 (報告年)	記載 頁
8-1 (GLP)	繁殖性	ラット	♂♀各 27	飼料混入	♂♀ : 0, 3, 10, 75	親動物 : ♂10, ♀10 児動物 : ♂10, ♀10 繁殖性 : ♂10, ♀10	Dow (2006年)	195
8-2 (GLP)	催奇形性	ラット	♀ : 26	経口	♀ : 0, 30, 100, 300	母動物 : 100 胎児 : 300 催奇形性なし	Dow (2005年)	210
8-3 (GLP)	催奇形性	ウサギ	♀ : 26	経口	♀ : 0, 2.5, 10, 60	母動物 : 10 胎児 : 60 催奇形性なし	Dow (2005年)	214
9-1 (GLP)	変異原性 (復帰突然変異)	ネズミチフス菌 : (TA98, TA100, TA1535, TA1537) 大腸菌 : (WP2uvrA)		<i>in vitro</i> (7レインキュ ベーション法)	ネズミチフス菌 : (-S9) 1.00~1000 µg/ プレート (+S9) 3.33~5000 µg/ プレート 大腸菌 : (-S9 および+S9) 33.3~5000 µg/プレート 用量 : 6 または 7 段階、 3 連制	陰性	Covance (2005年)	220
9-1-1 (GLP)	変異原性 (遺伝子突然変異)	チャイニーズハムスタ ー卵巣由来細胞 (CHO)		<i>in vitro</i> (4時間処 理)	1回目試験 : (-S9) 10 ~ 80 µg/mL、 (+S9) 10 ~ 320 µg/mL 2回目試験 : (-S9) 10 ~ 80 µg/mL、 (+S9) 20 ~ 240 µg/mL	陰性	Dow (2005年)	223
9-2 (GLP)	変異原性 (染色体異常)	ラットリンパ球		<i>in vitro</i> (4時間処理 および24 時間連続処 理)	4時間処理 : (-S9) 10, 30, 40 µg/mL (+S9) 30, 50, 80 µg/mL 24時間連続処理 : (-S9) 10, 20, 30 µg/mL	陰性	Dow (2005年)	226
9-3 (GLP)	変異原性 (小核試験)	マウス	♂ : 6	経口 2日間連続	♂ : 0, 500, 1000, 2000	陰性	Dow (2005年)	228
10 (GLP)	生体の機能に及 ぼす影響	ラットの中樞神経系に対する作用 ①一般状態及び行動(♂♀各 3, 経口, 0, 200, 600, 2000):影響なし ②自発運動量(♂♀各 5, 経口, 0, 200, 600, 2000): 2000 mg/kgにて軽度自発運動 量減少 ③誘発痙攣に対する協力作用(♂10, 経口, 0, 200, 600, 2000):影響なし ④誘発痙攣に対する拮抗作用(♂10, 経口, 0, 200, 600, 2000):影響なし ラットの腎機能に対する作用 ①尿量・尿中電解質に対する作用(♂10, 経口, 0, 50, 100, 150, 200, 600, 2000) : 200 mg/kg以上で尿量、尿中電解質排泄量の低下、2000 mg/kgにて尿浸透 圧の上昇 ラットの呼吸器に対する作用 ①呼吸数、1回換気量及び分時換気量(♂6, 経口, 0, 200, 600, 2000):影響なし イヌの循環器系に対する作用 ①圧、心拍数、心電図(♂4, 経口, 0, 200, 600, 2000):影響なし					三菱化学安 全科学研究 所(熊本) (2007年)	230

2. 代謝物を用いた毒性試験成績

資料 No.	試験の種類・期間	供試動物	1群当り供試数	投与方法	投与量 (mg/kg)	LD ₅₀ 値または無毒性量 (mg/kg)	試験機関 (報告年)	記載頁
代 1-1 (GLP)	急性毒性 (N-ホルミルスピネトラム-J) 14日間観察	ラット	790 ppm ♀ 1 2500ppm ♀ 1 5000ppm ♀ 3	経口	0, 790, 2500, 5000	>5000	Eurofins Product Safety Lab. (2007年)	236
	急性毒性 (N-ホルミルスピネトラム-L) 14日間観察	ラット	♀ 3	経口	0, 5000	>5000	Eurofins Product Safety Lab. (2007年)	
代 1-2 (GLP)	急性毒性 (脱メチルスピネトラム-J) 14日間観察	ラット	175 ppm ♀ 1 550 ppm ♀ 1 1750ppm ♀ 3 5000ppm ♀ 8	経口	175, 550, 1750, 5000	3129	Eurofins Product Safety Lab. (2007年)	238
代 2-1 (GLP)	変異原性 (N-ホルミルスピネトラム-J) 復帰突然変異	ネズミチフス菌: (TA98, TA100, TA1535, TA1537) 大腸菌: (WP2uvrA)		<i>in vitro</i> (フラインクペーション法)	ネズミチフス菌および大腸菌: (-S9 および+S9) 33.3~5000 µg/プレート 用量: 6段階、3連制	陰性	Covance (2007年)	240
	変異原性 (N-ホルミルスピネトラム-L) 復帰突然変異	ネズミチフス菌: (TA98, TA100, TA1535, TA1537) 大腸菌: (WP2uvrA)		<i>in vitro</i> (フラインクペーション法)	ネズミチフス菌および大腸菌: (-S9 および+S9) 33.3~5000 µg/プレート 用量: 6段階、3連制	陰性	Covance (2007年)	
代 2-2 (GLP)	変異原性 (脱メチルスピネトラム-J) 復帰突然変異	ネズミチフス菌: (TA98, TA100, TA1535, TA1537) 大腸菌: (WP2uvrA)		<i>in vitro</i> (フラインクペーション法)	ネズミチフス菌: (-S9) 0.333~333 µg/プレート (+S9) 1.00~1000 µg/プレート 大腸菌: (-S9 および+S9) 3.33~3330 µg/プレート 用量: 7段階、3連制	陰性	Covance (2007年)	246

3. 製剤を用いた毒性試験成績

資料No.	試験の種類・ 期間	供試生物	1群当り 供試数	投与方法	投与量 (mg/kg)	LD ₅₀ 値または 無毒性量 (mg/kg)	試験機関 (報告年)	記載 頁
製1-1 (GLP)	急性毒性 (25.0%水和剤) 14日間観察	ラット	♀3	経口	♀:5000	>5000	Eurofins Product Safety Lab. (2007年)	250
製1-2 (GLP)	急性毒性 (25.0%水和剤) 14日間観察	ラット	♂♀各5	経皮	♂♀:5000	>5000	Eurofins Product Safety Lab. (2007年)	252
製1-3 (GLP)	皮膚刺激性 (25.0%水和剤) 72時間観察	ウサギ	♂3	皮膚貼付	0.5g/皮膚(6cm ²)	刺激性あり 48時間以内に回復	Eurofins Product Safety Lab. (2007年)	254
製1-4 (GLP)	眼刺激性 (25.0%水和剤) 72時間観察	ウサギ	♀3	眼への 適用	0.06g(0.1mL容量)/眼	刺激性あり 72時間以内に回復	Eurofins Product Safety Lab. (2007年)	256
製1-5 (GLP)	皮膚感受性 (25.0%水和剤) 6日間観察	マウス	♀:6	LLNA法	5%, 25.0%, 75%を1回 /日で3日間適用	皮膚感受性なし	Dow (2007年)	258
製2-1 (GLP)	急性毒性 (11.7%水和剤) 14日間観察	ラット	♀3	経口	♀:5000	>5000	Eurofins Product Safety Lab. (2007年)	260
製2-2 (GLP)	急性毒性 (11.7%水和剤) 14日間観察	ラット	♂♀各5	経皮	♂♀:5000	>5000	Eurofins Product Safety Lab. (2007年)	261
製2-3 (GLP)	皮膚刺激性 (11.7%水和剤) 72時間観察	ウサギ	♂2 ♀1	皮膚貼付	0.5mL/皮膚(6cm ²)	刺激性あり 48時間以内に回復	Eurofins Product Safety Lab. (2005年)	262
製2-4 (GLP)	眼刺激性 (11.7%水和剤) 72時間観察	ウサギ	♂1 ♀2	眼への 適用	0.1mL/眼	刺激性あり 72時間以内に回復	Eurofins Product Safety Lab. (2005年)	264
製2-5 (GLP)	皮膚感受性 (11.7%水和剤) 6日間観察	マウス	♀:6	LLNA法	4%, 20%, 100%を1回 /日で3日間適用	皮膚感受性なし	Dow (2005年)	266
製3-1 (GLP)	急性毒性 (0.50%粒剤) 14日間観察	ラット	♀3	経口	♀:2000	>2000	ボゾ・リサー チセンター (2007年)	268
製3-2 (GLP)	急性毒性 (0.50%粒剤) 14日間観察	ラット	♂♀各5	経皮	♂♀:2000	>2000	ボゾ・リサー チセンター (2007年)	269

資料 No.	試験の種類・ 期間	供試生物	1群当り 供試数	投与方法	投与量 (mg/kg)	LD ₅₀ 値または 無毒性量 (mg/kg)	試験機関 (報告年)	記載 頁
製 3-3 (GLP)	皮膚刺激性 (0.50%粒剤) 72時間観察	ウサギ	♂ 3	皮膚貼付	0.5 g/皮膚 (2.5 cm×2.5 cm)	ごく軽度の刺激性あり 48時間以内に回復	住友化学 (2007年)	270
製 3-4 (GLP)	眼刺激性 (0.50%粒剤) 72時間観察	ウサギ	♂ 3	眼への 適用	0.066 g (0.1 mL 容量) / 眼	ごく軽度の刺激性あり 72時間以内に回復 洗眼効果あり	住友化学 (2007年)	272
製 3-5 (GLP)	皮膚感受性 (0.50%粒剤) 30日間観察	モルモット	♀ : 20 (感作 群) 10 (非感 作群)	Buehler 法	感作 : 100%を6時間閉 塞貼付、7日ごとに計3 回実施 惹起 : 100%を6時間閉 塞貼付	皮膚感受性なし	ボソ・リサ ーチセンター (2007年)	274

1. 原体を用いた試験成績

1. 急性毒性

(1) スピネトラム原体のラットにおける急性経口毒性試験 (資料 1-1)

試験機関：The Dow Chemical Company

[GLP 対応]

報告書作成年：2005 年

検体の純度：

供試動物：F344/DuCrI 系ラット、8~12 週齢、体重：110.6~115.7 g、一群雌 3 匹

観察期間：14 日間

試験方法：アップダウン法。1 匹に 5000 mg/kg の投与量で投与したところ、生存したため、続いて同用量を別の 2 匹に投与した。これらも生存したため試験を終了した。

投与方法：検体を 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し経口投与した。

観察・検査項目：毒性徴候及び生死を 14 日間観察した。観察期間終了後に全動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	5000
LD ₅₀ (mg/kg)	> 5000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現時期および消失時期	投与後 1 日目 (投与日) から発現 7 日目に消失
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5000

毒性徴候としては、水様便、会陰部の汚れ及び口周囲の汚れが観察された。

剖検では、特記すべき変化は認められなかった。

(2)スピネトラム原体のラットにおける急性経皮毒性試験 (資料 1-2)

試験機関：The Dow Chemical Company

[GLP 対応]

報告書作成年：2005 年

検体の純度：

供試動物：F344/DuCr1 系ラット、約 8 週齢、体重：118.6～188.1 g、一群雌雄各 5 匹

観察期間：14 日間

投与方法：検体を 0.5%メチルセルロース水溶液で湿らせ、刈毛した背部（体表の約 10%）に適用し、24 時間半閉塞貼付した。投与 24 時間後に湿らせた使い捨てタオルを用いて適用部位から検体を拭き取った。

観察・検査項目：毒性徴候及び生死を 14 日間観察した。試験終了時の全生存動物について適用部位を含む組織の肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	5000
LD ₅₀ (mg/kg)	> 5000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び消失時間	投与後 1 日目（投与日）から発現 4 日目までに消失
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5000

毒性徴候としては、会陰部、口の周囲、鼻の周囲及び/あるいは眼の周囲の汚れが認められたが、全て、投与後 4 日目までに消失した。

剖検では、特記すべき変化は認められなかった。

また、投与部位の皮膚に、刺激性変化及びその他の異常は認められなかった。

(3)スピネトラム原体のラットにおける急性吸入毒性試験 (資料 1-3)

試験機関：The Dow Chemical Company

[GLP 対応]

報告書作成年：2005 年

検体の純度：

供試動物：F344/DuCrI 系ラット、9 週齢、体重：雄 216～222 g、雌 136～139 g、一群
雌雄各 5 匹

観察期間：14 日間

曝露方法：ジェットミルを用いてダストエアロゾルを発生させ、4 時間鼻部曝露させた。
ダストエアロゾルを PTFE コートのフィルターを用いて捕集し、重量測定法により実測気中濃度を求めた。

曝露条件：

設定濃度 (mg/L)	5
実測気中濃度 (mg/L) (時間加重平均：TWA)	5.50
粒子径分布 (%) ¹⁾	
≤17 (μm)	98.0
≤11	97.3
≤ 6.1	94.0
≤ 3	77.4
≤ 1.3	44.0
≤ 0.68	11.7
空気力学的中位径 (μm)	1.51
チャンバー容積 (L)	42
チャンパー内通気量 (L/分)	30
曝露条件	ダストエアロゾル 4 時間 鼻部曝露

¹⁾ カスケードインパクターを用いて 2 回測定した平均

観察・検査項目：被験物質曝露前、及び曝露中は 30 分毎に毒性徴候及び生死を観察した。

また、曝露前、及び曝露後毎日、詳細な臨床観察を行った。

体重測定は被験物質曝露前、曝露後の 2、4、8、11 及び 15 日目に行った。

15 日目に、全動物について肉眼的病理検査を実施した。

結 果：

投与方法	吸 入
曝露濃度 (mg/L)	5.50
LC50 (mg/L)	雄 > 5.50 雌 > 5.50
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び消失時間	曝露開始後 3.5 時間から発現 曝露後の 14 日目までに消失
死亡例の認められなかった 最高曝露濃度 (mg/L)	5.50

曝露中、曝露の影響としては、雌雄各 1 例に被毛の汚れが観察されたのみであった。曝露後は、眼の周囲、会陰部及び/あるいは広範囲に及ぶ身体の汚れなどが観察され、曝露後の 14 日目までに消失した。

肉眼的病理検査では、何ら特記すべき変化は認められなかった。

2. 皮膚及び眼に対する刺激性

(1) スピネトラム原体のウサギを用いた皮膚刺激性試験

(資料 2-1)

試験機関：Dow Chemical Company

[GLP 対応]

報告書作成年：2005 年

検体の純度：

供試動物：ニュージーランドホワイト種ウサギ、31 週齢、体重 3.1～3.4 kg、一群雄 1 匹および雌 2 匹

観察期間：検体除去後 72 時間

投与方法：検体 0.5 g を 0.5%メチルセルロース水溶液 1 mL で湿らせ、刈毛した動物の背中の皮膚 (6 cm²) に適用し、半閉塞貼付した。曝露時間は 4 時間とし、皮膚に残った検体は湿った使い捨てタオルを用いて拭き取った。

観察項目：検体除去後 60 分以内、24、48 および 72 時間後に適用部分の刺激性変化 (紅斑および浮腫) を観察し、Draize 法に従って採点した。

結果：観察した刺激性変化の採点は以下の表のとおりである。

動物番号	項目	最高評点	曝露後時間 (時間)			
			1	24	48	72
1	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
2	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
3	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
合計	紅斑・痂皮	12	0	0	0	0
	浮腫	12	0	0	0	0
平均	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0

観察期間を通じて、皮膚の刺激性変化は認められなかった。

以上の結果から、この試験の条件下、スピネトラムは、ウサギの皮膚に対して、刺激性はないと判定した。

(2) スピネトラム原体のウサギを用いた眼刺激性試験

(資料 2-2)

試験機関：The Dow Chemical Company

[GLP 対応]

報告書作成年：2005 年

検体の純度：

供試動物：ニュージーランドホワイト種ウサギ、17 週齢、体重：2.3～2.6 kg、一群雄 2 匹および雌 1 匹

観察期間：72 時間

投与方法：検体 0.1 mL 容量（約 0.05 g）を右眼に適用した。洗眼はしなかった。無処理の左眼を対照とした。

観察項目：適用後 1、24、48 及び 72 時間後に角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察し、Draize 法に従って採点した。

結果：観察した刺激性変化の採点は以下の表のとおりである。

項 目			最高 評点	適用後時間				
				1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	
非 洗 眼 群	動物 番号 1	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
			面積	4	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	0	0	0
			浮腫	4	1	0	0	0
			眼脂分泌	3	1	0	0	0
		動物 番号 2	角膜混濁	程度	4	0	0	0
	面積			4	0	0	0	0
	虹彩		2	1	0	0	0	
	結膜		発赤	3	2	0	0	0
			浮腫	4	1	0	0	0
			眼脂分泌	3	3	0	0	0

項 目				最高 評点	適用後時間			
					1 時間	24 時間	48 時間	72 時間
非 洗 眼 群	動物 番号 3	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
			面積	4	0	0	0	0
	虹彩			2	1	0	0	0
	結膜			発赤	3	2	0	0
				浮腫	4	1	0	0
				眼脂分泌	3	2	0	0
	合計				330	38	0	0
	平均				110	12.7	0	0

角膜の刺激性変化は認められなかった。

結膜及び虹彩の刺激性変化は、適用の 1 時間後、3 匹のウサギ全てに、軽度から中等度の結膜の発赤、軽度の結膜浮腫、軽度から顕著な眼脂分泌が認められ、2 匹のウサギに虹彩の発赤が認められたが、これらの変化は適用の 24 時間後には回復した。

以上の結果から、スピネトラムはウサギの眼粘膜に対して、刺激性があると判定された。刺激性変化は 24 時間以内に回復した。

【申請者注】

申請者が試験結果を Kay and Calandra の方法で評価した場合、ごく軽度の刺激性があると判定された。

3. 皮膚感作性

スピネトラム原体のマウスを用いた LLNA 試験 (Local Lymph Node Assay) (資料 3)

試験機関: The Dow Chemical Company

[GLP 対応]

報告書作成年: 2005 年

検体の純度:

供試動物: BALB/cAnNCrI 系マウス、8~12 週齢、一群雌 6 匹

観察期間: 6 日間観察

試験操作: [LLNA 試験 (Local Lymph Node Assay)]

LLNA 試験; 両耳の背部に検体の 2.5、10 および 40% (w/v) 溶液、あるいは溶媒 (A00) を毎日 1 回 (25 μ L/耳)、3 日間 (1~3 日目) 連続して局所適用した。6 日目に PBS (リン酸緩衝生理食塩水) で希釈した 3 H-チミジン 250 μ L (20 μ Ci 相当量) を尾静脈内に投与し、約 5 時間後に各動物の耳介リンパ節を摘出して、放射能 (dpm) を β -シンチレーションカウンターで測定した。一方、陽性対照群には、 α -ヘキシルシンナムアルデヒド (HCA) の 30% (v/v) 溶液 (溶媒: A00) を適用した。

観察項目:

体重変化; 試験開始時および終了時に体重を測定した。

適用部位の紅斑; 検体適用前および 3 H-チミジン投与前に、以下の基準に従って耳の紅斑を評価した。

	評点
肉眼的影響なし	0
軽度の紅斑 (かろうじて識別できる)	1
はっきりした紅斑	2
中等度ないし重度紅斑	3
痂皮	4

皮膚感作性；耳介リンパ節中放射能 (dpm) の値から SI 値 (Stimulation Index、各動物の dpm/溶媒対照群の平均 dpm) を算出した。SI 値が 3 未満であれば皮膚感作性なし、3 以上であれば皮膚感作性ありと判定した。皮膚感作性ありと判定された場合には、SI が 3 となる検体濃度 (EC₃) を算出し、以下の基準に従って皮膚感作性の強さを分類した。

EC ₃	強さ
10%以上 100%以下	弱い
1%以上 10%未満	中等度
0.1%以上 1%未満	強度
0.1%未満	極度

結果：体重増加量および SI 値の各群平均値、および各観察時間における適用部位の紅斑が認められた動物数を下表に示す。

群	供試動物数	紅斑の認められた動物数																平均体重増加量	平均 SI 値				
		1日目				2日目				3日目				6日目									
		紅斑評点																					
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4		
溶媒対照 (A00)	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0.0	1.0 ^a
検体 (%)	2.5	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0.1	2.3
	10	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0.1	1.4
	40	6	0	0	0	0	1	5	0	0	0	1	5	0	0	0	0	6	0	0	0	-1.1	4.4
陽性対照 HCA	6	6	0	0	0	0	0	2	4	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	-0.1	16.4

a：統計学的解析は実施しなかった

b：1例は統計的外れ値として計算から除外した

2.5 および 10% 検体群において、紅斑は認められなかった。40% 検体群では試験終了時 (6 日目) までに軽度の紅斑が認められた。2.5、10 および 40% 検体群の SI 値は、それぞれ 2.3、1.4 および 4.4 であった。この結果、EC₃ は 26% と推定された。

一方、陽性対照群の SI 値は 16.4 であった。

以上の結果から、スピネトラムは弱い皮膚感作性を有すると判定された。

4. 急性神経毒性

スピネトラム原体のラットを用いた急性神経毒性試験

(資料 4)

試験機関：The Dow Chemical Company

[GLP 対応]

報告書作成年：2005 年

検体純度：

供試動物： F344/DuCrI 系ラット、1 群雌雄各 10 匹、開始時約 6 週令

観察期間： 2 週間 (2005 年 3 月 7-10 日～2005 年 3 月 22-25 日)

投与方法：検体を 0.5% メチルセルロース水溶液に懸濁して、投与量 0、200、630 または 2000 mg/kg、投与液量 10 mL/kg で単回強制経口投与した。

観察・検査項目及び結果：

死亡率；生死を 1 日 2 回以上観察した。

試験期間を通して死亡は認められなかった。

一般状態；ケージ外からの観察を 1 日 1 回以上、毎日ほぼ同じ時刻に行い、試験 2、3 および 4 日目に詳細な臨床観察を行った。

詳細な臨床観察において、2000 mg/kg 投与群の雌 1 例で 2 日目に会陰部の糞便汚れがみられたが、3 日目に消失した。2000 mg/kg 投与群の他の雌 1 例で 2 および 3 日目に会陰部の尿汚れがみられたが、4 日目に消失した。[申請者注]

[申請者注] 会陰部の糞便・尿汚れについて

報告書における総合機能観察の結果の項において、「会陰部の糞便汚れの発現には用量依存性がなく、発現頻度も非常に低く、対照群においても認められることから、この変化は被験物質に起因するのではない」との記載があり、臨床観察において認められた会陰部の糞便・尿汚れも同様に、被験物質に起因するのではないと考えられた。

体重変化；投与開始前、投与当日（試験1日目）、ならびに観察期間中の試験8および15日目にすべての動物の体重を測定した。

いずれの測定時点でも、投与の影響は認められなかった。

詳細な状態の観察；投与開始前、投与当日の最大影響発現時点（投与後5時間）、試験8および試験15日目に全動物を対象として、以下の項目について観察した。

保定しての観察（眼瞼閉鎖、流涙、瞳孔サイズ、瞳孔反射、流涎、筋緊張、伸筋衝動反応、保定し易さなど）

オープンフィールドでの観察（活動性レベル、聴覚反応、接触反応、テイルピンチ反応、排尿、排糞、歩行など）

いずれの項目にも投与の影響は認められなかった。

機能検査；投与開始前、投与当日の最大影響発現時点（投与後5時間）、試験8および試験15日目に全動物を対象として、以下の項目の測定を行った。

直腸温、前肢および後肢握力、着地開脚幅、自発運動量

自発運動量の投与量 × 時間の相互作用が統計学的に有意 ($P = 0.0161$) であり、対照群と 2000 mg/kg 投与群間で統計学的に有意差 ($P = 0.0002$) が認められた。総自発運動量の対照群 (100) に対する変動率 (%) を下表に示す。

検査時期	雄			雌		
	200 mg/kg	630 mg/kg	2000 mg/kg	200 mg/kg	630 mg/kg	2000 mg/kg
投与前	120	109	120	115	105	117
1日目	99	99	93	98	90	91
8日目	107	107	116	105	98	106
15日目	104	94	103	100	105	101

統計解析には性別と投与量を因子、時間を反復因子とした反復測定要因デザインを用いた。相互作用が有意であった場合は、線形対比の検定を行って、対照群との有意差を検討した。

対照群に比べて2000 mg/kg 投与群の総自発運動量は、投与前ならびに試験8および15日目に多く、試験1日目に少なかった。しかし、対照群と2000 mg/kg 投与群との差は試験1日目に比べて投与前でより大きいことから、対照群と比べた試験1日目の2000 mg/kg 投与群での自発運動量の減少はきわめてわずかであり、生物学的意義はないと考えられた。また、自発運動量の増加も生物学的に正常な変動範囲内であり、投与の影響ではないと考えられた。その他には、いずれの測定時点でも雌雄ともに統計学的に有意な直腸温、握力および着地開脚幅の変化は認められなかった。

肉眼的病理検査；試験16日目に全動物を対象として検査した。

2000 mg/kg 投与群の雄3例で左右精巣の小型化が認められ、うち1例では精巣上体の小型化も認められた。また、200 mg/kg 投与群の雄1例でも左右精巣の小型化が認められた。しかし、再試験（投与量：0、2000 mg/kg、1群雄10匹）の剖検では、いずれの動物にも異常は認められず、2000 mg/kg 投与群の精巣および精巣上体重量は対照群とほぼ同じであったことから、本試験で認められた精巣の小型化は自然発生による変化であり、検体投与に関連するものではないと結論された。

病理組織学的検査；試験16日目に各群雌雄各5匹を対象に、イソフルラン蒸気吸入により麻酔し、亜硝酸ナトリウムを含む0.05 M リン酸緩衝液に続いて1.5%グルタルアルデヒド-4%ホルムアルデヒドのリン酸緩衝液を用いて灌流固定した後、対照群および2000 mg/kg 投与群の以下の組織について病理標本を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して検鏡した。

嗅球、大脳（前頭葉、頭頂葉、側頭葉、後頭葉）、視床/視床下部、中脳、橋、小脳、延髄、三叉神経節/三叉神経、下垂体、眼および視神経、
脊髄（頸部および腰部）、嗅上皮および骨格筋（腓腹筋、前脛骨筋）

また、対照群および2000 mg/kg 投与群の以下の組織については、オスミウム酸処理後、エポキシ樹脂に包埋し、トルイジンブルー染色を施して検鏡した。

脊髄神経根（頸部および腰部）、後根神経節（頸部および腰部）および末梢神経（坐骨神経、近位および遠位一膝および腓腹筋部の脛骨神経、腓腹神経）

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 (mg/kg)			0	2000	0	2000
臓器	所見\検査動物数		5	5	5	5
延髄	限局性台形体神経線維変性	軽微	4	3	2	4
	多発性台形体神経線維変性	軽微	0	2	2	1
腰部後根神経節	限局性神経線維変性	軽微	0	0	0	1
腓腹神経	多発性神経線維変性	軽微	0	0	1	0
脛骨神経	限局性神経線維変性	軽微	1	0	0	0
頸部脊髄	限局性側索神経線維変性	軽微	1	0	0	1
腰部脊髄	限局性側索神経線維軸索腫大	軽微	0	0	0	1
三叉神経節/ 三叉神経	限局性片側神経線維変性	軽微	0	0	0	1

対照群との有意差検定は行わなかった。

2000 mg/kg 投与群の中枢あるいは末梢神経系に投与に関連すると考えられる病理組織学的所見は認められなかった。認められた変化はいずれも軽微な自然発生による変化であり、検体投与に起因するものとは考えられない。

以上の結果から、本剤のラットに対する単回強制経口投与による急性神経毒性試験における影響は、ケージ外からの観察、保定時の観察またはオープンフィールド観察、体重、握力、直腸温、着地開脚幅、自発運動量、中枢または末梢神経系の病理組織学的検査のいずれにおいても認められなかったため、本剤の神経毒性に関する無影響量 (NOEL) は雌雄ともに試験した最高用量の 2000 mg/kg であると判断される。

5. 90日間反復経口投与毒性

(1) ラット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 5-1)

試験機関: The Dow Chemical Company

[GLP 対応]

報告書作成年: 2005年

検体の純度:

(スピネトラム-J: 62.0%、スピネトラム-L: 21.0%)

供試動物: Fischer 344 系ラット、主群: 1 群雄各 10 匹 (0、120、500、1000 あるいは 2000 ppm 群) あるいは 1 群雌各 10 匹 (0、120、500、1000、2000 あるいは 4000 ppm 群)、回復群: 1 群雌雄各 10 匹 (0 あるいは 1000 ppm 群)、開始時 6 週齢

投与期間: 主群 : 90 日間 (2004 年 4 月 29 日~2004 年 7 月 27 日)

回復群: 90 日間 (2004 年 4 月 29 日~2004 年 7 月 27 日)

回復期間: 回復群: 28 日間 (2004 年 7 月 28 日~2004 年 8 月 24 日)

投与方法: 検体を 0、120、500、1000 あるいは 2000 ppm の濃度で飼料に混入して雄各 10 匹に、また、0、120、500、1000、2000 あるいは 4000 ppm の濃度で飼料に混入して雌各 10 匹に、90 日間にわたって自由に摂食させた。また、回復群の雌雄各 10 匹については、0 あるいは 1000 ppm の濃度の飼料を 90 日間にわたって自由に摂食させた後、さらに対照飼料で 28 日間飼育した。検体を混入した飼料は最初の 5 週間は毎週、残りの試験期間中は 2 週間毎に調製した。

観察・検査項目及び結果:

一般状態及び死亡率; 一般状態を 1 日 1 回、生死を 1 日 2 回観察した。また、詳細な臨床観察を投与前、及び試験期間中は週 1 回実施した。

試験期間中、死亡は認められなかった。投与期間中、2000 ppm 群の雌 1 例ある

いは2例(36~78日目)および4000 ppm群の雌2~5例(36~90日目)に散発性の皮膚の剥離/鱗屑が認められたが、投与期間終了時には大半が正常範囲内であったことから、検体投与によるものとは考えられなかった。その他の一般症状としては、眼の混濁/赤み、切歯の不正咬合、過度の脱毛、会陰部の汚れ、眼周囲の赤い汚れが認められたが、散発性であること及び/あるいは用量反応性がないことから、検体投与に関連したものとは考えられなかった。詳細な臨床観察では500 ppm群の雌1例に片側性の瞳孔拡大が認められたが、自然発生的な変化と考えられた。

体重変化：投与前、及び試験期間中は週1回全ての動物の体重を測定した。また、体重増加量を算出した。

対照群と比べ、主要な変化の認められた体重及び体重増加量(90日目)を下表に示す。

性別	雄				雌				
	120	500	1000	2000	120	500	1000	2000	4000
投与量 (ppm)									
体重				94.2					↓91.8*
体重増加量				↓89.8*				↓92.1*	↓85.2*

* Dunnett 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の。

2000 ppm群の雄の体重および体重増加量は投与期間中を通して、一貫して対照群より低値であり、検体投与に関連した変化と考えられた。2000 ppm群の雄の体重及び体重増加量は、投与期間終了時、それぞれ対照群より5.8及び10.2%の低値を示した。4000 ppm群の雌では投与期間の大半を通して、投与に関連した統計学的に有意な体重及び体重増加量の低値が認められた。4000 ppm群の雌の体重及び体重増加量は投与期間終了時、対照群と比較してそれぞれ8.2%及び14.8%の低値であった。2000 ppm群の雌の体重増加量は投与期間終了時、対照群と比較して7.9%の低値であった。2000 ppm群の雌の統計学的に有意な体重増加量の低値については、検体投与による影響と考えられた。

摂餌量；全動物の摂餌量を投与前と、その後は少なくとも週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期間を下表に示す。

性別	雄				雌				
	120	500	1000	2000	120	500	1000	2000	4000
1～8日目				↓93.0*			↓96.8*	↓90.3*	↓75.8*
8～15日目									↓85.5*
15～22日目									↓87.2*
22～29日目									↓89.6*
29～36日目									↓91.0*
43～50日目				↓91.6*					
57～64日目				↓93.0*	↓94.3*				↓91.8*
85～90日目					↓90.6*	↓93.7*	↓93.7*		↓87.4*

* Dunnett 検定、↓ : P < 0.05.

\$ Wilcoxon 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。

Bartlett 検定し、有意差を示さない場合には Dunnett 検定(パラメトリック分散解析)、有意差を示す場合には Wilcoxon 検定(ノンパラメトリック分散解析)を実施した。

2000 ppm 群の雄では、対照群と比較して常に摂餌量の低値が認められた。1～8、43～50 及び 57～64 日目には統計学的有意差が認められ、検体投与による影響と考えられた。4000 ppm 群の雌では、投与期間を通して、対照群と比較して摂餌量の低値が認められた。多くの場合、統計学的有意差が認められ、検体投与に起因したものと考えられた。120、500、1000 あるいは 2000 ppm 群の雌では対照群と比べ、有意な低値が散発的に認められたが、検体投与に関連したものとは考えられなかった。

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)		120	500	1000	2000	4000
検体摂取量 ^a (mg/kg/day)	雄	7.92	32.4	65.8	128	NA
	雌	9.5	39.6	79.3	159	311

a ; 時間加重平均

NA ; 該当なし

血液学的検査；主群を対象として、剖検時に全動物の眼窩静脈叢から血液を採取し、以下の項目の測定を行った。

ヘマトクリット値、血色素量、赤血球数、総白血球数、血小板数、白血球分

類、網状赤血球数 (RET)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、プロトロンビン時間

回復群については、主群の 1000 ppm 群に、対照群と比較して統計学的有意差が認められた項目、すなわち、雄の赤血球数、雌のヘマトクリット値、血色素量、総白血球数、白血球分類の測定を剖検時に行った。

(主群)

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目及び/あるいは検体投与に関連した変化が認められた項目を下表に示す。

性別	雄					雌					
	120	500	1000		2000	120	500	1000		2000	4000
			主群	回復群				主群	回復群		
赤血球数	↑ 103*	↑ 103*	↑ 104*		↑ 105*						
血色素量								↓ 95*		↓ 92*	↓ 89*
ヘマトクリット値	↑ 103*	↑ 103*						↓ 95*		↓ 93*	↓ 91*
MCV					↓ 97*			↓ 98*		↓ 94*	↓ 92*
MCH			↓ 99*		↓ 96*			↓ 97*		↓ 92*	↓ 90*
MCHC											↓ 98*
RET								117		↑ 129*	↑ 136*
白血球数								130		↑ 153*	↑ 180*
血小板数					↓ 85*					↓ 84*	
単球					↑ 138*						
好酸球											↓ 43*
好塩基球					↑ 167*			↑ 250*	↑ 200*	↑ 200*	↑ 200*
大型未分類細胞					↑ 150*					↑ 250*	↑ 233*

* Dunnett 検定、↑ ↓ : P < 0.05

§ Wilcoxon 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。

Bartlett 検定し、有意差を示さない場合には Dunnett 検定 (パラメトリック分散解析)、有意差を示す場合には Wilcoxon 検定 (ノンパラメトリック分散解析) を実施した。

2000 及び 4000 ppm 群の雌において、血色素量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量および平均赤血球血色素濃度 (4000ppm のみ) の低値、及び網状赤血球数の統計学的に有意な高値が認められた。2000 及び 4000

ppm 群の雌ではまた、白血球数の統計的に有意な高値が認められ、検体投与に関連した変化と考えられた。1000 ppm 投与群の雌では、対照群及び当研究所における同系統での背景値(血色素量; 14.8~15.8 g/dL、白血球数; $4.90\sim 6.70 \times 10^3/\mu\text{L}$)と比べて、血色素量の低値(14.7 g/dL)、網状赤血球数及び白血球数のやや高値(網状赤血球数; $184.0 \times 10^3/\text{L}$ 、白血球数; $7.43 \times 10^3/\mu\text{L}$)が認められ、検体投与に起因したものと考えられた。1000 ppm 群の雌において、平均赤血球容積及び平均赤血球血色素量の統計的に有意な変化(平均赤血球容積; 51.9 fL、平均赤血球血色素量; 18.1 pg)が認められたが、背景値(平均赤血球容積; 50.3~53.1 fL、平均赤血球血色素量; 18.5~19.2 pg)の範囲内であるか、あるいは極めて近い値であることから、投与に起因するものとは考えられなかった。2000 ppm 群の雌において、対照群と比較して、血小板数のわずかな低値が認められ、統計学的有意差が認められたが、同様の変化が4000 ppm 群の雌で認められなかったことから、この変化は検体投与に関連したものとは考えられなかった。雌の白血球分類の自動分析により、雌の1000 ppm 以上の群において統計学的な有意差な好塩基球の百分率の高値、2000 ppm 以上の群において大型未分類細胞の百分率の高値、及び4000 ppm 群において好酸球の百分率の低値が認められた。しかし、マニュアルでの白血球分類では、0および4000 ppm 群の雌の好塩基球と大型未分類細胞の間に差は認められず、好塩基球及び大型未分類細胞の百分率の高値は検体投与による影響とは考えられなかった。

[申請者注]: 報告書には雌の4000 ppm 群における好酸球の百分率の低値が投与の影響か否かについて記載されていない。しかし、同群では検体投与による白血球数の高値が認められており、好酸球の百分率の低値は白血球数の高値に伴う比率の変化であり、検体投与による好酸球への影響とは考えられなかった。

雄では、対照群と比較して120、500、1000あるいは2000 ppm 群における赤血球数の高値($9.15\sim 9.32 \times 10^9/\text{L}$)、120あるいは500 ppm 群におけるヘマトクリット値の高値(46.1~46.2%)、2000 ppm 群における血小板数の低値($541 \times 10^3/\mu\text{L}$)、2000 ppm 群における単球、好塩基球および大型未分類細胞の百分率の高値(単球; 3.3%、好塩基球; 0.5%、大型未分類細胞; 0.9%)、2000 ppm 群における平均赤血球容積の低値(48.7 fL)、及び1000あるいは2000 ppm 群における平均赤血球血色素量の低値(16.3~16.8 pg)が認められた。しかし、これらの値は当研究所における同系統での背景値(赤血球数; $7.99\sim 9.30 \times 10^9/\text{L}$ 、ヘマトクリット値; 39.2~46.3%、血小板数; $531\sim 704 \times 10^3/\mu\text{L}$ 、好塩基球; 0.2~0.6%、大型未分類細胞; 0.6~2.0%、平均赤血球容積; 47.4~50.4 fL、平均赤血球血色素量; 16.9~17.9 pg)と比較すると正常値域内にあるか極めて

近い値であること及び／あるいは用量相関性がないことから、検体投与による影響とは考えられなかった。

なお、雌の1000ppm群以上において、上述の赤血球系パラメーターの変化（血色素量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量および平均赤血球血色素濃度の減少、網状赤血球数の増加）から、小球性低色素性の再生性貧血が示唆されたが、赤血球系パラメーターの減少はいずれも対照群値から11%以下であり、貧血の程度は重篤ではなかった。この貧血の発現機序は不明であるが、少なくとも、大量の出血、溶血または骨髄の造血機能障害が主な原因であるとは考えられなかった。さらに、ラットの2年間混餌投与による慢性毒性発がん性試験（投与量：0、50、250、500、750ppm）において、貧血は認められず、投与が長期化しても進行性あるいは再生不良性の影響には至らなかった。

〈回復群〉

投与期間中、1000 ppm 群の雄の赤血球数が対照群よりわずかに高値を示し、統計学的有意差が認められたが、検体投与による影響とは考えられなかった。回復期間終了時の1000 ppm群の雄の赤血球数はまだ、対照群より高値であったが、統計学的有意差は認められなかった。1000 ppm 群の雌の白血球数が投与期間終了時、対照群より高値であり、検体投与に関連した変化と考えられた。回復期間中、1000 ppm 群の雌の白血球数は対照群よりわずかに高値であったが、統計学的有意差は認められず、正常な変動の範囲内と考えられた。従って、白血球数の高値の回復が示唆された。回復期間中、1000 ppm 群の雌の好塩基球の百分率が対照群よりわずかに高値であったが、投与期間中には投与による影響は認められなかった。

血液生化学的検査；主群を対象として、剖検時に全動物の眼窩静脈叢から血液を採取して得られた血清を用い、以下の項目の測定を行った。

アルカリ性ホスファターゼ (AP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、 γ -グルタミルトランスアミナーゼ (GGT)、アルブミン (ALB)、コレステロール (CHOL)、クレアチニン (CREA)、電解質 (NA、K、PHOS、CL 及び CA)、グロブリン (GLOB)、グルコース (GLU)、総ビリルビン (TBIL)、総蛋白 (TP)、トリグリセライド (TRIG)、尿素窒素 (UN)、アルブミン/グロブリン比 (A/G)

回復群については、主群の1000 ppm群に、対照群と比較して統計学的有意差が認められた項目、すなわち、雄のアラニンアミノトランスフェラーゼ活性及び総蛋白、雌のアルブミン及びトリグリセライドの測定を剖検時に行った。

(主群)

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目及び/あるいは検体投与に関連した変化が認められた項目を下表に示す。

性別	雄					雌					
	120	500	1000		2000	120	500	1000		2000	4000
			主群	回復群				主群	回復群		
ALT			↑130 [‡]	↑136 [‡]	↑172 [‡]						↑140 [‡]
AST					↑165 [‡]					↑176 [*]	↑227 [*]
総蛋白			↑104 [*]		↑104 [*]					↓96 [*]	↓92 [*]
グルコース					↑115 [*]					↑112 [*]	↑112 [*]
リン					↑108 [*]						
AP											↑128 [*]
トリグリセリド [*]							↓82 [*]	↓68 [*]		↓64 [*]	↓62 [*]
尿素窒素											↑113 [*]
アルブミン								↓95 [*]		↓89 [*]	↓87 [*]
コレステロール						↓91 [*]				↓90 [*]	↓89 [*]
カルシウム											↓96 [*]
クロライド [*]											↓99 [*]

* Dunnett 検定、↑↓ : P < 0.05

‡ Wilcoxon 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。

Bartlett 検定し、有意差を示さない場合には Dunnett 検定(パラメトリック分散解析)、有意差を示す場合には Wilcoxon 検定(ノンパラメトリック分散解析)を実施した。

2000 ppm 群の雄ではアラニンアミノトランスフェラーゼ活性、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性の高値が認められ、投与に関連した変化と考えられた。また、1000 ppm 群の雄において、アラニンアミノトランスフェラーゼ活性のわずかではあるが統計学的有意差のある増加 (70 U/L) が認められた。この値は当研究所における同系統での背景値 (52~70 U/L) と比較すると正常値域の上限であったが、一方で、対照群の値 (54 U/L) は背景値の正常値域の下限であり、肝臓に顕微鏡で認められる影響を伴うものではなかった。従って、1000 ppm における変化は投与に関連したものであるが、毒性学的意義はないと考えられた。2000 ppm 群の雄において、総蛋白、グルコース及びリンの統計学的に有意な増加 (総蛋白 ; 7.3 g/dL、グルコース ; 139 mg/dL、リン ; 10.7 mg/dL)

が認められた（総蛋白はまた、1000 ppm 群の雄においても統計学的有意差が認められた；7.3 g/dL）が、その値は当研究所における同系統での背景値（総蛋白；6.6～7.3 g/dL、グルコース；103～182 mg/dL、リン；6.6～11.8 mg/dL）と比較すると正常値域内にあることから、検体投与による影響とは考えられなかった。

2000 ppm 以上の群の雌にアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性の高値、4000 ppm 群の雌にアルカリ性ホスファターゼ活性のわずかな高値、また、500 ppm 以上の群の雌のトリグリセライドの低値が認められ、検体投与に関連した変化と考えられた。その他、雌では、他の多くの生化学的パラメーターにおいて、対照群と比較して高値（アラニンアミノトランスフェラーゼ；63 U/L、尿素窒素；17 mg/dL およびグルコース；121 mg/dL）あるいは低値（総蛋白；6.5～6.8 g/dL、アルブミン；3.3～3.6 g/dL、コレステロール；79～81 mg/dL、カルシウム；11.2 mg/dL 及びクロライド；101 mmol/L）が認められ、統計学的有意差が認められたが、当研究所における同系統での背景値（アラニンアミノトランスフェラーゼ；45～78 U/L、尿素窒素；15～18 mg/dL、グルコース；87～159 mg/dL、総蛋白；6.2～7.3 g/dL、アルブミン；3.2～3.7 g/dL、コレステロール；81～101 mg/dL、カルシウム；9.8～12.6 mg/dL、クロライド；98～112 mmol/L）と比較すると正常値域内にあるか非常に近い値であること、あるいは用量反応性がないこと（コレステロール）から、検体投与に関連したものとは考えられなかった。

（回復群）

投与期間中、1000 ppm 群の雄のアラニンアミノトランスフェラーゼ活性及び総蛋白は対照群より高値を示し、統計学的有意差が認められた。アラニンアミノトランスフェラーゼ活性の高値（70 U/L）はおそらく検体投与に関連したものであるが、当研究所における同系統での背景値（52～70 U/L）と比較すると正常値域内にあることから、毒性学的意義はないと考えられた。一方、総蛋白濃度の高値は検体投与に起因したものとは考えられなかった。回復期間終了後、アラニンアミノトランスフェラーゼ活性は、投与期間終了時とほぼ同程度にまで上昇（91 U/L）したままであり、回復性のないことが示された。しかし、対照群の動物では背景値の正常値（81 U/L）を下回る値（67 U/L）であり、一方、投与群ではそれより小さな程度で正常値を上回るのみであった。このことから、アラニンアミノトランスフェラーゼ活性のわずかな上昇に毒性学的意義はないと考えられた。回復期間後、1000 ppm 群の雄の総蛋白の値は対照群と同等であった。

投与期間中、1000 ppm 群の雌において、対照群と比較してトリグリセライド及

びアルブミンの低値が認められ、統計学的有意差が認められた。トリグリセライドの低値は検体投与に関連したものと考えられたが、アルブミンの低値は投与に起因したものとは考えられなかった。回復期間後、1000 ppm 群の雌のアルブミン及びトリグリセライドは対照群と同等であり、投与期間中に認められたトリグリセライドへの変化の回復性が示された。

甲状腺ホルモン分析；雄の対照群と高用量（2000 ppm）群及び雌の全群（いずれも主群のみ）を対象として、剖検時に全動物の眼窩静脈叢から血液を採取して得られた血清を用い、トリヨードサイロニン（ T_3 ）、テトラヨードサイロニン（ T_4 ）及び甲状腺刺激ホルモン（TSH）濃度を測定した。対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目及びあるいは検体投与に関連した変化が認められた項目を下表に示す。

性別	雌				
	120	500	1000	2000	4000
T_3 (ng/dL)				↓ 83*	↓ 81*
T_4 (ug/dL)		↓ 73*	↓ 67*	↓ 70*	94

* Dunnett 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の。

2000 ppm 群の雄の T_3 、 T_4 あるいは TSH に対照群と比較して、差は認められなかった。2000 あるいは 4000 ppm 群の雌では、対照群と比較して T_3 濃度の低値が認められた。用量反応性はなかったが、肝臓重量の増加及び病理組織学的検査における濾胞上皮細胞空胞化に伴って認められ、検体投与に関連した変化と考えられた。500、1000 あるいは 2000 ppm 群の雌では、対照群と比較して T_4 濃度の低値が認められ、統計学的有意差が認められたが、4000 ppm 群の雌では有意差は認められなかった。 T_4 濃度の測定については動物間での変動が大きいこと、変化の程度がわずかであること、及び高用量で変化のないことを考慮すると、この雌の T_4 濃度における変化の生物学的意義は明らかではなかった。しかし、匹敵する用量で CD ラットにおいて T_4 濃度の減少が起こったという事実、及び CD ラットと Fischer 344 ラットはスピネトラムの影響に同様の感受性を有するという仮説に基づいて、 T_4 濃度におけるこれらの変化は検体投与に関連したものと考えられた。また、TSH 濃度は対照群とスピネトラム投与群の雌の間で同様の値であった。

[申請者注]：甲状腺ホルモン分析では、雌の 4000 ppm 群で T_3 の低値及び T_4 の僅かな低値が認められた。 T_4 の変化は統計学的に有意差が認められず、用量反

応性を欠くものの、統計学的に有意な T_3 の低値が認められたこと、ならびに類似の投与量（高用量；150mg/kg/day）で行った CD 系ラットを用いた 90 日間混餌投与毒性試験（二世代繁殖性試験の用量設定試験）において投与の影響が疑われる T_4 の低下が雌において認められたことから、当該試験における T_4 の変化は投与に関連したものと考えられた。しかしながら、当該試験において濾胞上皮細胞のびまん性過形成は認められず、ラットの 2 年間混餌投与による慢性毒性発がん性試験においても濾胞上皮細胞の肥大や過形成に加え発がん性、さらに、投与期間の延長による甲状腺機能低下の増悪化を示唆するような変化も認められなかった。従って、これら甲状腺ホルモンの変動は、2000、1000 及び 500 ppm 群も含めて毒性学的意義の低い変化であると考えられた。

尿検査；剖検の前の週、非絶食の全動物（主群のみ）の尿を一晚採取し、以下の項目を検査した。また、膀胱を手で圧迫することにより、各動物から尿試料を採取し、各群から得られた尿試料をプールして沈査の顕微鏡検査を実施した。

色調、外観、比重（屈折計）及び尿量、pH、ビリルビン、糖、蛋白、ケトン体、潜血、ウロビリノーゲン

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。

性別	投与量 (ppm)	背景値*	雄				
			0	120	500	1000	2000
蛋白		+ (3)	++ (5)	++ (6)	++ (9)	++ (8)	++ (10) *
		++ (7)	+++ (5)	+++ (4)	+++ (1)	+++ (2)	+++ (0)
		+++ (0)					
		+ (7)					
		++ (3)					
		+++ (0)					
		+ (0)					
		++ (9)					
	+++ (1)						

* Fisher exact 検定 : $P < 0.05$

+ : 軽度、 ++ : 中等度、 +++ : 重度

° 当試験施設で実施され、2004年に報告された同様の3試験の背景値

性別	雌					
	0	120	500	1000	2000	4000
ビリルビン	-(8)	-(8)	-(5)	-(6)	-(4)	-(2)*
	+(2)	+(2)	+(5)	+(4)	+(6)	+(8)*

* Fisher exact 検定: $P < 0.05$

-: 陰性 +: 軽度

500 ppm 以上の群の雄では、尿蛋白の減少が認められた。しかし、背景値からは、尿蛋白量が極めて変動しやすいパラメーターであることが示されており、また、500 ppm 以上の群の雄で認められた蛋白尿の程度は当研究所における同系統での背景値と比較すると正常値域内であったことから、検体投与による影響とは考えられなかった。4000 ppm 群の雌では、統計学的に有意な尿中ビリルビンの増加が認められ、検体投与による影響と考えられた。

眼科学的検査；投与前（主群及び回復群）、及び剖検前（主群のみ）に、倒像検眼鏡により全動物の眼を検査した。

投与期間終了後の検査で、角膜混濁が最多で雄9例及び雌7例に観察されたが、これらの所見は対照群においても認められ、用量反応性もなかった。さらに、この所見に対応して顕微鏡検査により軽微な角膜の石灰化が認められ、Fischer 344 ラットによく認められる自然発生的変化と考えられた。その他に、散瞳不全、部分的眼瞼閉鎖、出血、眼底蒼白、あるいは眼周囲の汚れが 0~5 匹/性/用量で認められたが、用量反応性はなく、検体投与との関連性はないと考えられた。

臓器重量；主群を対象として、剖検時に以下の臓器重量を測定した。また、対体重比は剖検前に測定した絶食下における最終体重から算出した。

脳、肝臓、腎臓、心臓、副腎、精巣、精巣上体、子宮、卵巣、胸腺及び脾臓、甲状腺（上皮小体を含む）

また、回復群の動物については、主群の 1000 ppm 群のラットにおいて対照群と比較して統計学的有意差があると認められた雌の心臓、肝臓及び脾臓の重量を測定した。

（主群）

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)		120	500	1000		2000	120	500	1000		2000	4000
				主群	回復群				主群	回復群		
最終体重		↓ 93*				↓ 92*					↓ 95*	↓ 91*
脾臓	重量					↑ 134 [§]			↑ 122 [§]		↑ 184 [§]	↑ 190 [§]
	対体重比					↑ 146 [§]			↑ 127 [§]	↑ 110*	↑ 193 [§]	↑ 210 [§]
肝臓	重量										↑ 125 [§]	↑ 134 [§]
	対体重比					↑ 109*			↑ 113 [§]		↑ 131 [§]	↑ 148 [§]
甲状腺	重量										↑ 112*	
	対体重比					↑ 112*					↑ 119*	↑ 117*
腎臓	重量	↓ 94*	↓ 94*			↓ 93*					↑ 109*	↑ 113*
	対体重比										↑ 115*	↑ 124*
胸腺	重量					↓ 86*					↓ 85*	↓ 80*
	対体重比										↓ 90*	↓ 87*
心臓	重量										↑ 111*	↑ 112*
	対体重比					↑ 112*			↑ 109*		↑ 117*	↑ 123*
脳	対体重比					↑ 106*						↑ 110*
卵巣	重量										↑ 121*	↑ 119*
	対体重比										↑ 126*	↑ 131*

* Dunnett 検定、↑ ↓ : P < 0.05

§ Wilcoxon 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。
Bartlett 検定し、有意差を示さない場合には Dunnett 検定(パラメトリック分散解析)、有意差を示す場合には Wilcoxon 検定(ノンパラメトリック分散解析)を実施した。

2000 ppm 群の雄の最終体重は対照群より 7.9% 低く、検体投与に起因する変化と考えられた。2000 ppm 群の雄の臓器重量における主要な投与に関連した変化は脾臓の重量及び対体重比の高値と肝臓及び甲状腺重量の対体重比の高値であった。この用量の雄における、その他の統計学的に有意な臓器重量変化としては腎臓及び胸腺の重量の低値と心臓及び脳重量の対体重比の高値が認められたが、最終体重の低値による二次的なものと考えられた。

2000 あるいは 4000 ppm 群の雌の最終体重は対照群と比較して 5.1 あるいは 9.0% 低く、統計学的有意差が認められ、検体投与に関連したものと考えられた。

雌の臓器重量及び／あるいは対体重比における主要な投与に関連した高値は2000、4000 ppm 群の腎臓、肝臓、脾臓及び甲状腺で認められた。さらに、1000 ppm 群の雌でもまた、検体投与と関連性があると考えられた脾臓の重量及び対体重比、及び肝重量の対体重比の高値が認められた。これらの全ての臓器において、検体投与に関連した病理組織学的変化が観察された（病理組織学的検査の項目参照）。2000 あるいは 4000 ppm 群の雌では、心臓の重量及び対体重比の高値が認められた。これらの心重量の変化はいかなる組織学的変化も伴わなかったが、検体投与に関連したものと考えられた。1000 ppm 群の雌の心重量の対体重比のわずかな高値（0.362 g/100）は、当研究所における同系統の背景値（0.314～0.378 g/100）の範囲内であったことから、投与との関連性はないものと考えられた。その他、雌の臓器重量における変化として、2000、4000 ppm 群の胸腺の重量及び対体重比の低値、4000 ppm 群の脳重量の対体重比の高値などが認められたが、低体重による二次的なものと考えられた。また、卵巣の重量（2000 ppm 群；0.075 g、4000 ppm 群；0.074 g）及び対体重比（2000 ppm 群；0.044 g/100、4000 ppm 群；0.046 g/100）の高値が認められたが、当研究所における同系統の背景値（重量；0.054～0.077 g、対体重比；0.032～0.046 g/100）の範囲内であることから、検体投与とは関連性のないものと考えられた。

〈回復群〉

1000 ppm 群の雌の脾臓（重量及び対体重比）、肝臓（対体重比）及び心臓（対体重比）の重量は投与期間中、対照群より高値であった。回復期間終了時、1000 ppm 群の雌の脾臓重量の対体重比は対照群より高値であったが、一部回復性が示された。回復期間後、1000 ppm 群の雌の肝重量の対体重比は対照群と同等であり、完全な回復性が示された。また、心重量の対体重比は対照群と近い値で、統計学的有意差も認められず、回復性が示された。

肉眼的病理検査；主群の雄は試験の91日目、雌は92日目、回復群の動物は119日目にそれぞれ全動物について剖検を行った。

主群、回復群ともに認められた所見は自然発生的な変化であり、検体投与に関連のないものと考えられた。

病理組織学的検査；対照群及び高用量群の主群の動物から、以下の組織について病理標本を作製し、検鏡した。

副腎、大動脈、骨（関節を含む）、骨髄、脳（大脳、脳幹、小脳）、盲腸、子宮頸部、凝固腺、結腸、脳神経－視神経、十二指腸、精巣上体、食道、眼球、肉眼的病変部位、心臓、回腸、空腸、腎臓、涙腺／ハーダー腺、喉頭、肝臓、肺、乳腺（雌のみ）、縦隔リンパ節、縦隔組織、腸間膜リンパ節、腸間膜組織、鼻孔組織／咽頭、口腔組織、卵巣、卵管、脾臓、上皮小体、末梢神経－脛骨、下垂

体、前立腺、直腸、唾液腺、精囊、骨格筋、皮膚及び皮下組織、脊髄（頸部、胸部、腰部）、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、気管、膀胱、子宮、膈
低用量及び中間用量群の主群の全ての動物から、以下に示した肉眼的病変部位及び全ての組織について標本を作製した。雄については低用量及び中間用量群の組織を順次、NOELが決定されるまで、雌については全ての投与群の組織を検査した。

雄—回腸、空腸、腎臓、喉頭、肝臓、肺、縦隔リンパ節、腸間膜リンパ節、脾臓、胸腺、骨髄（胸骨）、心臓、腸間膜組織、骨格筋（喉頭）及び甲状腺、雌—肝臓、腎臓、脾臓、腸間膜及び縦隔リンパ節、腸間膜組織、胸腺、骨格筋（後肢、喉頭及び脊柱）、子宮、回腸、空腸、肺、甲状腺、骨髄（胸骨）
回復群については、投与期間終了時に投与に関連した影響があると判定された組織、すなわち、雄—回腸、空腸、腎臓、喉頭（骨格筋）、肝臓、縦隔リンパ節、腸間膜リンパ節、脾臓、胸腺及び甲状腺、雌—回腸、空腸、腎臓、肝臓、縦隔リンパ節、腸間膜リンパ節、脾臓、胸腺、骨髄及び甲状腺について検査した。

（主群）

脾臓、リンパ節、空腸あるいは回腸のバイエル板、胸腺などのリンパ系組織、肝臓及び骨髄にマクロファージ／組織球の集簇が認められた。実質細胞の空胞化が甲状腺及び腎臓（雌のみ）に、骨格筋の変性が複数の筋肉に、硝子滴の減少が雄の腎尿細管に認められた。以下に個々の病変について詳しく記載する。
縦隔リンパ節：1000、2000あるいは4000 ppm群の雌雄において、マクロファージ／組織球の軽微な多発性の集簇の頻度増加が認められた。また、2000 ppm群の雌2例及び4000 ppm群の雌1例でも、マクロファージ／組織球の軽度の集簇が認められた。

腸間膜リンパ節：1000あるいは2000 ppm群の雄及び500 ppm以上の群の雌において、マクロファージ／組織球の集簇の頻度増加が認められた。軽度の多発性の集簇が1000あるいは2000 ppm群の雄及び500、1000あるいは2000 ppm群の雌で認められ、一方、中等度の頻度増加は2000 ppm群の雄2例及び1000、2000あるいは4000 ppm群の雌でそれぞれ4、8及び10例認められた。

脾臓：1000あるいは2000 ppm群の雄及び500 ppm以上の群の雌において、マクロファージ／組織球の限局性あるいは多発性の集簇が認められた。これらの程度は主として、軽微であったが、1000 ppm群の雄1例、2000 ppm群の雄4例、1000 ppm群の雌2例、2000 ppm群の雌5例及び4000 ppm群の雌4例においては、軽度の集簇が認められ、2000 ppm群の雌3例及び4000 ppm群の雌3例では中等度であった。

胸腺：1000 ppm以上の群の雌雄において、マクロファージ／組織球の軽微あるいは軽度（雌のみ）の多発性の集簇が認められた。

骨髓：2000 ppm 群の少数の雄及び500 ppm 以上の群の雌において、マクロファージ／組織球の軽微あるいは軽度（雌のみ）の多発性の集簇が用量に依存して観察された。これらの集簇は後肢、胸骨及び／あるいは脊椎に認められた。

空腸及び回腸：1000 ppm 以上の群の少数の雄の空腸あるいは回腸のパイエル板に、マクロファージ／組織球の軽微な、限局性あるいは多発性の集簇が認められた。1000 ppm 以上の群の雌では、回腸及び空腸のパイエル板及び／あるいは固有層に、マクロファージ／組織球の多発性の集簇が認められた。さらに、500 ppm 群の雌2例の空腸のパイエル板にマクロファージの集簇が観察された。これらのマクロファージ／組織球の集簇の程度は軽微あるいは軽度であった。また、2000 あるいは4000 ppm 群の雌の空腸及び回腸の粘膜で、固有層におけるマクロファージの空胞化が観察された。空腸における空胞化の程度は軽微、軽度あるいは中等度で、2000 あるいは4000 ppm 群の雌の大半に認められた。一方、回腸における空胞化の程度は軽微で、2000 あるいは4000 ppm 群の雌のそれぞれ3例及び5例に認められた。

肝臓：2000 ppm 群の雄、500 ppm 以上の雌において、マクロファージ／組織球の多発性の集簇が認められた。雌では、これらの集簇の程度は主に、軽度であったが、1000 ppm 群の雌1例及び2000 ppm 群の雌2例では中等度の蓄積が認められた。更に、2000 ppm 群の雄では軽微な多核肝細胞が認められた。

腎臓：空胞化が雌の腎尿細管上皮で認められた。その程度は軽微あるいは軽度であり、主に近位曲尿細管において、500 ppm 以上の群の雌の大半に認められた。また、2000 ppm 群の雄全例及び1000 ppm 群の雄5例に、硝子滴の減少が認められた。

[申請者注] 腎臓における硝子滴減少の原因としては、タンパク合成低下に伴う、糸球体濾過物中のタンパク量の二次的な減少が考えられる。雄ラットでは、硝子滴は α -2U-グロブリンと関係して認められるのが通例である。肝臓による α -2U-グロブリン産生が低下した理由としては、①テストステロン濃度の低下及び／もしくはエストロゲン濃度の上昇、②体重増加量が低値を示した時期における α -2U-グロブリン産生の低下、が考えられる。①のホルモンの不均衡については、本試験で生殖器系器官／組織に影響が認められなかったことから可能性は極めて低いと考えられる。可能性があるのは体重あるいは体重増加量の低値による二次的な影響とするものである。結論として、硝子滴が減少した明確な理由は不明であるが、体重増加量の低値と関係したタンパク合成のわずかな変化に起因する可能性が最も高く、毒性学的意義はないと考えられた。毒性学的意義がない理由は、同90日間の試験においてスピネトラム投与によると考えられる性ホルモンの変動を示唆する変化が認められていないこと、ALT(1000、2000

ppm) 及びAST (2000 ppm) に増加が認められ、何らかの肝毒性の可能性が示唆されたが、肝細胞の明確な変性や壊死と結びつくものではなかったこと、加えて、同慢性毒性発がん性試験で、500 ppm 及び 700 ppm 投与群で、体重は統計学的に有意に低値であったにもかかわらず硝子滴の減少が認められなかったためである。

甲状腺：空胞化が雌雄の濾胞上皮細胞で認められた。その程度は軽微あるいは軽度であり、1000 あるいは 2000 ppm 群の雄及び 500 ppm 以上の群の雌の大半で認められた。また、濾胞のコロイド枯渇（減少）が、2000 ppm 群の雄 5 例及び 1000、2000 あるいは 4000 ppm 群の雌でそれぞれ 4、4 及び 3 例で染色性の変化を伴って認められた。骨格筋：筋線維の変性が検査した筋肉（腰部（背中）、頭部、後肢及び喉頭）の 1000 ppm 以上の群の雌雄で生じた。また、マクロファージがこれらの部位及び正常に見える筋線維に隣接して認められた。これらの変性／炎症性変化は、観察された部位に関係なく、その分布は限局性あるいは多発性で、程度は軽微であった。

主群雄

性別		雄				
投与量 (ppm)		0	120	500	1000	2000
縦隔 リンパ節	所見/検査動物数	10	10	9	10	10
	マクロファージ - 組織球の集簇、限局性、軽微	2	4	2	<u>6</u>	<u>2</u>
	マクロファージ - 組織球の集簇、多発性、軽微	0	1	2	1	<u>8</u>
腸間膜 リンパ節	所見/検査動物数	9	10	10	10	10
	マクロファージ - 組織球の集簇、限局性、軽微	2	3	2	1	0
	マクロファージ - 組織球の集簇、多発性、軽微	3	2	5	<u>6</u>	0
	マクロファージ - 組織球の集簇、多発性、軽度	0	0	0	<u>2</u>	<u>8</u>
	マクロファージ - 組織球の集簇、多発性、中等度	0	0	0	0	<u>2</u>
脾臓	所見/検査動物数	10	10	10	10	10
	マクロファージ - 組織球の集簇、限局性、軽微	2	3	2	4	0
	マクロファージ - 組織球の集簇、多発性、軽微	4	3	5	5	<u>6</u>
	マクロファージ - 組織球の集簇、多発性、軽度	0	0	0	<u>1</u>	<u>4</u>
胸腺	所見/検査動物数	10	10	10	10	10
	マクロファージ - 組織球の集簇、限局性、軽微	3	0	1	3	3
	マクロファージ - 組織球の集簇、多発性、軽微	0	0	0	<u>2</u>	<u>5</u>
骨髄	所見/検査動物数	10	0	0	10	10
	マクロファージ - 組織球の集簇、後肢、限局性、軽微	0	-	-	0	<u>1</u>
	マクロファージ - 組織球の集簇、後肢、多発性、軽微	0	-	-	0	<u>4</u>
	マクロファージ - 組織球の集簇、胸骨、限局性、軽微	0	-	-	0	<u>2</u>
空腸	所見/検査動物数	9	10	10	10	10
	マクロファージ - 組織球の集簇、パイル板、限局性、軽微	0	0	1	<u>3</u>	<u>3</u>
	マクロファージ - 組織球の集簇、パイル板、多発性、軽微	0	0	0	0	<u>3</u>
回腸	所見/検査動物数	9	10	10	10	10
	マクロファージ - 組織球の集簇、パイル板、限局性、軽微	0	0	1	0	0
	マクロファージ - 組織球の集簇、パイル板、多発性、軽微	0	0	0	<u>3</u>	<u>2</u>
肝臓	所見/検査動物数	10	10	10	10	10
	マクロファージ - 組織球の集簇、多発性、軽微	0	0	0	0	<u>4</u>
	マクロファージ - 組織球の集簇、多発性、軽度	0	0	0	0	<u>3</u>
	多核肝細胞、多発性、軽微	0	0	0	0	<u>8</u>

主群雄 (続き)

性別		雄				
投与量 (ppm)		0	120	500	1000	2000
腎臓	所見/検査動物数	10	0	10	10	10
	硝子滴形成、減少、近位尿細管、軽度	2	-	1	<u>4</u>	<u>4</u>
	中等度	0	-	0	<u>1</u>	<u>6</u>
甲状腺	所見/検査動物数	10	10	10	10	10
	空胞化、濾胞、上皮細胞、軽微	0	0	0	<u>5</u>	<u>3</u>
	空胞化、濾胞、上皮細胞、軽度	0	0	0	<u>1</u>	<u>6</u>
	枯渇、染色性変化を伴う、コリド、軽微	0	0	0	<u>1</u>	<u>5</u>
骨格筋	所見/検査動物数	10	0	0	10	10
	変性、筋線維、背中、限局性、軽微	0	-	-	0	<u>1</u>
	変性、筋線維、頭部、多発性、軽微	0	-	-	0	<u>1</u>
	変性、筋線維、喉頭、限局性、軽微	0	-	-	<u>1</u>	<u>1</u>
	変性、筋線維、喉頭、多発性、軽微	0	-	-	0	<u>1</u>

太字は投与と関連性があると考えられた値

- : 検査実施なし

主群雌

性別		雌					
投与量 (ppm)		0	120	500	1000	2000	4000
縦隔 リンパ節	所見/検査動物数	10	10	9	9	10	10
	マクロファージ-組織球の集簇、限局性、軽微	3	0	2	2	0	1
	マクロファージ-組織球の集簇、多発性、軽微	2	0	1	<u>5</u>	<u>8</u>	<u>8</u>
	マクロファージ-組織球の集簇、多発性、軽度	0	0	0	0	<u>2</u>	<u>1</u>
腸間膜 リンパ節	所見/検査動物数	10	10	10	10	10	10
	マクロファージ-組織球の集簇、限局性、軽微	2	3	1	0	0	0
	マクロファージ-組織球の集簇、多発性、軽度	0	0	<u>6</u>	<u>6</u>	<u>2</u>	<u>0</u>
	マクロファージ-組織球の集簇、多発性、中等度	0	0	0	<u>4</u>	<u>8</u>	<u>10</u>
脾臓	所見/検査動物数	10	10	10	10	10	10
	マクロファージ-組織球の集簇、限局性、軽微	0	0	<u>3</u>	0	0	0
	マクロファージ-組織球の集簇、多発性、軽微	1	2	<u>4</u>	<u>8</u>	<u>2</u>	<u>3</u>
	マクロファージ-組織球の集簇、多発性、軽度	0	0	0	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>4</u>
	マクロファージ-組織球の集簇、多発性、中等度	0	0	0	0	<u>3</u>	<u>3</u>
胸腺	所見/検査動物数	10	10	10	10	10	10
	マクロファージ-組織球の集簇、多発性、軽微	0	0	0	<u>8</u>	<u>3</u>	<u>3</u>
	マクロファージ-組織球の集簇、多発性、軽度	0	0	0	0	<u>7</u>	<u>7</u>
骨髄	所見/検査動物数	10	10	10	10	10	10
	マクロファージ-組織球の集簇、後肢、限局性、軽微	1	0	0	1	0	0
	マクロファージ-組織球の集簇、後肢、多発性、軽微	0	0	<u>3</u>	<u>6</u>	<u>5</u>	<u>4</u>
	マクロファージ-組織球の集簇、後肢、多発性、軽度	0	0	0	<u>1</u>	<u>4</u>	<u>6</u>
	マクロファージ-組織球の集簇、胸骨、限局性、軽微	1	2	0	0	0	0
	マクロファージ-組織球の集簇、胸骨、多発性、軽微	0	0	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>9</u>	<u>8</u>
	マクロファージ-組織球の集簇、胸骨、多発性、軽度	0	0	0	<u>2</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	マクロファージ-組織球の集簇、脊椎、限局性、軽微	0	0	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>1</u>
マクロファージ-組織球の集簇、脊椎、多発性、軽微	0	0	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>3</u>	<u>6</u>	

主群雌（続き）

性別		雌					
投与量 (ppm)		0	120	500	1000	2000	4000
空腸	所見/検査動物数	10	10	10	10	10	10
	マクロファージ-組織球の集簇、固有層、多発性、軽微	0	0	0	0	<u>2</u>	0
	マクロファージ-組織球の集簇、筋層、限局性、軽微	0	0	0	<u>1</u>	0	0
	マクロファージ-組織球の集簇、筋層、多発性、軽微	0	0	0	0	<u>1</u>	0
	マクロファージ-組織球の集簇、パイル板、限局性、軽微	0	0	3	0	0	1
	マクロファージ-組織球の集簇、パイル板、多発性、軽微	0	0	<u>2</u>	<u>7</u>	<u>4</u>	<u>3</u>
	空胞化、マクロファージ、固有層、軽微	0	0	0	0	<u>7</u>	<u>3</u>
	空胞化、マクロファージ、固有層、軽度	0	0	0	0	0	<u>6</u>
	空胞化、マクロファージ、固有層、中等度	0	0	0	0	0	<u>1</u>
回腸	所見/検査動物数	10	10	10	10	10	10
	マクロファージ-組織球の集簇、パイル板、限局性、軽微	1	0	0	1	0	1
	マクロファージ-組織球の集簇、パイル板、多発性、軽微	0	0	0	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>5</u>
	マクロファージ-組織球の集簇、パイル板、多発性、軽度	0	0	0	0	<u>1</u>	0
	空胞化、マクロファージ、粘膜、固有層、軽微	0	0	0	0	<u>3</u>	<u>5</u>
	マクロファージ-組織球の集簇、固有層、限局性、軽微	0	0	0	0	<u>3</u>	<u>1</u>
	マクロファージ-組織球の集簇、固有層、多発性、軽微	0	0	0	<u>1</u>	0	0
肝臓	所見/検査動物数	10	10	10	10	10	10
	マクロファージ-組織球の集簇、限局性、軽微	0	3	1	0	0	0
	マクロファージ-組織球の集簇、多発性、軽微	4	5	6	2	0	1
	マクロファージ-組織球の集簇、多発性、軽度	0	0	<u>1</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>
	マクロファージ-組織球の集簇、多発性、中等度	0	0	0	<u>1</u>	<u>2</u>	0
腎臓	所見/検査動物数	10	10	10	10	10	10
	空胞化、尿細管、軽微	2	0	<u>8</u>	<u>10</u>	<u>4</u>	2
	空胞化、尿細管、軽度	0	0	0	0	<u>6</u>	<u>8</u>

主群雌（続き）

性別		雌					
投与量 (ppm)		0	120	500	1000	2000	4000
甲状腺	所見/検査動物数	10	10	10	10	10	10
	空胞化、濾胞、上皮細胞、軽微	0	0	<u>8</u>	<u>3</u>	0	0
	空胞化、濾胞、上皮細胞、軽度	0	0	0	<u>7</u>	<u>10</u>	<u>10</u>
	枯渇、染色性変化を伴う、コリド、軽微	0	0	0	<u>4</u>	<u>4</u>	<u>3</u>
骨格筋	所見/検査動物数	10	10	10	10	10	10
	変性、筋線維、背中、限局性、軽微	0	0	0	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	変性、筋線維、背中、多発性、軽微	0	0	0	0	0	<u>1</u>
	変性、筋線維、頭部、多発性、軽微	0	0	0	0	<u>5</u>	<u>3</u>
	変性、筋線維、後肢、多発性、軽微	0	0	0	0	0	<u>1</u>
	変性、筋線維、喉頭、限局性、軽微	0	0	0	0	0	<u>2</u>
	変性、筋線維、喉頭、多発性、軽微	0	0	0	0	<u>3</u>	<u>5</u>
	マクロファージ-組織球の集簇、背中、限局性、軽微	0	1	0	0	1	1
	マクロファージ-組織球の集簇、背中、多発性、軽微	0	0	0	0	0	<u>2</u>
	マクロファージ-組織球の集簇、頭部、多発性、軽微	0	0	0	0	0	<u>2</u>
	マクロファージ-組織球の集簇、後肢、多発性、軽微	0	0	0	0	0	<u>1</u>
マクロファージ-組織球の集簇、喉頭、多発性、軽微	0	0	0	0	<u>3</u>	<u>8</u>	

太字は投与と関連性があると考えられた値

〈回復群〉

縦隔及び腸間膜リンパ節でマクロファージ-組織球の集簇が認められた。リンパ節では、この変化の発現頻度は投与終了時に比べて軽減し、いくらか影響の回復性が示された。同様に、1000 ppm 群の雄 2 例の腎臓で硝子滴形成の減少が、5 例に甲状腺濾胞上皮の軽微な空胞化が認められたが、これらについても投与期間終了時より軽減していた。

休業により、投与期間終了時に 1000 ppm 群の雌の脾臓、腎臓、骨格筋及び胸腺で認められた影響は完全に消失した投与期間終了時と同様の変化が 1000 ppm 群の雌の骨髄、回腸、空腸、肝臓、縦隔リンパ節、腸間膜リンパ節及び甲状腺で様々な頻度で認められ、このうち雌の脾臓、縦隔リンパ節、空腸、回腸、肝臓及び甲状腺で観察された変化の頻度及び/あるいは程度は回復期間中に減少し、一部回復性が示された。1000 ppm 群の雌の腸間膜リンパ節におけるマクロファージ-組織球の集簇は、投与期間中と同等であり、回復性がないことが示された。

1000 ppm 群の雌の大半において、肝小葉の門脈周囲領域においてリポフスチンを含有しているように見えるマクロファージ-組織球の多発性の軽微な集簇が認められた。当該色素は、シュモール染色およびパール育染色に陽性を示したが、パール育染色に陽性

を示すものが多く認められたことから、当該色素にはリポフスチンを含むものの、多くは鉄色素であることが明らかとなった。この色素の発生は、おそらく、活性化マクロファージによる細胞膜の正常な処理を示しており、実際に、回復の進行を示すものであると考えられた。

回復群

性別		雄		雌	
投与量 (ppm)		0	1000	0	1000
脾臓	所見/検査動物数	10	10	10	10
	マクロファージ-組織球の集簇、限局性、軽微	1	4	1	3
	マクロファージ-組織球の集簇、多発性、軽微	8	6	6	7
縦隔リンパ節	所見/検査動物数	10	10	10	10
	マクロファージ-組織球の集簇、限局性、軽微	2	5	1	0
	マクロファージ-組織球の集簇、多発性、軽微	0	3	3	7
腸間膜リンパ節	所見/検査動物数	10	10	10	10
	マクロファージ-組織球の集簇、多発性、軽微	9	6	9	0
	マクロファージ-組織球の集簇、多発性、軽度	1	4	0	6
	マクロファージ-組織球の集簇、多発性、中等度	0	0	0	4
空腸	所見/検査動物数	10	10	10	10
	マクロファージ-組織球の集簇、パイル板、限局性、軽微	0	0	0	2
	マクロファージ-組織球の集簇、パイル板、多発性、軽微	1	0	0	2
回腸	所見/検査動物数	10	9	10	10
	マクロファージ-組織球の集簇、パイル板、限局性、軽微	0	0	2	3
	マクロファージ-組織球の集簇、パイル板、多発性、軽微	0	0	0	3
	マクロファージ-組織球の集簇、固有層、限局性、軽微	0	0	0	1
骨髄	所見/検査動物数	0	0	10	10
	マクロファージ-組織球の集簇、後肢、多発性、軽微	—	—	0	4
	マクロファージ-組織球の集簇、胸骨、限局性、軽微	—	—	1	5
肝臓	所見/検査動物数	10	10	10	10
	マクロファージ-組織球の集簇、多発性、軽微	0	0	2	6
	マクロファージ-組織球の集簇、リポフスチン、門脈周囲、多発性、軽微	0	0	0	6
腎臓	所見/検査動物数	10	10	10	10
	硝子滴形成、減少；近位尿管	0	2	0	0
甲状腺	所見/検査動物数	10	10	10	10
	空胞化、濾胞、上皮細胞、軽微	1	5	0	8

太字は投与と関連性があると考えられた値 - : 検査実施なし

電子顕微鏡的検査: 90 日間の投与期間終了後、0 ppm 群の雌 5 例、2000 ppm 群の雌 3 例、4000 ppm 群の雌 2 例の腎臓 (皮質) を電子顕微鏡により検査した。

2000 ppm 群の雌では、電子密度の低い不定形物質及び稀に渦巻き状の膜構造を含む、不均一なリソソームを含む尿細管上皮細胞が認められた。4000 ppm 群の雌では尿細管上皮細胞内に不定形物質あるいは膜の渦を含有する空胞の存在が示された。これらの影響は陽イオン性両親媒性薬物として知られている薬剤を投与した動物で観察されるものと一致しており、本剤が陽イオン性両親媒性化合物であることを確定するものであった。

以上の結果、投与に関連した影響を下表に要約する。

投与量 (ppm)	120	500	1000	2000	4000
体重及び/あるいは体重増加量	-	-	-	↓ MF	↓ F
摂餌量	-	-	-	↓ M	↓ F
血色素量、 ヘマトクリット値、MCV 及び MCHC	-	-	↓ F	↓ F	↓ F
MCHC	-	-	-	-	↓ F
網状赤血球	-	-	↑ F	↑ F	↑ F
WBC 数	-	-	↑ F	↑ F	↑ F
アミノトランスフェラーゼ 活性	-	-	-	↑ M	-
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ 活性	-	-	-	↑ MF	↑ F
アルカリ性ホスファターゼ 活性	-	-	-	-	↑ F
トリグリセリド	-	↓ F	↓ F	↓ F	↓ F
トリヨードサイロニン (T ₃)	-	-	-	↓ F	↓ F
テトラヨードサイロニン (T ₄)	-	↓ F	↓ F	↓ F	↓ F
尿ビリルビン	-	-	-	-	↑ F
脾臓重量及び対体重比	-	-	↑ F	↑ MF	↑ F
肝臓	重量	-	-	↑ F	↑ F
	対体重比	-	-	↑ MF	↑ F
心臓	重量	-	-	↑ F	↑ F
	対体重比	-	-	↑ MF	↑ F
腎臓	重量	-	-	↓ M ↑ F	↑ F
	対体重比	-	-	↑ F	↑ F
脳重量の対体重比	-	-	-	↑ M	↑ F
胸腺重量及び対体重比	-	-	-	↓ MF	↓ F

投与量 (ppm)	120	500	1000	2000	4000
甲状腺重量の対体重比	-	-	-	↑MF	↑F
リパ ^o 節-縦隔、組織球の集簇、限局性あるいは多発性、軽微あるいは軽度	-	-	↑MF	↑MF	↑F
リパ ^o 節-腸間膜、組織球の集簇、多発性、全ての程度	-	↑F	↑MF	↑MF	↑F
脾臓、組織球の集簇、限局性あるいは多発性、全ての程度	-	↑F	↑MF	↑MF	↑F
胸腺、組織球の集簇、多発性、軽微あるいは軽度	-	-	↑MF	↑MF	↑F
骨髄、組織球の集簇、多発性、軽微あるいは軽度	-	↑F	↑F	↑MF	↑F
空腸、組織球の集簇、固有層、限局性あるいは多発性、軽微あるいは軽度	-	-	-	↑F	-
空腸、組織球の集簇、筋層、限局性あるいは多発性、軽微あるいは軽度	-	-	↑F	↑F	-
空腸、組織球の集簇、ハ ^o イ ^o 板、限局性あるいは多発性、軽微あるいは軽度	-	↑F	↑MF	↑MF	↑F
空腸、空胞化、マ ^o フ ^o ジ、固有層、軽微、軽度あるいは中等度	-	-	-	↑F	↑F
回腸、組織球の集簇、ハ ^o イ ^o 板、多発性、軽微あるいは軽度	-	-	↑MF	↑MF	↑F
回腸、空胞化、マ ^o フ ^o ジ、固有層、軽微、軽度あるいは中等度	-	-	-	↑F	↑F
回腸、組織球の集簇、固有層、多発性、軽微あるいは軽度	-	-	↑F	↑F	↑F
肝臓-組織球の集簇、全ての程度	-	↑F	↑F	↑MF	↑F
腎臓、空胞化、尿細管、軽微あるいは軽度	-	↑F	↑F	↑F	↑F
腎臓、硝子滴形成、減少、近位曲尿細管	-	-	↑M	↑M	-
甲状腺、空胞化、濾胞、上皮細胞、軽微あるいは軽度	-	↑F	↑MF	↑MF	↑F
甲状腺、枯渇、染色性変化を伴う、コ ^o ト、軽微	-	-	↑F	↑MF	↑F
骨格筋、変性、筋線維、複数部位、限局性あるいは多発性、軽微	-	-	↑F	↑MF	↑F
骨格筋、マ ^o フ ^o ジ-組織球の集簇、複数部位、限局性あるいは多発性、軽微	-	-	-	↑F	↑F
電子顕微鏡的検査、腎臓-綿状の不定形物質及び/あるいは渦巻き状の膜構造を含有する空胞	-	-	-	↑F	↑F
NOEL	F	M	-	-	-

対照群との比較による頻度あるいは程度の増加↑あるいは減少↓

M:雄、F:雌

2000 ppm 群の雄、及び 2000 あるいは 4000 ppm 群の雌では、投与期間終了時に体重及び/あるいは体重増加量の低値が認められた。また、2000 ppm 群の雄及び 4000 ppm 群の雌の摂餌量は対照群より低値であった。1000、2000 あるいは 4000 ppm 群の雌では、赤血球パラメーター（血色素量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量及び平均赤血球血色素濃度）の低値及び網状赤血球数の高値が認められた。また、1000 ppm 以上の群の雌の白血球数は対照群より高値であった。2000 ppm 群の雄及び 2000 ppm 以上の群の雌では、肝酵素の高値（アラニンアミノトランスフェラーゼ-雄；アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ-雌雄）が認められた。500 ppm 以上の群の雌のトリグリセライドは対照群より低値であった。4000 ppm 群の雌ではまた、アルカリ性ホスファターゼ活性のわずかな高値及び軽度な尿中ビリルビンの増加が認められた。対照群と比較して、2000 あるいは 4000 ppm 群の雌ではトリヨードサイロニンの低値、500、1000、2000 あるいは 4000 ppm 群の雌ではテトラヨードサイロニンの低値が、肝重量の増加 (≥ 1000 ppm) および甲状腺濾胞上皮の軽度の空胞化 (≥ 500 ppm) と同時に認められた。また、コロイド量の減少が 1000 ppm 以上の群の雌において観察された。

臓器重量における主要な投与に関連した増加は 2000 ppm 群の雄及び 2000 あるいは 4000 ppm 群の雌の甲状腺、脾臓及び肝臓で認められた。また、1000 ppm 群の雌の脾臓重量及び肝重量の対体重比は対照群より高値であった。また、2000 ppm 群の雄及び 2000 あるいは 4000 ppm 群の雌で認められた他の臓器（腎臓、胸腺、心臓及び脳）の重量における増加あるいは減少はこれらのラットの低体重に起因したものであった。投与に関連した影響としてマクロファージ/組織球の集簇が、脾臓、リンパ節、空腸あるいは回腸のパイエル板、胸腺などの多くのリンパ系組織、肝臓及び骨髄に認められた。実質細胞の空胞化が甲状腺及び腎臓（雌のみ）に生じ、また、骨格筋の変性が複数の筋肉に認められた。硝子滴の減少が雄の腎尿細管において認められた。雌では甲状腺、脾臓、骨髄、空腸、肝臓、腎臓、腸間膜及び縦隔リンパ節で雄より低濃度で影響があり、雌での影響は雄より強いものであった。腎臓の電子顕微鏡的検査により、4000 ppm 群の雌の尿細管上皮細胞内に空胞が認められ、多くの空胞は綿状物質あるいは渦巻き状の膜構造を含有することが示された。検体により誘発された影響の回復性については、完全な回復が、トリグリセライドの低値、肝臓及び心重量の対体重比の高値、および回腸（雄）、空腸（雄）、腎臓（雌）、肝臓（雄）、脾臓（雄）、骨格筋および胸腺における顕微鏡的变化などに認められた。また、一部回復が脾臓重量の対体重比、腎臓（雄）、脾臓（雌）、腸間膜及び縦隔リンパ節、空腸（雌）、回腸（雌）、肝臓（雌）及び甲状腺における組織学的変化に認められた。1000 ppm 群の雄で認められたアラニンアミノトランスフェラーゼ活性における上昇の回復性は認められなかった。

下表に回復期間中も持続した顕著な投与に関連した影響を示す。

投与量 (ppm)	1000
アミンミトランスフェラーゼ 活性	↑ M
脾臓重量の対体重比	↑ F
脾臓、マクロファージ - 組織球の集簇、多発性、軽微	↑ F
リンパ節 - 縦隔、マクロファージ - 組織球の集簇、多発性、軽微	↑ MF
リンパ節、腸間膜、マクロファージ - 組織球の集簇、多発性、軽度あるいは中等度	↑ MF
空腸、マクロファージ - 組織球の集簇、ハイル板、限局性あるいは多発性、軽微	↑ F
回腸、マクロファージ - 組織球の集簇、ハイル板、多発性、軽微	↑ F
回腸、マクロファージ - 組織球の集簇、固有層、多発性、軽微	↑ F
硝子滴形成、減少；近位尿細管	↑ M
肝臓、マクロファージ - 組織球の集簇、リポアシン、門脈周囲、多発性、軽微	↑ F
甲状腺、空胞化、濾胞、上皮細胞、軽微	↑ MF

M：雄、F：雌

以上の結果から、本剤のラット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における影響は、1000 ppm 以上の投与群の雄及び 500 ppm 以上の投与群の雌において認められたので、本試験における無影響量 (NOEL) は雄で 500 ppm (34.7 mg/kg/day)、雌で 120 ppm (10.1 mg/kg/day) と判断される。

申請者注：報告書中には無毒性量 (NOAEL) について記載していないが、雄においては 1000ppm 以上の投与群、雌においては 500ppm 以上の投与群で骨格筋の変性あるいは肝臓への毒性影響が認められたことから、無毒性量は雄 500 ppm (34.7 mg/kg/day)、雌 120ppm (10.1 mg/kg/day) であると判断した。

(2)スピネトラム原体のイヌ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 5-2)

試験機関: The Dow Chemical Company

[GLP 対応]

報告書作成年: 2005 年

検体純度:

供試動物: ビーグル犬、1 群雌雄各 4 匹、開始時約 6 ヶ月齢

投与期間: 92 日間 (雄: 2004 年 10 月 19 日~2005 年 1 月 18 日、雌: 2004 年 10 月 20 日~2005 年 1 月 19 日)

投与方法: 検体を 0、150、300 及び 900 ppm の濃度で飼料に混入し、90 日間にわたって自由に摂食させた。検体を混入した飼料は 2 週間に 1 回調製した。

観察・検査項目及び結果:

一般状態及び死亡率; 一般状態をケージ外から 1 日 2 回観察した。また、詳細な臨床観察 (DCO) を投与開始前、及び試験期間中は週 1 回実施した。

試験期間中、死亡は認められなかった。900 ppm 群の雄 1 例では、痩せ (64~92 日目)、円背位 (71 日目)、自発運動減少 (71 日目)、反応性減少 (71 日目)、無便 (71 日目) 及び尿による会陰部の汚れ (64~71 日目、92 日目) が認められた。300 ppm 群の雌 1 例では、円背位 (43 日目)、自発運動減少 (43 日目) 及び無便 (44 日目) が認められた。この 2 例の臨床所見は投与に関連したものと考えられた。他の動物に検体投与に関連した所見は認められなかった。

体重変化; 投与開始前及び試験期間中は週 1 回全ての動物の体重を測定した。また、体重増加量を算出した。

試験期間中、いずれの投与群においても統計学的に有意な体重の変化は認められなかった。しかしながら、300及び900 ppm群の雄、900 ppm群の雌では、試験期間の大半において、投与に関連した平均体重及び体重増加量の低値が認められた。

摂餌量；全動物の摂餌量を投与開始前とその後は少なくとも週1回測定した。
検体投与に関連のある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)		150	300	900
検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	5.73	9.82	27.1
	雌	4.97	10.2	31.0

血液学的検査；投与開始前、投与後42日目及び90日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。また、血液塗抹標本を作製し、顕微鏡検査を行った。

ヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数、白血球数、白血球分類、血小板数、網状赤血球数、平均赤血球色素量 (MCH)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球色素濃度 (MCHC)、プロトロンビン時間

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目及び、あるいは検体投与に関連した変化が認められた項目を下表に示す。

性別	雄				雌					
	150	300		900		150	300		900	
検査時期 (日)		42	90	42	90		42	90	42	90
白血球数		79	75	77	69				68	
赤血球数				90	82				86	93
ヘモグロビン量				↓89	↓79				↓81	↓85
ヘマトクリット値				90	82				84	90
血小板数		59	75	72	77				49	67
網状赤血球数				125	136			145	109	206
MCH					97					91
MCHC					97					94
大型非染色性細胞		280	250	380	↑433				300	↑257
単球*										131

性別	雄						雌					
	150		300		900		150		300		900	
投与量 (ppm)												
検査時期 (日)	42	90	42	90	42	90	42	90	42	90	42	90
好酸球 ^a	59	88	56	112	48	68	90	96	62	96	76	52

線形対比検定

投与期間中を通して雌雄を合わせて Bonferroni 補正した線形対比により時間-用量交互作用を解析。

↑↓ : P < 0.02

^a : 統計解析実施せず

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。

900 ppm 群の雌雄において、統計検定では有意差なヘモグロビン量の低値（雌雄を合わせて統計検定）が認められた。その他、白血球数、赤血球数、ヘマトクリット値、血小板数及び好酸球の百分率の減少、網状赤血球数及び大型非染色性細胞の百分率の増加が認められた。また、MCH および MCHC の軽微な低下も認められた。

さらに 900 ppm 群の雌では単球の百分率の高値が認められた。

300 ppm 群において、雄で白血球数及び血小板数の減少、大型非染色性細胞の百分率の増加が認められ、雌で網状赤血球数の増加が認められた。また、雌雄において、42 日目に好酸球の百分率の減少が認められた。

150ppm 群においては、特記すべき変化は認められなかった。

尚、血液塗抹標本の顕微鏡検査では、300 あるいは 900 ppm 群の動物の一部に軽微な赤血球の低色素性及び多染性が認められた（下表）。

性別	投与量 (ppm)	雄				雌			
		0	150	300	900	0	150	300	900
器官	所見/動物数	4	4	4	4	4	4	4	4
血管系	低色素性、赤血球 -軽微	0	0	1	2	0	0	1	2
血管系	多染性、赤血球 -軽微	0	0	0	1	0	0	1	0
	-軽度	0	0	0	0	0	0	0	1

300 あるいは 900 ppm 群において、網状赤血球の増加や赤血球の多染性が認められたことから、同群における赤血球系パラメーターの変化は再生性貧血を示すものと考えられた。なお、赤血球系パラメーターの変化や脾臓の髄外造血が認められたことから、正球性低色素性の再生性貧血が示唆されたが、赤血球系パラメーターの減少が全般的に軽度であり、貧血の程度は重篤ではなかった。この貧血の発現機序は不明であるが、少なくとも、大量の出血、溶血または骨髓の造血機能障害が主な原因であるとは考えられなかった。さらに、イヌの 1 年間混餌投与毒性試験（投与量：0、50、100、200ppm）において貧血は認めら

れず、投与が長期化しても進行性あるいは再生不良性の影響には至らなかった。

[申請者注]

大型非染色性細胞は、本試験で用いた自動血液学的装置 (Advia 120 Hematology Analyzer) に特有のパラメータであり、白血球分類においてペルオキシダーゼ活性が低く、大型の細胞のことを称す。本装置は、フローサイトメリー法で得られた結果のクラスター分析による分面を実施しており、大型非染色性細胞の領域には、芽球、異型リンパ球および一部の大型リンパ球や単球が含まれる事が知られている。

本試験において雄の300 ppm以上の群および雌の900ppm群で、大型非染色性細胞の百分率の増加が認められた。大型非染色性細胞の割合の増加は、ウイルスやアレルゲンなどの抗原刺激によるリンパ球の活性化、あるいは急性および慢性白血病などのように芽球、異型リンパ球の増加に伴い認められることが知られているが、本試験ではそれらを示唆する病変は認められなかった。これ以外には、陽イオン性両親媒性化合物の投与により動物にリン脂質症が誘発された際、末梢血のリンパ球の空胞化および通常のリンパ球より細胞容積が大きいリンパ球の割合の増加が報告⁽¹⁾されており、大型非染色性細胞の割合が増加することが考えられる。本試験では雄の150ppm以上の群および雌の300ppm以上の群においてリンパ組織内のマクロファージの空胞化が認められ、リン脂質症が誘発されたと考えられる。従って、本試験における大型非染色性細胞の百分率の増加はリンパ球の空胞化、すなわちリン脂質症に起因した変化である可能性が考えられる。

一方、イヌの1年間反復投与毒性試験では、最高用量群(200ppm)で、何れの組織においてもリン脂質症を示唆する病理組織学的変化および大型非染色性細胞の百分率の変化がなく、長期投与による大型非染色性細胞の百分率の増加の増悪化は認められなかった。また、リンパ組織を含め諸臓器にリン脂質症を示唆する空胞化が認められたが、炎症や壊死など障害を示唆する変化との関連性は乏しく、軽微な空胞化が細胞の機能を障害するとは考えられず、検体投与により発現する空胞化の毒性学的な意義は低いと考えられた。

以上のことから、本試験における大型非染色性細胞の百分率の増加は、リン脂質症に起因した変化と考えられ、毒性学的意義は低いと考えられた。

—引用文献—

- (1) Bartley W. Halstead, A clinical flow cytometric biomarker strategy: validation of peripheral leukocyte phospholipidosis using Nile red, *J. Appl. Toxicol*(2006) 26,169-177

血液生化学検査；投与開始前、投与後 42 日目及び 90 日目に全動物を対象として、頸静脈から血液を採取し、得られた血清を用い、以下の項目の測定を行った。

アルカリ性ホスファターゼ (ALP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、 γ -グルタミルトランスアミナーゼ、アルブミン、コレステロール、クレアチニン、電解質 (Na、K、

PHOS、CL及びCA)、グロブリン、グルコース、総ビリルビン、総タンパク、トリグリセライド、尿素窒素、アルブミン/グロブリン比

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目及び/あるいは検体投与に関連した変化が認められた項目を下表に示す。

性別	雄						雌					
	150		300		900		150		300		900	
投与量 (ppm)												
検査時期 (日)	42	90	42	90	42	90	42	90	42	90	42	90
AST					↑116*	↑134*					↑125*	↑162*
ALP				137		143						
アルブミン			↓94*	↓97*	↓94*	↓85*			↓100*	↓100*	↓88*	↓88*
グロブリン			121	117	↑121*	↑131*					↑108*	↑119*
総タンパク											↑98**	↑103**

線形対比検定

* : 投与期間中を通して雌雄を合わせて Bonferroni 補正した線形対比により時間-用量交互作用を解析。

** : 投与期間中を通して雌雄別々に Bonferroni 補正した線形対比により時間-用量交互作用を解析。

↑↓ : P < 0.02

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。

a : 変動の目安として対照群を 100 とした場合は 100 以下であるが、同群の投与前値を 100 とした場合は 104 であり、時間的に上昇した。

太字は投与に関連すると考えられた影響を示す。

900 ppm 群の雌雄において、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 活性の高値 (雌雄を合わせて統計検定)、アルブミン濃度の低値及びグロブリン濃度の高値 (雌雄を合わせて統計検定) が認められた。

その他、統計検定では有意差はないが、300 あるいは 900 ppm 群の雄でアルカリホスファターゼ (ALP) のわずかな増加、300 ppm 群の雄でグロブリン濃度の高値がみられた。

300ppm 群の雌雄において認められたアルブミン濃度の低値(雄 42 日; 3.0g/dl、雄 90 日; 3.2 g/dl、雌 42 日; 3.2 g/dl、雌 90 日; 3.2 g/dl) は、背景値(雄 42 日; 3.0~3.2 g/dl、雄 90 日; 3.1~4.0 g/dl、雌 42 日; 3.1~3.2 g/dl、雌 90 日; 3.0~3.9 g/dl) の範囲内であることから、投与と関連性のないものと考えられた。900 ppm 群の雌で認められた総タンパクのわずかな高値は 150mg/kg 群でも認められる値であり、用量反応性が認められないことから、投与と関連性のないものと考えられた。

150 ppm 群では検体投与に関連のある変化は認められなかった。

尿検査；投与開始前、投与後 42 日目及び 90 日目に、動物を代謝ケージに約 16 時間入れて採取した尿について、以下の項目を検査した。

色調、外観、比重（屈折計）及び尿量、pH、ビリルビン、糖、タンパク、ケトン体、潜血、ウロビリノーゲン、尿沈渣

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)	150	300	900	150	300
検査時期 (日)					90	
尿量					↑202	

Dunnett 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。

いずれの投与群においても検体投与に関連した変化は認められなかった。300 ppm 群の雌において、90 日目に統計学的に有意な尿量の高値が認められたが、用量反応性が認められないことから投与と関連性のないものと考えられた。

眼科学的検査；投与開始前及び剖検前に、倒像検眼鏡により全動物の眼を検査した。

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；試験終了時の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、肝臓（胆嚢を含む）、腎臓、心臓、精巣、精巣上体、子宮、卵巣、副腎、胸腺、脾臓、甲状腺（上皮小体を含む）、前立腺及び下垂体

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目及び／あるいは検体投与に関連した変化が認められた項目を下表に示す。

性別		雄			雌		
検査時期 (日)		90			90		
投与量 (ppm)		150	300	900	150	300	900
最終測定時体重		91	86	83	109	101	98
肝臓	絶対重量			↑131			↑119
	対体重比			↑156			↑123
胸腺	絶対重量		↓56	↓50		↓80	↓70
	対体重比		64	↓55			↓72

Dunnett 検定（雌雄を合わせて統計検定）↑↓ : 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。

太字は投与に関連すると考えられた影響を示す。

900 ppm 群の雌雄において、肝臓の絶対重量及び対体重比に統計学的に有意な高値（雌雄を合わせて統計検定）が認められた。肝重量の高値は投与に関連したものと考えられ、肝臓におけるクッパー細胞の過形成及び肥大に対応していた。900 ppm 群の雌雄では胸腺の絶対重量及び対体重比に統計学的に有意な低値、300 ppm 群の雌雄では胸腺絶対重量に統計学的に有意な低値が認められた（いずれも雌雄を合わせて統計検定）。300 あるいは 900 ppm 群の雄の胸腺の絶対重量及び対体重比の低値、900 ppm 群の雌の胸腺の平均絶対重量の低値は投与に関連したものと考えられ、300 ppm 群の雄 1 例、900 ppm 群の雄 2 例の組織学的所見である胸腺皮質の軽度あるいは中等度の萎縮に対応していた。胸腺萎縮はこれらの投与動物における全身性のストレスに起因したものであり、胸腺に対する一次的な毒性を示すものではないと考えられた。

150 ppm 群の臓器重量に影響は認められなかった。

肉眼的病理検査；試験終了時、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；試験終了時、全動物を対象として以下の組織について病理標本を作製し、検鏡した。

副腎、大動脈、骨（関節を含む）、骨髄、脳（大脳、脳幹、小脳）、盲腸、子宮頸部、脳神経－視神経、結腸、十二指腸、精巣上体、食道、眼球、胆嚢、肉眼的病変部位、心臓、回腸、空腸、腎臓、喉頭、肝臓、肺、乳腺（雌のみ）、縦隔リンパ節、縦隔組織、腸間膜リンパ節、腸間膜組織、鼻孔組織／咽頭、口腔組織、卵巣、卵管、脾臓、上皮小体、末梢神経－脛骨、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺、骨格筋、皮膚及び皮下組織、脊髄（頸部、胸部、腰部）、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、舌、扁桃腺、気管、膀胱、子宮、膣

検体投与に関連した病理組織学的所見を表 1 に示す。

300 あるいは 900 ppm 群の雌雄において、盲腸、結腸、十二指腸、回腸、空腸、喉頭、肺、リンパ節、鼻腔組織、直腸、脾臓、胃及び扁桃のリンパ組織内マクロファージの空胞化（軽微あるいは軽度）が認められた。また、骨髄の壊死部位に隣接したマクロファージにも空胞化が認められた。

150 ppm 群の一部の雄において、回腸、空腸、リンパ節、鼻腔組織及び直腸のリンパ組織内マクロファージの軽微な空胞化が認められた。しかしながら、臨床検査における変化や臓器重量の変化も認められないことから、150 ppm 群の雄におけるマクロファージの軽微な空胞化は毒性学的意義のない影響と考えられた。150 ppm 群の雌では投与に関連した病理組織学的影響は認められなかった。

その他、投与に関連した所見として、動脈炎あるいは血管周囲炎（軽微、軽度あるいは中等度）が300あるいは900 ppm群の一部の雌雄において多数の組織に認められた。より重症度の高い動脈炎では、しばしば、出血を時折伴う動脈壁の壊死を伴った所見も認められた。また、300あるいは900 ppm群の雄の少数例では、慢性活動性炎症に伴い、時折、髄膜あるいは脾臓の血管に血栓症が認められた。900 ppm群の雄1例では、動脈炎に伴って、脳髄膜に軽度の出血が認められた。また、この動物では、冠動脈の中等度の炎症及び壊死に関連して、出血及び心筋線維の変性が認められた。

さらに投与に関連した所見として骨髄壊死（軽微から中等度）が、300あるいは900 ppm群の雌雄の一部で認められた。

また、投与に関連した所見として、肝臓のクッパー細胞の過形成及び肥大（軽微あるいは軽度）が900 ppm群の雌雄全例、300 ppm群の雌雄各1例で認められた。また、影響の認められた全動物のクッパー細胞では細胞質の空胞化が認められた。900 ppm群の雌1例では、膵腺房の中等度の萎縮、個々の膵腺房細胞の軽微な壊死が認められた。投与に関連した髄外造血が300あるいは900 ppm群の雌の一部の脾臓及び／あるいは肝臓で認められた。この髄外造血はこれらの投与量で認められた骨髄壊死及び貧血に対する反応と考えられた。300 ppm群の雄1例及び900 ppm群の雄2例では、胸腺皮質の軽度あるいは中等度の萎縮が認められ、ストレスに関連したものと考えられた。

以上の結果から、検体のイヌにおける90日間反復経口投与毒性試験における影響として、雌雄とも300 ppm以上の投与群において、肝臓への毒性影響、複数の組織における動脈炎、血液系への毒性影響が認められた。また、150 ppm群の雄のリンパ組織において、投与に関連したマクロファージの空胞化の発生が認められたことから、雄の無影響量（NOEL）は確定されなかった。しかし、この投与量の空胞化は軽微で、毒性学的意義のない影響と考えられた。従って、雄の無毒性量（NOAEL）は150 ppm（5.73 mg/kg/day）であった。雌の無影響量（NOEL）は150 ppm（4.97 mg/kg/day）であった。

[申請者注]

報告書中には雌の無毒性量（NOAEL）について記載されていないが、300 ppm以上の投与群で肝臓への毒性影響、複数の組織における動脈炎、血液系への毒性影響が認められたことから、無毒性量は150 ppm（4.97 mg/kg/day）であると判断した。

表1. 投与に関連した病理組織学的所見

性別		雄				雌				
投与量 (ppm)		0	150	300	900	0	150	300	900	
臓器	所見\動物数	4	4	4	4	4	4	4	4	
(マクロファージ空胞化)										
骨髄	空胞化、マクロファージ	-軽微	0	0	0	0	0	0	1	
		-軽度	0	0	2	3	0	0	1	3
盲腸	空胞化、マクロファージ	-軽微	0	0	3	3	0	0	2	1
		-軽度	0	0	1	0	0	0	0	0
結腸	空胞化、マクロファージ	-軽微	0	0	2	1	0	0	2	1
十二指腸	空胞化、マクロファージ	-軽微	0	0	0	0	0	0	0	2
回腸	空胞化、マクロファージ	-軽微	0	2	3	3	0	0	2	2
		-軽度	0	0	0	1	0	0	1	2
空腸	空胞化、マクロファージ	-軽微	0	1	2	0	0	0	0	0
		-軽度	0	0	0	1	0	0	0	1
喉頭	空胞化、マクロファージ	-軽微	0	0	1	0	0	0	0	1
肺	空胞化、マクロファージ	-軽微	0	0	0	3	0	0	0	1
リンパ節 -縦隔	空胞化、マクロファージ	-軽微	0	0	3	3	0	0	1	2
		-軽度	0	0	0	1	0	0	0	0
リンパ節 -腸間膜	空胞化、マクロファージ	-軽微	0	1	4	2	0	0	2	4
		-軽度	0	0	0	2	0	0	0	0
鼻腔組織	空胞化、マクロファージ	-軽微	0	1	3	1	0	0	1	3
		-軽度	0	0	0	2	0	0	0	1
直腸	空胞化、マクロファージ	-軽微	0	2	3	4	0	0	1	3
脾臓	空胞化、マクロファージ	-軽微	0	0	1	4	0	0	2	0
胃	空胞化、マクロファージ	-軽微	0	0	1	2	0	0	0	1
扁桃	空胞化、マクロファージ	-軽微	0	0	3	0	0	0	3	1
		-軽度	0	0	0	4	0	0	0	3
(血管変化)										
大動脈	炎症	-軽度	0	0	0	1	0	0	0	0
骨髄	炎症、動脈	-軽微	0	0	0	0	0	0	1	0
脳	炎症、血管周囲	-軽微	0	0	0	1	0	0	0	0
		-軽度	0	0	1	0	0	0	0	0
脳	炎症、動脈	-軽度	0	0	0	3	0	0	0	0
脳	血栓、静脈、髄膜	-軽微	0	0	0	1	0	0	0	0
精巣上体	炎症、血管周囲	-軽微	0	0	1	0	-	-	-	-
精巣上体	炎症、動脈	-軽度	0	0	3	1	-	-	-	-
		-中等度	0	0	0	3	-	-	-	-
心臓	炎症、冠動脈	-軽度	0	0	0	0	0	0	1	0
		-中等度	0	0	0	1	0	0	0	0
心臓	変性、心筋、心房	-軽度	0	0	0	1	0	0	0	0
回腸	炎症、血管周囲	-軽度	0	0	0	0	0	0	1	0
腎臓	炎症、動脈	-軽微	0	0	0	0	0	0	0	1
肺	炎症、動脈	-軽微	0	0	0	1	0	0	0	0
		-軽度	0	0	0	0	0	0	1	0

性別			雄				雌			
投与量 (ppm)			0	150	300	900	0	150	300	900
臓器	所見\動物数		4	4	4	4	4	4	4	4
縦隔	炎症、動脈	-軽微	0	0	0	1	0	0	0	0
		-軽度	0	0	1	1	0	0	0	1
		-中等度	0	0	0	2	0	0	0	0
腸間膜	炎症、動脈	-軽度	0	0	0	1	0	0	0	0
		-中等度	0	0	0	0	0	0	0	1
鼻腔組織	炎症、動脈	-軽度	0	0	0	1	0	0	1	0
口腔組織	炎症、動脈	-中等度	0	0	1	0	0	0	0	0
卵巢	炎症、動脈	-軽度	-	-	-	-	0	0	1	0
卵管	炎症、血管周囲	-軽微	-	-	-	-	0	0	1	0
脾臓	血栓、動脈	-軽微	0	0	1	0	0	0	0	0
		-軽度	0	0	0	1	0	0	0	0
下垂体	炎症、動脈	-軽度	0	0	1	0	0	0	0	0
前立腺	炎症、血管周囲	-軽微	0	0	1	0	-	-	-	-
胃	炎症、動脈	-軽度	0	0	0	1	0	0	1	0
精巣	炎症、動脈	-軽度	0	0	0	2	-	-	-	-
		-中等度	0	0	0	1	-	-	-	-
甲状腺	炎症、血管周囲	-軽微	0	0	1	0	0	0	0	0
膣	炎症、動脈	-軽度	-	-	-	-	0	0	0	1
		-中等度	-	-	-	-	0	0	0	1
〈骨髄壊死〉										
骨髄	壊死、多発性限局性	-軽微	0	0	1	0	0	0	0	1
		-軽度	0	0	1	3	0	0	1	2
		-中等度	0	0	0	0	0	0	0	1
〈その他〉										
肝臓	髓外造血	-軽微	0	0	0	0	0	0	1	1
		-軽度	0	0	0	0	0	0	0	1
肝臓	過形成及び肥大、クッパー細胞	-軽微	0	0	0	0	0	0	0	2
		-軽度	0	0	1	4	0	0	1	2
肝臓	空胞化、クッパー細胞	-軽微	0	0	1	4	0	0	1	4
脾臓	萎縮、腺房	-中等度	0	0	0	0	0	0	0	1
脾臓	壊死、腺房細胞	-軽微	0	0	0	0	0	0	0	1
脾臓	髓外造血	-軽微	0	0	0	0	0	0	0	2
		-軽度	0	0	0	0	0	0	1	0
		-中等度	0	0	0	0	0	0	0	1
胸腺	萎縮、皮質	-軽度	0	0	1	1	0	0	0	0
		-中等度	0	0	0	1	0	0	0	0

- 該当なし

1 骨髄の空胞化マクロファージは壊死部位に隣接して認められた。その他の空胞化マクロファージは全て、影響のあった臓器及び組織のリンパ組織で認められた。

対照群との有意差検定は行わなかった。

6. 反復経口神経毒性

スピネトラム原体のラットを用いた飼料混入投与による

12 ヶ月間反復経口投与神経毒性試験 (資料 6)

試験機関：The Dow Chemical Company

[GLP 対応]

報告書作成年：2007 年

検体純度：

供試動物：F344/DuCr1 系ラット、1 群雌雄各 10 匹、開始時 6 週令

投与期間：12 ヶ月（雄：2005 年 2 月 24 日～2006 年 2 月 23 日、雌：2005 年 2 月 25 日～2006 年 2 月 26 日）

投与方法：検体を 0、50、250、500 および 750 ppm の濃度で飼料に混入し、12 ヶ月間にわたって随時摂食させた。

観察・検査項目及び結果：

死亡率；生死を 1 日 2 回以上観察した。

検体投与に起因する死亡は認められなかった。

一般状態；全動物について、ケージサイドから一般状態を 1 日 1 回以上観察した。

ケージサイドからの観察では検体投与に関連のある異常所見は認められなかった。

体重変化；投与開始前、投与後 1、3、6、9 および 12 ヶ月時にすべての動物の体重を測定

した。

統計学的に有意な投与量 × 時間 × 性別の交互作用が認められた (p = 0.0320) ことから、雌雄別に解析を行ったところ、投与量 × 時間の交互作用は雄 (p = 0.0566) および雌 (p = 0.0944) ともに有意ではなく、いずれの時点においても体重への投与の影響は認められなかった。対照群と比較して体重差がもっとも大きかったのは雄で 250 ppm 投与群、雌では 750 ppm 投与群であったが、これらの体重差は雌雄ともに小さく、試験 1 日目の投与前にも認められた。さらに、雌雄ともに用量反応関係は認められなかった。したがって、統計学的に有意な投与量 × 時間 × 性別の交互作用は投与の影響を示唆するものではなかった。

摂餌量；全動物の摂餌量を投与開始から 13 週間は週 1 回、その後は約 1 ヶ月間隔で測定した。

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のとおりであった。

投与量 (ppm)		50	250	500	750
検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	2.4	12.0	24.4	36.7
	雌	2.9	14.7	29.6	44.3

詳細な状態の観察；投与開始前、投与後 1、3、6、9 および 12 ヶ月時に全動物を対象として、以下の項目について観察した。

保定しての観察 (眼瞼閉鎖、流涙、瞳孔サイズ、瞳孔反射、流涎、筋緊張、伸筋衝動反応、保定し易さなど)

オープンフィールドでの観察 (活動性レベル、聴覚反応、接触反応、テイルピンチ反応、排尿、排便、歩行など)

対照群と比較して平均ランクスコアの差が 0.5 以上の観察所見および統計学的有意差が認められた項目を次表に示す。

性別		雄					雌				
投与量 (ppm)		0	50	250	500	750	0	50	250	500	750
活動性 平均スコア	投与 1 ヶ月	2.8	2.8	3.0	2.9	2.9	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
	投与 3 ヶ月	1.9	2.1	2.1	1.8	2.0	2.4	2.6	2.6	2.3	2.9
	投与 6 ヶ月	1.6	1.9	2.0	<u>2.1</u>	1.9	2.4	2.7	2.3	2.2	2.1
	投与 9 ヶ月	1.8	1.8	1.6	1.6	1.7	2.1	2.3	2.0	2.1	1.9

性別		雄					雌				
投与量 (ppm)		0	50	250	500	750	0	50	250	500	750
	投与12ヵ月	1.6	1.5	2.0	1.4	1.5	2.0	1.9	1.9	1.9	2.2

太字は対照群との間に0.5以上の差が認められたデータ。

性別		雄					雌				
投与量 (ppm)		0	50	250	500	750	0	50	250	500	750
投与 1ヵ月	活動性 少ない	2	2	0	1	1	0	0	0	0	0
	適度	8	8	10	9	9	10	10	10	10	10
投与 3ヵ月	活動性 なし	4	3	3	4	3	2	0	1	1	0
	少ない	3	3	3	4	4	2	4	2	5	1
	適度	3	4	4	2	3	6	6	7	4	9
投与 6ヵ月	活動性 なし	4	2	1	2	1	1	0	1	2	3
	少ない	6	7	8	5	9	4	3	5	4	3
	適度	0	1	1	3	0	5	7	4	4	4
投与 9ヵ月	活動性 なし	2	5	4	5	4	1	0	3	3	5
	少ない	8	↓2	6	4	5	7	7	4	3	↓1
	適度	0	3	0	1	1	2	3	3	4	4
投与 12ヵ月	活動性 なし	5	5	2	5	6	3	1	4	4	2
	少ない	4	5	6	4	3	4	8	3	3	3
	適度	1	0	2	0	1	3	0	3	3	4

対照群との有意差検定は、Z-testを用いて行った(↓: P < 0.02)。

表中の数値は所見を有する動物数を示す。

オープンフィールドにおける活動性レベルの変化は、特定の測定時点および投与群に限定されず低頻度かつ散発的に認められたことから、投与に起因するものではなく、個体差が大きかったことが原因と考えられた。このことは、用量反応関係がみられず、また、自動測定による自発運動量に投与の影響が認められなかったことでも裏付けられる。その他には、いずれの測定時点でも雌雄ともに統計学的に有意な観察所見の発現は認められなかった。

機能検査；投与開始前、投与後1、3、6、9および12ヵ月時に全動物を対象として、以下の項目の測定を行った。

直腸温、前肢および後肢握力、着地開脚幅、自発運動量

いずれの測定時点および雌雄ともに投与による統計学的に有意な直腸温、握力、着地開脚幅および自発運動量の変化は認められず、検体投与の影響は認められなかった。

眼科学的検査；投与開始前および計画殺前に0.5%トロピカミド点眼液で散瞳させた後、

倒立検眼鏡を用いてすべての動物の眼を検査した。
 検体投与に関連のある異常は認められなかった。

肉眼的病理検査；試験終了時に各群雌雄各 5 匹を対象に検査した。
 検体投与に関連のある異常は認められなかった。

病理組織学的検査；試験終了時に各群雌雄各 5 匹を対象に、イソフルラン蒸気吸入により麻酔後、亜硝酸ナトリウムを含む 0.05 M リン酸緩衝液に続いて 1.5% グルタルアルデヒド-4% ホルムアルデヒドのリン酸緩衝液を用いて灌流固定した後、対照群および 750 ppm 投与群の以下の組織について病理標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して検鏡した。

嗅球、大脳（前頭葉、頭頂葉、側頭葉、後頭葉）、視床／視床下部、中脳、橋、小脳、延髄、三叉神経節／三叉神経、下垂体、眼（視神経を含む）、脊髄（頸部および腰部）、嗅上皮および骨格筋（腓腹筋、前脛骨筋）

また、対照群および 750 ppm 投与群の以下の組織については、オスミウム酸処理後、エポキシ樹脂に包埋し、トルイジンブルー染色を施して検鏡した。

脊髄神経根（頸部および腰部）、後根神経節（頸部および腰部）および末梢神経（坐骨神経、近位および遠位-膝および腓腹筋部の脛骨神経、腓腹神経）

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	750	0	750
臓器	所見\検査動物数		5	5	5	5
延髄	限局性台形体神経線維変性	軽微	1	1	1	0
	多発性台形体神経線維変性	軽微	4	4	4	5
	多発性薄束核軸索腫大	軽微	5	5	5	5
視神経	限局性片側神経線維変性	軽微	0	1	1	0
	多発性片側神経線維変性	軽微	1	0	0	0
頸部後根神経節	多発性神経線維変性	軽微	0	0	1	0
脛骨神経	限局性神経線維変性	軽微	1	2	2	0
	多発性神経線維変性	軽微	3	3	0	1
近位坐骨神経	多発性神経線維変性	軽微	1	2	2	1
腓腹神経	限局性神経線維変性	軽微	1	0	0	0
	多発性神経線維変性	軽微	0	0	1	0
頸部脊髄	限局性後索神経線維変性	軽微	0	1	1	3
	限局性側索神経線維変性	軽微	0	1	0	0
	限局性前索神経線維変性	軽微	1	0	2	1

性別			雄		雌	
投与量 (ppm)			0	750	0	750
臓器	所見\検査動物数		5	5	5	5
	多発性前索神経線維変性	軽微	3	4	1	2
	限局性後索軸索腫大	軽微	1	0	0	0
	限局性後角軸索腫大	軽微	0	2	0	1
	多発性後角軸索腫大	軽微	2	0	0	0
腰部脊髄	限局性前索神経線維変性	軽微	3	2	2	1
	多発性前索神経線維変性	軽微	1	1	0	1
三叉神経節/ 三叉神経	限局性片側神経線維変性	軽微	2	2	1	2
	限局性両側神経線維変性	軽微	0	1	0	0
	多発性両側神経線維変性	軽微	0	0	0	1

Yates 連続修正カイ二乗検定による有意差は認められなかった ($p < 0.05$)。
表中の数値は所見を有する動物数を示す。

神経系におけるこれらの病変はいずれも同令の Fischer 344 系ラットで典型的にみられる自然発生の病変と考えられ、検体投与に関連した変化は認められなかった。

以上の結果から、本剤のラットに対する 12 ヶ月間飼料混入投与による慢性神経毒性試験における影響は、保定しての観察所見またはオープンフィールド観察所見、握力、直腸温、着地開脚幅、自発運動量、体重、中枢または末梢神経系の病理組織学的検査のいずれにおいても認められなかったため、本剤の神経毒性に関する無影響量 (NOEL) *は雌雄ともに試験した最高用量の 750 ppm (雄 36.7 mg/kg/day、雌 44.3 mg/kg/day) であると判断される。

申請者注：報告書には無毒性量 (NOAEL) について記載していないが、いずれの群においても被験物質による毒性影響は認められなかったことから、無毒性量は、雌雄ともに 750 ppm であると判断した。

報告書では、体重および摂餌量の測定頻度が不足しているが、当該試験は、2 年間慢性毒性/発癌性試験のサブグループとして実施されており、当該試験動物を含めてガイドラインに準拠した投与前、投与初期 13 週は週 1 回、その後は約 1 ヶ月間隔で体重および摂餌量が測定および評価されていることから、試験の妥当性に問題はないものとする。

7. 1年間反復経口投与毒性及び発がん性

(1) スピネトラム原体のラットを用いた飼料混入投与による

1年間反復投与毒性/発がん性併合試験 (資料 7-1)

試験機関: The Dow Chemical Company

[GLP 対応]

報告書作成年: 2007 年

検体純度:

供試動物: F344/DuCr1 ラット、発がん性群; 1 群雌雄各 50 匹、慢性毒性群; 1 群雌雄各 10 匹、開始時 6 週齢

投与期間: 発がん性群; 24 ヶ月 (雄: 2005 年 2 月 24 日~2007 年 2 月 28 日、

雌: 2005 年 2 月 25 日~2007 年 3 月 5 日)

慢性毒性群; 12 ヶ月 (雄: 2005 年 2 月 24 日~2006 年 2 月 23 日、

雌: 2005 年 2 月 25 日~2006 年 2 月 26 日)

投与方法: 検体を 0、50、250、500 及び 750 ppm の濃度で飼料に混入し、24 ヶ月間にわたって自由に摂食させた。

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、ケージサイドから一般状態を 1 日 1 回以上、生死、全身状態、飼料及び水の摂取状況を 1 日 2 回以上観察した。詳細な臨床観察を発がん性群の生存動物 10 匹について、投与前、及び 1~12 ヶ月時は月 1 回、その後、15、18、21 及び 24 ヶ月時に実施した (24 ヶ月時: 500 ppm 群の雄のみ 9 匹)。また、全動物について、投与前、及び試験期間中は 2 週間に 1 回、腫脹あるいは触診による腫瘤の検査を含む臨床観察を実施した。

臨床観察において、750 ppm 群の雌雄において対照群と比較して会陰部の汚れの増加が観察された。750 ppm 群の雄では 127 日目に会陰部の汚れが初めて観

察され、その発生頻度は 239 日目までに 1 例から 8 例に徐々に増加した。しかし、281 日目～365 日目には、雄の会陰部の汚れの発生頻度は対照群と同程度であった。750 ppm 群の雌では 85 日目に会陰部の汚れが初めて観察され、183 日目には 3 例から 13 例に徐々に増加した。197 日目～365 日目には、この高用量群の雌の会陰部の汚れの発生頻度は 13 例から 8 例に徐々に減少したが、その発生頻度は対照群より、まだわずかに高く、投与の影響を示すものかもしれないと考えられた。会陰部の汚れは一過性で、明確な用量反応性もないことから、様々な理由により発生しうる非特異的な所見であると考えられた。その他の所見は全て、散発的、一過性で、用量反応性が認められないことから、投与と関連性のないものと考えられた。

会陰部の汚れの発現状況（抜粋）を下表に示す。

投与量 (ppm)	0	50	250	500	750
雄					
会陰部の汚れ-239 日目	1	3	3	3	8
会陰部の汚れ-365 日目	4	3	2	4	4
会陰部の汚れ-729 日目	0	2	0	2	2
雌					
会陰部の汚れ-183 日目	3	3	5	5	13
会陰部の汚れ-365 日目	2	3	5	4	8
会陰部の汚れ-491 日目	3	1	0	5	9
会陰部の汚れ-729 日目	1	1	0	0	1

24 ヶ月の試験終了時の死亡率を下表に示す。

投与量 (ppm)		0	50	250	500	750
死亡率 (%)	雄	38	46	32	30	36
	雌	24	20	16	22	36

雌雄のいずれにおいても、累積死亡率に統計学的に有意な変化は認められなかった。

体重変化：投与前、及び投与開始から 13 週間は週 1 回、その後は試験終了時まで約 1 ヶ月間隔で全ての生存動物の体重を測定した。また、体重増加量を算出した。雄の体重及び体重増加量（抜粋）を下表に示す。

投与量 (ppm)	体重				体重増加量			
	50	250	500	750	50	250	500	750
雄								
232 日目	99	99	↓97*	↓98*	99	100	↓97*	97
365 日目	99	98	↓97*	↓97*	98	98	↓96*	↓96*
624 日目	99	98	↓96*	↓96*	99	97	↓95*	↓95*
729 日目	98	98	96	95	97	97	94	93

* : Dunnett 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。
太字は投与と関連性があると考えられた値。

500 あるいは 750 ppm 群の雄では、統計学的に有意な体重あるいは体重増加量の低値が 232~624 日目までの大半の期間で認められた。365 日目、500 あるいは 750 ppm の両群において、体重の低値（約 2~3%）と体重増加量の低値（約 4%）が認められた。729 日目、500 あるいは 750 ppm 群の雄の体重はそれぞれ 4% あるいは 5% の低値、体重増加量についてはそれぞれ 6% あるいは 7% の低値であり、統計学的有意差はなかった。500 あるいは 750 ppm 群の雄の体重及び体重増加量におけるこれらのわずかな変化は、検体投与に関連したものと考えられた。検体 50 及び 250 ppm 群の雄の体重あるいは体重増加量については、投与に関連した影響は認められなかった。雌の体重及び体重増加量は、試験期間中を通して全ての投与群で対照群と同程度であった。対照群と比較して、体重に統計学的に有意な変化（高値及び低値）が散発的に認められたが、これらの変化はその発生が散発的であること、及び/あるいは用量反応性が認められないことから検体投与と関連性のないものと考えられた。

摂餌量 ; 全動物の摂餌量を投与開始から 13 週間は週 1 回、その後は約 1 ヶ月間隔で測定した。

全投与群の雄において、1~344 日目、対照群の値と比較して、平均摂餌量の高値が認められ、測定期間の大半において統計学的有意差が認められた。しかし、これらの値は全て、背景値の範囲内であり、検体投与と関連性のないものと考えられた。2 年目、雄の摂餌量において、対照群と比較して、統計学的に有意な変化が観察されたが、散発的であること、及び/あるいは用量反応性が認められないことから、検体投与と関連性があるとは考えられなかった。

50 ppm 群の雌では 1~92 日目に、対照群と比較して摂餌量の統計学的に有意な低値が頻繁に観察された。しかし、これらの値は背景値の範囲内であった。92

日以降、摂餌量は対照群と同程度であった。365～722日目、250、500あるいは750 ppm群の雌の摂餌量は、常に対照群より高値であった。715～722日目、対照群と比較して250、500あるいは750 ppm群の雌の摂餌量に8～11%の増加が認められた。これは、摂餌量における最も大きな変化であったが、本対照群の値は背景値の範囲より7.5%低値であった。さらに、250、500あるいは750 ppm群の雌で観察された摂餌量の高値は全て、背景値の範囲内あるいはわずか0.1gの高値であった。これらの事実及び用量反応性が認められないことから、雌における摂餌量の高値は検体投与と関連性があるとは考えられなかった。

統計学的有意差の認められた期間（抜粋）について、摂餌量及び背景値を下表に示す。

日	投与量 (ppm)					
	0	背景値	50	250	500	750
雄 (g/day)						
85～92	15.6	15.7～16.8	↑15.9*	↑16.1*	↑16.1*	↑16.2*
169～176	16.0	16.0～17.5	↑16.4*	↑16.6*	↑16.6*	↑16.7*
337～344	16.8	16.9～18.0	17.0	16.9	↑17.3‡	↑17.2‡
715～722	17.7	17.0～18.7	16.8	18.1	17.6	17.5
雌 (g/day)						
43～50	11.1	10.7～11.5	↓10.7*	11.4	11.1	11.3
85～92	10.6	10.2～10.8	↓10.4*	10.8	10.8	10.6
113～120	10.4	10.5～11.1	10.5	↑10.8‡	↑10.9‡	↑10.9‡
225～232	10.8	10.6～11.2	10.9	↑11.2‡	↑11.3‡	↑11.3‡
337～344	10.9	11.3～12.1	11.0	↑11.3‡	↑11.4‡	11.0
421～428	11.4	11.3～12.0	11.5	↑12.1‡	↑12.0‡	↑12.0‡
715～722	12.3	13.3～13.5	12.5	↑13.3‡	↑13.6‡	↑13.4‡

*: Dunnettの検定、↑↓: P < 0.05

‡: Wilcoxonの検定、↑↓: P < 0.05

Bartlett 検定し、有意差を示さない場合には Dunnett 検定(パラメトリック分散解析)、有意差を示す場合には Wilcoxon 検定(ノンパラメトリック分散解析)を実施した。

検体摂取量；2年間の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)		50	250	500	750
検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	2.12	10.8	21.6	32.9
	雌	2.63	13.2	26.6	40.0

血液学的検査；投与後 3、6 及び 12 ヶ月時に慢性毒性群の 10 匹/性/用量、18 及び 24 ヶ月時には、発がん性群の生存動物 10 匹/性/用量を対象として、眼窩静脈叢から血液を採取し、以下の項目の測定を行った。また、24 ヶ月時には全生存動物を対象として白血球数及び白血球分類値を測定した。

ヘマトクリット値、血色素量、赤血球数、総白血球数、白血球分類値、血小板数、網状赤血球数、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、プロトロンビン時間

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。

検査項目	検査 時期 (月)	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		50	250	500	750	50	250	500	750
MCV	3				↓ 99*				
	6					↑ 101*	↑ 102*		
MCH	6					↑ 101*			
白血球数	12								↓ 80*
好中球	12								↑ 128*
リンパ球	12								↓ 91*
好酸球	24								↓ 62*
好塩基球	24	↑ 200*			↑ 220*				
大型未分類細胞	24			↑ 214*	↑ 200*				

* : Dunnett 検定、↑ ↓ : P < 0.05

\$: Wilcoxon 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。Bartlett 検定し、有意差を示さない場合には Dunnett 検定 (パラメトリック分散解析)、有意差を示す場合には Wilcoxon 検定 (ノンパラメトリック分散解析) を実施した。

検体投与に関連のある変化は認められなかった。3 ヶ月時、750 ppm 群の雄において、対照群と比較して統計学的に有意な MCV の低値が認められたが、6、12、18 あるいは 24 ヶ月時には認められず、検体投与と関連性のないものと考えられた。24 ヶ月時、対照群と比較して統計学的に有意な好塩基球の百分率の高値が 50ppm 群及び 750 ppm 群の雄において、大型未分類細胞の百分率の高値が 500 ppm 以上の群の雄において認められたが、老齢雄ラットの自然発生的な疾病過程による変動であると考えられ、検体投与と関連性がないと考えられた。6 ヶ月時、対照群と比較して統計学的に有意な MCV の高値が 50ppm 群及び 250 ppm

群の雌において、MCHの高値が250 ppm群の雌において認められたが、500ppm群及び750ppm群には認められず、12、18あるいは24ヵ月時にも認められなかったことから、検体投与と関連性のないものと考えられた。12ヵ月時、750 ppm群の雌において、対照群と比較して統計学的に有意な白血球数およびリンパ球の百分率の低値、好中球の百分率の高値が認められたが、18あるいは24ヵ月時には認められず、従って、検体投与と関連性のないものと考えられた。24ヵ月時、750 ppm群の雌において、対照群と比較して好酸球の百分率の統計学的に有意な低値が認められたが、関連した変化は他になく、検体投与と関連性のないものと考えられた。

血液生化学検査；投与後3、6及び12ヵ月時に慢性毒性群の10匹/性/用量、18及び24ヵ月時には、発がん性群の生存動物10匹/性/用量を対象として、眼窩静脈叢から血液を採取して得られた血清を用い、以下の項目の測定を行った。

アルカリ性ホスファターゼ (ALP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、 γ -グルタミルトランスベプチダーゼ (GGT)、アルブミン、アルブミン/グロブリン比、コレステロール、クレアチニン、電解質 (ナトリウム、カリウム、リン、クロライド、カルシウム)、グロブリン、グルコース、総ビリルビン、総蛋白、トリグリセライド、尿酸窒素

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 (月)	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		50	250	500	750	50	250	500	750
ALT	6					↓77*		↓79*	↓81*
	12			↓72 [§]					
AST	12			↓74 [§]					
総蛋白	12							↑105*	
コレステロール	12							↑117*	
尿酸窒素	18				↑106 [§]			↓88*	
リン	18								↑111*
アルブミン	24	↑109 [§]		↑109 [§]					

* : Dunnett 検定、 $\uparrow \downarrow$: $P < 0.05$

§ : Wilcoxon 検定、 $\uparrow \downarrow$: $P < 0.05$

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。

Bartlett 検定し、有意差を示さない場合には Dunnett 検定 (パラメトリック分

散解析)、有意差を示す場合にはWilcoxon検定(ノンパラメトリック分散解析)を実施した。

検体投与に関連していると考えられる変化は、いずれの投与群の雌雄にも認められなかった。対照群の値と比較して統計学的に有意な変化として、50、500あるいは750 ppm群の雌における6ヵ月時のアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)活性の低値(用量反応性なし)、500 ppm群の雄における12ヵ月時のALT及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)活性の低値(用量反応性なし)、500 ppm群の雌における12ヵ月時の総蛋白及びコレステロールの高値(用量反応性なし)、750 ppm群の雄における18ヵ月時の尿素窒素のわずかな高値(16対17 mg/dLで対照群とわずかな差)、500 ppm群の雌における18ヵ月時の尿素窒素の低値(用量反応性なし)、750 ppm群の雌における18ヵ月時のリンの高値(24ヵ月時には観察されず)、50あるいは500 ppm群の雄における24ヵ月時のアルブミン濃度のわずかな高値(用量反応性なし)が認められたが、検体投与に関連していると考えられるものはなかった。ほとんどの場合、その変化には用量反応性がなく、高用量では変化が認められなかった。対照群と高用量群の間に統計学的有意差が認められた場合(6ヵ月時の雌のALT、18ヵ月時の雄の尿素窒素、18ヵ月時の雌のリン)、その変化は1回の測定時点での単発的なもので、24ヵ月時の最終屠殺時には認められなかった。

尿検査;投与後3、6及び12ヵ月時に慢性毒性群の10匹/性/用量、18及び24ヵ月時には、発がん性群の生存動物10匹/性/用量を対象として、尿を一晚採取し、以下の項目を検査した。また、膀胱を手で圧迫することにより、各動物から尿試料を採取し、各群から得られた尿サンプルをプールして沈渣の顕微鏡検査を実施した。

色調、外観、比重(屈折計)及び尿量、pH、ビリルビン、糖、蛋白、ケトン体、潜血、ウロビリノーゲン

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 (月)	投与量 (ppm)				
		雄				
		0	50	250	500	750
pH	3	7.0 (1)	7.0 (1)	7.0 (5) *	7.0 (3)	7.0 (2)
		7.5 (3)	7.5 (3)	7.5 (4)	7.5 (6)	7.5 (5)
		8.0 (4)	8.0 (3)	8.0 (1)	8.0 (1)	8.0 (2)
		8.5 (2)	8.5 (3)			8.5 (1)
ビリルビン	18	- (5) + (5)	- (10) *	- (7) + (3)	- (8) + (2)	- (8) + (2)

* Fisher exact 検定: $P < 0.05$

-: 陰性 +: 軽度

検査項目	検査 時期 (月)	投与量 (ppm)				
		雌				
		0	50	250	500	750
外観	12	+ (10)	- (1)	+ (7)	+ (3) *	+ (6)
			+ (6) ++ (2)	++ (3)	++ (6) *	++ (3)

* Fisher exact 検定: $P < 0.05$

-: 透明 +: 軽度な混濁 ++: 混濁

検体投与に関連のある変化は認められなかった。雄では尿中ビリルビンの低下が18ヶ月時の50ppm群および尿pHの低下が3ヶ月時の250ppm群において認められた。雌では尿の混濁の増加が12ヶ月時の500ppm群において認められた。しかし、何れも用量反応性がなく、その後の検査において変化がないことから投与の影響でないと考えられた。

眼科学的検査; 投与前、及び計画的剖検前に、倒像検眼鏡により全動物の眼を検査した。

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; 12ヶ月の計画的剖検時に慢性毒性群の全生存動物、24ヶ月の計画的剖検時に発がん性群の全生存動物を対象として、以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

脳、肝臓、腎臓、心臓、副腎、精巣、精巣上体、子宮、卵巣、脾臓及び甲状腺(上皮小体を含む)

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)	50	250	500	750	50	250	500	750
〈12 カ月〉								
心臓	重量							↑110*
	対体重比						↑109*	↑111*
肝臓	対体重比						↑108*	↑111*
〈24 カ月〉								
体重			96	↓95*				
副腎	対体重比			↑113*				
心臓	重量					↑108*	↑108*	↑112*
	対体重比			↑108*	↑111*	↑105*		↑111*
肝臓	重量					↑109*	↑108*	
	対体重比							↑106*
甲状腺	重量						↓27*	↓27*
	対体重比						↓22*	↓23*

*: Dunnett 検定、↑↓: P < 0.05

§: Wilcoxon 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。

太字は投与と関連性があると考えられた値。

Bartlett 検定し、有意差を示さない場合には Dunnett 検定 (パラメトリック分散解析)、有意差を示す場合には Wilcoxon 検定 (ノンパラメトリック分散解析) を実施した。

〈12 カ月〉

雄の臓器重量及び対体重比は全ての投与量において同程度で、統計学的有意差は認められなかった。750 ppm 群の雌の心臓の平均絶対重量 (0.784 g)、500 あるいは 750 ppm 群の雌の心臓の対体重比 (500 ppm 群; 0.347 g/100、750 ppm 群; 0.353 g/100) が対照群と比較して高値であり、統計学的有意差が認められた。これらの心臓重量の高値は背景値 (重量; 0.694~0.728 g、対体重比; 0.319~0.334 g/100) の範囲外であり、検体投与に関連したものと考えられた。しかし、投与に関連した病理組織学的変化を伴うものではなかった。500 あるいは 750 ppm 群の雌において、対照群と比較して、肝臓の対体重比の高値が認められ、統計学的有意差が認められた。これらの対体重比の高値 (500 ppm 群; 2.707 g/100、750 ppm 群; 2.775 g/100) は背景値 (2.442~2.468 g/100) の範囲外であり、検体投与に関連したものと考えられた。500 あるいは 750 ppm 群の雌の絶対肝重量は、対照群と比較して高値であったが、統計学的有意差はなかった。これらの臓器重量の変化は、投与に関連した病理組織学的変化を伴うもの

ではなかった。

〈24 ヶ月〉

500 あるいは 750 ppm 群の雄において、対照群と比較して、絶食時の最終体重の低値が認められ、750 ppm 群の雄では統計学的有意差が認められた。これらの体重の低値 (500 ppm 群 ; 398.5 g、750 ppm 群 ; 393.5 g) は背景値 (382.1 ~ 412.3 g) の範囲内であったが、対照群の体重 (416.4 g) は背景値の範囲外であった。しかしながら、500 あるいは 750 ppm 群の雄の体重の低値は、検体投与に関連したものと考えられ、投与期間中に観察された体重の低値と一貫性があった。

750 ppm 群の雄の副腎の対体重比の平均値は対照群より高値であった。個体別の副腎重量を調べたところ、250 及び 500 ppm 群の雄それぞれ 1 例で、副腎重量が通常の 20~50 倍の高値であった。副腎の絶対重量及び対体重比の平均値からこれらの個体を除外したところ、全ての群で副腎重量の平均値は 0.067~0.072 g、副腎の対体重比の平均値は 0.016~0.018 g となり、これらの値に用量反応性は認められなかった。従って、副腎の対体重比の高値は検体投与と関連性のないものと考えられた。500 あるいは 750 ppm 群の雄の心臓の対体重比は対照群より高値で、統計学的有意差が認められた。これらの値 (500 ppm 群 ; 0.312 g/100、750 ppm 群 ; 0.320 g/100) は背景値 (0.291~0.313 g/100) の範囲内であるか、あるいは背景値に近い値であった。心臓の対体重比の変化はこれらの雄における、わずかな低体重と関連しているようであったが、同様の変化が 12 及び 24 ヶ月時に雌で認められていることから、検体投与に関連した影響から完全に除外することはできなかった。

250、500 あるいは 750 ppm 群の雌では、対照群と比較して、心臓の平均絶対重量及び対体重比の高値が認められ、その大半で統計学的有意差が認められた。これらの重量の高値にはわずかに用量反応性が認められたが、250 あるいは 500 ppm 群の雌の心臓の平均絶対重量 (250 ppm 群 ; 0.866 g、500 ppm 群 ; 0.871 g) 及び対体重比 (250 ppm ; 0.310 g/100、500 ppm 群 ; 0.308 g/100) は背景値 (重量 : 0.867~0.892 g (対照群 ; 0.803 g)、対体重比 : 0.313~0.323 g/100 (対照群 ; 0.296 g/100)) の範囲内であり、250 あるいは 500 ppm 群の雌の最終体重は、対照群より高値であった。従って、250 及び 500 ppm 群の心臓重量におけるこれらの変化は、体重の高値による二次的なものと考えられた。しかし、750 ppm 群の雌の心臓の平均絶対重量 (0.896 g) 及び対体重比 (0.330 g/100) は背景値の範囲外であり、12 ヶ月時の心臓重量の高値と一貫性があり、従って、検体投与に起因したものと考えられた。これらの心臓重量の高値と関連していると考えられる病理組織学的変化は認められなかった。250、500 あるいは 750 ppm 群の雌の肝臓の平均絶対重量は対照群より高値で、250 及び 500 ppm 群の肝臓の絶対重量には統計学的有意差が認められた。750 ppm 群の肝臓の対体重比

は、高値で統計学的有意差が認められた。これらの絶対重量 (250 ppm 群 ; 7.843 g、500 ppm 群 ; 7.814 g、750 ppm 群 ; 7.723 g) 及び対体重比 (750 ppm 群 ; 2.826 g/100) の増加は、1) その重量が背景値 (重量 : 7.547~7.650 g、対体重比 : 2.730~2.811 g/100) と概ね同程度である、2) 用量反応性が認められない、3) 関連した病理組織学的変化が認められないことから、検体投与に起因したのではないと考えられた。500 あるいは 750 ppm 群の雌の甲状腺の平均絶対重量及び対体重比は対照群より低値で統計学的有意差が認められた。対照群の甲状腺の平均絶対重量及び対体重比は、少数例の特に大型/重量のある腫瘍の存在による高値であり、そのデータの不均一性から、正確な統計学的比較はできなかった。甲状腺における投与に関連した病理組織学的変化である濾胞細胞の空胞化は、おそらく甲状腺重量の低値よりむしろ甲状腺重量の高値に関連すると考えられる。従って、甲状腺重量における統計学的に有意な変化は検体投与に起因したのではないと考えられた。

肉眼的病理検査 ; 途中死亡、切迫屠殺、投与後 12 ヶ月時の慢性毒性群の全生存動物、24 ヶ月時の発がん性群の全生存動物について剖検を行った。

その結果、24 ヶ月時の発がん性群において、50 および 750 ppm 群の雄腎臓で、表面粗造 (両側) の発現頻度の対照群に対して統計学的に有意な減少が認められたが、当該変化に関わる慢性糸球体腎症の発現頻度には有意差は認められなかったため、検体投与に関連した変化とは考えられなかった。

性別	雄					雌				
	0	50	250	500	750	0	50	250	500	750
投与量 (ppm)										
<24 ヶ月>										
腎臓/ 表面粗造 (両側)	11	3↓	7	4	1↓	1	0	0	1	1

↑ ↓ : P < 0.05 Cochran-Armitage 傾向検定を実施し、傾向が認められた場合は、更に Yates 連続修正カイ二乗検定を実施した。

その他、散見された肉眼的変化についても検体投与に関連がある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 ; 対照群及び高用量群の動物、途中死亡あるいは切迫屠殺した全動物を対象として、以下の組織について病理標本を作成し、鏡検を実施した。

副腎、大動脈、骨 (関節を含む)、骨髓、脳 (大脳、脳幹、小脳)、盲腸、子宮頸部、凝固腺、結腸、脳神経-視神経、十二指腸、精巣上体、食道、眼球、肉眼的病変部位、心臓、回腸、空腸、腎臓、涙腺/ハーダー腺、喉頭、肝臓、肺、乳腺 (雌のみ)、縦隔リンパ節、縦隔組織、腸間膜リンパ節、腸間膜組織、鼻孔組織/咽頭、口腔組織、卵巣、卵管、膀胱、上皮小体、

末梢神経—脛骨、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺、精囊、骨格筋、皮膚及び皮下組織、脊髄（頸部、胸部、腰部）、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、気管、膀胱、子宮、膈

低用量及び中間用量群の全ての動物から、以下に示した肉眼的病変部位及び標的臓器の可能性のある全ての組織について標本を作成し、鏡検を実施した。

甲状腺、腸間膜及び縦隔リンパ節、喉頭（雄のみ）、肺、眼球（雌のみ）、脾臓（雌のみ）、肝臓（雌のみ）、回腸及び空腸（雌のみ）

[非腫瘍性病変]

認められた主要な非腫瘍性病変を表1に示す。

<12ヵ月時>

検体投与に関連した影響として、500あるいは750 ppm群の雌雄において、甲状腺の濾胞上皮細胞における軽微から軽度の空胞化の発生頻度の増加、750 ppm群の雌雄の回腸のバイエル板でマクロファージ/組織球の集簇の発生頻度の増加が観察された。マクロファージ/組織球の集簇は限局性あるいは多発限局性で、その程度は軽微であった。

<24ヵ月時>

検体投与に関連した影響が500及び/あるいは750 ppm群の甲状腺、腸間膜リンパ節、縦隔リンパ節、脾臓（雌のみ）、肺（雌のみ）、回腸のバイエル板、眼（雌のみ）及び肝臓（雌のみ）で認められた。以下に個々の病変について示す。

甲状腺：500あるいは750 ppm群の雌雄の大半において軽微あるいは軽度の甲状腺濾胞上皮細胞の空胞化が認められ、投与に関連したものと考えられた。

リンパ節：750 ppm群の雄及び500あるいは750 ppm群の雌の腸間膜リンパ節では、中等度のマクロファージ/組織球の集簇の発生頻度の増加が認められ、統計学的に有意であり、検体投与に関連していると考えられた。軽微あるいは軽度のマクロファージ/組織球の集簇の発生頻度の減少が750 ppm群の雄、500あるいは750 ppm群の雌において認められ、統計学的有意差が認められた。これらの変化は、より重度の病変が高頻度で認められた結果と考えられた。50、250あるいは500 ppm群の雄では、対照群と比較して軽微なマクロファージ/組織球の集簇が高頻度で認められ、統計学的有意差が認められた。この軽微なマクロファージ/組織球の集簇の発生頻度の増加については、対照群に対して、これらの投与群で認められた軽度のマクロファージ/組織球の集簇の発生頻度が低いことに起因するものであり、検体投与に関連したものは考えられなかった。

500あるいは750 ppm群の雌の縦隔リンパ節では、軽微なマクロファージ/組織球の集簇の発生頻度の増加が認められ、検体投与に関連したものと考えられた。750 ppm群の雌の発生頻度の変化のみに統計学的有意差が認

められた。

脾臓：500あるいは750 ppm 群の雌では対照群と比較して白脾髄における多発性のマクロファージ／組織球の集簇の発生頻度の増加が認められ、検体投与に関連したものと考えられた。750 ppm 群の雌の発生頻度の変化のみに統計学的有意差が認められた。

回腸：500あるいは750 ppm 群の雌の回腸のバイエル板では多発性で軽微なマクロファージ／組織球の集簇がやや高頻度で認められた。統計学的有意差は認められなかったが、この変化は検体投与に関連したものと考えられた。

肺：750 ppm 群の雌の肺では多発性で軽微な肺胞マクロファージの集簇の発生頻度の増加が認められ、統計学的に有意であり、検体投与に関連したものと考えられた。

眼：750 ppm 群の雌では、対照群と比較して、両側性の、軽微から中等度の変性の発生頻度の増加が認められ、検体投与に関連したものと考えられた。両側性で軽度の網膜変性の発生頻度には統計学的有意差が認められた。また、750 ppm 群の雌では、多発限局性で軽微な網膜の空胞化が両側性で認められた。この変化には統計学的有意差が認められ、検体投与に関連したものと考えられた。

肝臓：500あるいは750 ppm 群の雌では、肝臓において好塩基性変異細胞数の減少が認められた。21個以上の好塩基性細胞巣を有する雌の頻度減少には統計学的有意差が認められた。好塩基性巣の毒性学的意義のある変化は通常、その発生頻度／数の増加と関連しているため、好塩基性細胞巣の発生頻度の減少は、毒性学的意義のないものと考えられた。

その他の所見は、対照群に対して減少であるか、その他の疾患過程あるいは疾病変化に対する二次的なものであるか、あるいは用量反応性が認められないために、検体投与との関連性はないと考えられた。

[腫瘍性病変]

認められた全ての腫瘍性病変を表2に示す。

750 ppm 群の雌では、対照群の雌と比較して、下垂体腺腫、下垂体腺腫あるいは下垂体癌の発生頻度が低く、統計学的有意差が認められた。この変化は本病変の発生頻度の通常範囲内での変動であり、毒性学的意義はないと考えられた。対照群と比較して、その発生頻度に有意な増加が認められた腫瘍はなかった。

以上の結果から、本剤のラットに対する24ヵ月間飼料混入投与による1年間反復経口投与毒性／発がん性併合試験における影響として、12ヵ月時には、500あるいは750 ppm 群の雌における心臓及び肝臓重量の増加、500あるいは750 ppm 群の雌雄における甲状

腺濾胞細胞の空胞化が認められた。24 ヶ月時には、500 あるいは 750 ppm 群の雄におけるわずかな体重低下、750 ppm 群の雌における心臓重量の増加、500 あるいは 750 ppm 群の雌雄における甲状腺濾胞細胞の空胞化、750 ppm 群の雄、500 あるいは 750 ppm 群の雌の腸間膜リンパ節におけるマクロファージ-組織球の集簇の増加が認められた。500 あるいは 750 ppm 群の雌ではまた、縦隔リンパ節、回腸のパイエル板及び脾臓のマクロファージ/組織球の集簇の発生頻度の増加及び/あるいは程度の増悪化、及び肝臓の好塩基性変異細胞巢の数の減少が認められた。さらに、750 ppm 群の雌では、肺における肺泡マクロファージの集簇、網膜変性/空胞化の発生頻度の増加が認められた。よって、投与に関連した影響が 50 あるいは 250 ppm 投与群の雌雄では観察されなかったため、無影響量 (NOEL) は 250 ppm (雄 10.8 mg/kg/day、雌 13.2 mg/kg/day) であると判断される。

また、催腫瘍性はないものと判断される。

[申請者注]

指針の1年間反復経口投与毒性/発がん性併合試験においては、1年間反復経口投与毒性検索のために設ける慢性毒性群(衛星群)に関し、最高用量群の動物数は雌雄各20匹以上と示されている。一方、当該試験はEPAの試験ガイドライン(OPPTS 870.4300 Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity)を基本に試験群が構成されており、衛星群の全群の動物数が雌雄各10匹で実施されている。なお、血液検査、尿検査の評価は、1年時に指針の通り各群雌雄各10匹で行っている。病理組織学的検査、眼科学的検査の評価は、発がん性群(主群)においても実施しており、1年時のみならず2年間にわたり慢性毒性の評価が各群雌雄50匹で行われている。以上のことから、本剤の慢性毒性は適切に評価されていると考えられる。

報告書中には無毒性量(NOEL)について記載されていないが、雌雄とも500ppm以上の投与群で体重、心臓あるいは肝臓などへの毒性影響が認められたことから、無毒性量は雌雄とも250ppm(雄:10.8mg/kg/day、雌:13.2mg/kg/day)であると判断した。

対照群と比較して有意差が認められた24ヶ月時における雄の50ppm群及び750ppm群の好塩基球の百分率の高値について、報告書中には750ppm群の記載はあるものの50ppm群の記載はない。50ppm群の好塩基球は750ppm群と同程度の変化であることから、750ppm群と同じく老齢雄ラットの自然発生的な疾病過程による変動であると考えられ、検体投与と関連性がないと考えた。

6ヶ月時における雌の250ppm群のMCV及びMCHについて報告書中には対照群と比較して統計学的に有意な低値と記載されているが、対照群より高値であることから、高値と記載した。また、対照群と比較して有意差が認められた6ヶ月時における雌の50ppm群及び250ppm群のMCVの変化について報告書中には250ppm群は記載があるものの50ppm群は記載がない。50ppm群のMCVの変化は250ppm群と同様に、500ppm群及び750ppm群には認め

られず、12、18 あるいは 24 ヶ月時にも認められなかったことから、検体投与と関連性のないと考えた。

表1 主要な非腫瘍性病変

検査時期	性別		雄					雌				
	投与量 (ppm)		0	50	250	500	750	0	50	250	500	750
12 ヵ月	甲状腺	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		空胞化、濾胞細胞、軽微	1	1	2	5	0	0	0	0	6↑	0
		空胞化、濾胞細胞、軽度	0	0	0	1	9↑	0	0	0	1	7↑
	回腸	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		マクロファージ-組織球の集簇、 ハイル板、限局性あるいは 多発性、軽微	1	3	2	3	5	1	2	3	3	9↑
最終屠殺・ 切迫殺	甲状腺	所見\検査動物数	48	49	48	49	49	50	50	50	48	49
		空胞化、濾胞細胞、軽微	3	2	4	28↑	8	0	0	0	40↑	14↑
		空胞化、濾胞細胞、軽度	0	0	0	6↑	29↑	0	0	0	3	27↑
		過形成、傍濾胞細胞、 限局性、軽微	3	5	3	4	12↑	4	6	6	2	4
		過形成、傍濾胞細胞、 多発限局性、軽微	16	22	24	20	5↓	2	2	3	2	1
	腸間膜リンパ節	所見\検査動物数	50	50	49	50	50	50	50	50	50	50
		マクロファージ-組織球の集簇、 多発限局性、軽微	21	36↑	35↑	32↑	5↓	15	15	12	2↓	3↓
		マクロファージ-組織球の集簇、 多発限局性、軽度	21	9	9	15	15	28	32	29	28	16↓
		マクロファージ-組織球の集簇、 多発限局性、中等度	1	1	1	0	26↑	5	3	5	19↑	27↑
	縦隔リンパ節	所見\検査動物数	48	50	49	49	50	48	50	48	50	50
		マクロファージ-組織球の集簇、 多発限局性、軽微	0	2	1	0	3	7	9	5	13	17↑
	脾臓	所見\検査動物数	50	31	30	24	50	50	50	50	50	50
		マクロファージ-組織球の集簇、 白髄；多発限局性、軽微	0	0	0	0	0	7	7	9	14	17↑
	回腸	検査数	50	50	49	48	50	50	50	50	50	50
		マクロファージ-組織球の集簇、 ハイル板、多発限局性、 軽微	1	3	3	1	3	2	2	1	8	7
	肺	所見\検査動物数	49	50	50	50	50	50	50	50	50	50
		肺マクロファージ-組織球の 集簇、多発限局性、軽微	0	0	1	0	0	10	4	3	6	26↑

対照群との有意差検定は Yates 連続修正カイニ乗検定を用いて行った (↑↓: P < 0.05)

a: 12ヵ月時については統計解析実施せず。

太字は投与と関連性があると考えられた値。

表1 主要な非腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別		雄					雌				
	投与量 (ppm)		0	50	250	500	750	0	50	250	500	750
最終屠殺・切迫殺	眼	所見\検査動物数	49	28	19	20	50	50	50	50	50	50
		変性;網膜;両側性;軽微	16	2	4	3	16	14	9	7	11	<u>22</u>
		変性;網膜;両側性;軽度	0	0	0	0	1	0	1	0	0	<u>12</u> ↑
		変性;網膜;両側性;中等度	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<u>2</u>
		空胞化;網膜;両側性;多発限局性;軽微	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<u>9</u> ↑
		所見\検査動物数	50	34	38	37	50	50	50	50	50	50
	肝臓	変異細胞巣;好塩基性;肝細胞;1~5	20	17	16	18	23	5	9	7	<u>23</u>	<u>25</u>
		変異細胞巣;好塩基性;肝細胞;6~10	13	3	7	2↓	12	6	5	4	11	12
		変異細胞巣;好塩基性;肝細胞;11~20	2	1	0	0	4	18	21	18	<u>10</u>	<u>5</u>
		変異細胞巣;好塩基性;肝細胞;21以上	0	0	0	0	0	15	13	15	<u>1</u> ↓	<u>0</u> ↓
		マクロファージ一組織球の集簇、多発限局性、軽微	28	11	<u>11</u> ↓	14	29	40	38	37	36	41
		所見\検査動物数	50	34	38	37	50	50	50	50	50	50

対照群との有意差検定はYates連続修正カイ二乗検定を用いて行った (↑↓: P < 0.05)

太字は投与と関連性があると考えられた値。

表2 腫瘍性病変

検査時期	性別		雄					雌					
	投与群 (ppm)		0	50	250	500	750	0	50	250	500	750	
最終屠殺・切迫殺	副腎	所見\検査動物数	50	25	20	17	50	50	11	13	16	50	
		腺腫、皮質	B	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
		神経節神経腫、髄質	B	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
		褐色細胞腫、髄質	B	7	1	2	1	3	1	0	0	0	1
		褐色細胞腫、髄質、 転移あり	M	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
		褐色細胞腫、髄質、 転移なし	M	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
		褐色細胞腫、2個、 髄質	B	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		褐色細胞腫、髄質	B M	7	3	3	2	4	1	1	0	0	1
	外耳道 皮脂腺	所見\検査動物数		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
		癌、転移あり	M	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	骨	所見\検査動物数		50	23	16	15	50	50	10	8	11	50
		骨肉腫、肋骨、 転移あり	M	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
		骨肉腫、脛骨、 転移なし	M	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
		骨肉腫、転移あり、 あるいはなし	M	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
	脳	所見\検査動物数		50	23	17	18	50	50	13	12	14	50
		星状膠細胞腫、皮質	B	1	0	1	1	0	2	0	0	0	0
		星状膠細胞腫、延髄	B	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
		星状膠細胞腫、中脳	B	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
		星状膠細胞腫、 様々な部位	B	1	0	1	2	0	2	0	0	1	0
		癌	M	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
		神経膠腫、小脳、 転移なし	M	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	子宮 頸部	所見\検査動物数		-	-	-	-	-	49	10	9	11	50
		腺癌、転移なし	M	-	-	-	-	-	0	0	1	0	0
		平滑筋肉腫、 転移なし	M	-	-	-	-	-	0	0	0	0	1
		間質細胞肉腫、 転移性	M	-	-	-	-	-	0	0	0	1	0
		間質細胞肉腫、 転移なし、原発性	M	-	-	-	-	-	1	0	0	0	1

対照群との有意差検定は Yates 連続修正カイ二乗検定を用いて行った (↑↓: P < 0.05)

B: 良性腫瘍、M: 悪性腫瘍

表2 腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別		雄					雌					
	投与群 (ppm)		0	50	250	500	750	0	50	250	500	750	
最終屠殺・切迫殺	脳神経	所見\検査動物数	50	24	16	15	50	50	10	8	11	50	
	視神経	癌 M	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
	心臓	所見\検査動物数		49	24	17	16	50	50	10	8	12	50
		線維肉腫 M		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
		血管肉腫、心房、 転移なし M		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		シュワン細胞腫 B		0	0	0	0	0	1	0	0	1	2
	造血/ リンパ系	所見\検査動物数		11	17	15	12	10	6	11	10	7	9
		白血病、顆粒性大 リンパ球 M		11	17	15	12	8	6	11	10	5	9
		リンパ肉腫 M		0	0	0	0	2	0	0	0	2	0
	腎臓	所見\検査動物数		50	25	23	19	50	50	10	9	12	50
		移行上皮癌、腎盂、 転移なし M		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	肝臓	所見\検査動物数		50	34	38	37	50	50	50	50	50	50
		組織球肉腫、転移あり M		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
		腺腫、肝細胞 B		1	0	1	2	1	4	0	2	0	0
		癌、肝細胞、転移なし M		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
		腺腫あるいは癌、 肝細胞 B M		1	0	1	3	1	4	0	2	0	0
	肺	所見\検査動物数		49	50	50	50	50	50	50	50	50	50
		褐色細胞腫、転移性 M		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
		腺癌、転移なし M		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
		腺腫、細気管支肺胞 上皮 B		0	0	2	1	0	1	0	1	1	0
		癌、傍濾胞細胞、 転移性 M		0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
		線維肉腫 M		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
		骨肉腫 M		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	縦隔 リンパ節	所見\検査動物数		48	50	49	49	50	48	50	48	50	50
		癌、傍濾胞細胞、 転移性 M		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
		癌、転移なし M		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
種々の リンパ節	所見\検査動物数		1	1	0	1	4	0	1	1	0	1	
	扁平上皮癌、鼠径部 M		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	線維肉腫、鼠径部 M		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	

対照群との有意差検定は Yates 連続修正カイ二乗検定を用いて行った (↑: P < 0.05)

B: 良性腫瘍、M: 悪性腫瘍

表2 腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別		雄					雌					
	投与群 (ppm)		0	50	250	500	750	0	50	250	500	750	
最終層殺・切迫殺	乳腺	所見\検査動物数	22	11	17	16	25	50	16	17	20	49	
		腺癌、転移なし	M	0	0	0	1	1	1	-	-	2	1
		腺腫	B	-	-	-	-	-	2	0	0	1	1
		線維腺腫	B	2	0	2	4	1	10	3	5	6	8
		線維腺腫、2個	B	-	-	-	-	-	1	0	2	0	1
		線維腺腫、様々な個数	B	2	0	2	4	1	11	3	7	6	9
		線維腫、背部	B	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0
		線維腫、腋窩	B	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
		線維腫、鼠径部	B	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0
		線維腫、胸部	B	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
		線維腫、様々な部位	B	1	0	3	3	2	1	1	0	0	0
	縦隔組織	所見\検査動物数		50	25	20	19	50	48	13	11	16	50
		組織球肉腫	M	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
		神経線維肉腫、転移あり	M	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
		線維肉腫、転移あり	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	腸間膜組織	所見\検査動物数		50	26	21	17	50	50	21	20	20	50
		平滑筋肉腫、低分化、転移あり	M	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		骨肉腫	M	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	多臓器	所見\検査動物数		6	6	6	7	10	2	1	0	1	0
		癌肉腫	M	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
		腺癌	M	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
		癌、低分化	M	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
		平滑筋肉腫	M	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		中皮腫、転移あり	M	0	1	0	0	3	0	0	0	0	0
		中皮腫、転移なし	M	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0
		中皮腫、転移あり、あるいはなし	M	1	2	2	1	3	0	0	0	0	0
	扁平上皮癌、転移あり	M	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
	口腔組織	所見\検査動物数		50	23	16	15	50	50	10	8	11	50
		扁平上皮癌、口蓋、転移なし	M	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

対照群との有意差検定は Yates 連続修正カイニ乗検定を用いて行った (↑↓: P < 0.05)

B: 良性腫瘍、M: 悪性腫瘍

表 2 腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別		雄					雌					
	投与群 (ppm)		0	50	250	500	750	0	50	250	500	750	
最終屠殺・切迫殺	卵巢	所見\検査動物数	-	-	-	-	-	50	12	8	13	50	
		腺癌、嚢胞、 転移なし	M	-	-	-	-	0	0	0	1	0	
		性腺間質腫	B	-	-	-	-	0	1	0	0	1	
		顆粒膜細胞腫、 転移なし	M	-	-	-	-	0	1	0	0	0	
	脾臓	所見\検査動物数		49	23	17	19	50	50	10	9	11	50
		腺腫、島細胞	B	9	2	2	5	6	0	0	1	0	0
		腺腫、2個、島細胞	B	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0
		癌、島細胞、 転移なし	M	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
		腺腫あるいは癌、 島細胞	B M	9	2	4	5	9	1	0	1	0	0
	下垂体	所見\検査動物数		49	39	34	36	50	50	36	35	37	50
		腺腫、末端部	B	34	26	25	23	36	32	25	22	27	20 ↓
		腺腫、中間部	B	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
		腺腫、2個、末端部	B	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0
		癌、末端部、 転移なし	M	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
		腺腫あるいは癌、 末端部	B M	34	26	25	23	36	35	25	23	29	20 ↓
	包皮/ 陰核腺	所見\検査動物数		4	7	8	7	3	3	3	3	5	1
		扁平上皮乳頭腫	B	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
		癌、転移なし	M	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0
	前立腺	所見\検査動物数		50	23	17	18	50	-	-	-	-	-
		腺癌、転移なし	M	1	0	0	0	2	-	-	-	-	-
	直腸	所見\検査動物数		50	23	16	15	50	50	10	8	11	50
		平滑筋腫	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	唾液腺	所見\検査動物数		49	26	16	15	50	50	9	8	12	50
		扁平上皮癌、 転移あり	M	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
皮膚 及び 皮下 組織	所見\検査動物数		50	36	37	37	50	50	41	40	37	50	
	組織球肉腫、鼠径部、 転移なし	M	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	腺腫、背部、皮脂腺	B	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
	基底細胞腺腫、口唇	B	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	

対照群との有意差検定は Yates 連続修正カイ二乗検定を用いて行った (↑↓: P < 0.05)

B: 良性腫瘍、M: 悪性腫瘍

表 2 腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別		雄					雌					
	投与群 (ppm)		0	50	250	500	750	0	50	250	500	750	
最終屠殺・切迫殺	皮膚及び皮下組織	基底細胞腺腫、鼻口部	B	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		基底細胞腺腫、頸部	B	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
		基底細胞癌、腹部	B	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		基底細胞腺腫あるいは癌、様々な部位	B	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0
		癌、低分化、前肢、転移あり	M	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
		線維腫、腹部	B	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
		線維腫、背部	B	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
		線維腫、眼瞼	B	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
		線維腫、下腿	B	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
		線維腫、前肢	B	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		線維腫、胸部	B	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
		線維肉腫、腋窩、転移なし	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
		線維肉腫、背部、転移なし	M	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
		線維肉腫、鼠径部、転移あり	M	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
		線維肉腫、鼠径部、転移なし	M	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
		線維腫あるいは線維肉腫、様々な部位	B M	0	1	0	2	2	1	2	1	1	3
		線維性組織球腫、背部、転移なし	M	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		血管腫、鼠径部	B	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
		血管外皮腫、鼻口部	B	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
		角化棘細胞腫	B	0	1	1	0	2	0	0	0	0	0
		角化棘細胞腫、背部	B	3	1	0	0	1	0	0	0	0	1
		角化棘細胞腫、後肢	B	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		角化棘細胞腫、包皮	B	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
角化棘細胞腫、尾	B	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
角化棘細胞腫、胸部	B	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0		
角化棘細胞腫、様々な部位	B	6	2	2	0	3	1	0	1	0	1		

対照群との有意差検定は Yates 連続修正カイ二乗検定を用いて行った (↑↓: P < 0.05)

B: 良性腫瘍、M: 悪性腫瘍

表 2 腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別		雄					雌					
	投与群 (ppm)		0	50	250	500	750	0	50	250	500	750	
最終屠殺・切迫殺	皮膚及び皮下組織	脂肪腫、頸部	B	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
		脂肪腫、胸部	B	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
		脂肪腫、様々な部位	B	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
		粘液肉腫、転移なし	M	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
		神経線維腫、後肢	B	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		神経線維腫、鼠径部	B	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		神経線維腫、耳介	B	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
		神経線維肉腫、耳、転移なし	M	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
		神経線維肉腫、前肢、転移なし	M	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
		神経線維腫あるいは神経線維肉腫、様々な部位	B M	0	1	0	2	1	0	0	1	0	0
		乳頭腫、背部	B	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		乳頭腫、下腿	B	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
		乳頭腫、口唇	B	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
		乳頭腫、尾	B	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
		乳頭腫、様々な部位	B	1	0	0	1	2	1	0	1	0	1
		肉腫、低分化、背部、転移なし	M	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
		肉腫、低分化、後肢、転移あり	M	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		肉腫、低分化、様々な部位、転移ありあるいはなし	M	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
		扁平上皮癌、外耳道、転移なし	M	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
		扁平上皮癌、鼠径部、転移なし	M	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	扁平上皮癌、陰囊、転移あり	M	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	扁平上皮癌、様々な部位、転移あり、あるいはなし	M	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
	脊髄	所見\検査動物数	M	50	23	16	15	50	50	10	8	11	50
シュワン細胞腫、腰部白質		B	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	

対照群との有意差検定は Yates 連続修正カイニ乗検定を用いて行った (↑: P < 0.05)

B: 良性腫瘍、M: 悪性腫瘍

表2 腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別		雄					雌				
	投与群 (ppm)		0	50	250	500	750	0	50	250	500	750
最終屠殺・切迫殺	脾臓	所見\検査動物数	50	31	30	24	50	50	50	50	50	50
		肉腫、低分化、 転移なし	M	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	精巣	所見\検査動物数	50	49	48	45	50	-	-	-	-	-
		間細胞腺腫、片側性	B	6	11	9	13	9	-	-	-	-
		間細胞腺腫、両側性	B	32	27	30	27	32	-	-	-	-
		間細胞腺腫、片側性 あるいは両側性	B	38	38	39	40	41	-	-	-	-
	甲状腺	所見\検査動物数	48	49	48	49	49	50	50	50	48	49
		腺腫、濾胞細胞	B	0	2	1	0	1	0	0	0	1
		癌、濾胞細胞、 転移なし	M	1	0	0	0	1	1	1	0	0
		腺腫あるいは癌、 濾胞細胞	B M	1	2	1	0	2	1	1	0	1
		腺腫、傍濾胞細胞	B	9	2	7	7	9	5	6	4	7
		腺腫、2個、 傍濾胞細胞	B	0	0	1	0	1	0	0	1	0
		癌、傍濾胞細胞、 転移あり	M	0	0	0	1	0	1	0	0	0
		癌、傍濾胞細胞、 転移なし	M	2	0	0	0	0	3	0	1	0
		腺腫あるいは癌、 傍濾胞細胞	B M	11	2	8	8	10	9	6	6	7
	舌	所見\検査動物数	0	1	2	1	0	1	0	3	0	0
		乳頭腫	B	0	0	0	0	0	1	0	0	0
		扁平上皮癌、転移 なし	M	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	膀胱	所見\検査動物数	50	24	16	15	50	50	10	8	11	50
		乳頭腫、移行上皮	B	0	1	0	0	0	0	0	0	0
子宮	所見\検査動物数	-	-	-	-	-	50	30	25	25	50	
	癌肉腫、転移なし	M	-	-	-	-	0	0	0	1	0	
	腺癌、転移あり	M	-	-	-	-	2	0	0	0	0	
	腺癌、転移なし	M	-	-	-	-	0	0	1	1	0	
	腺癌、転移あり、 あるいはなし	M	-	-	-	-	2	0	1	1	0	

対照群との有意差検定は Yates 連続修正カイニ乗検定を用いて行った (↑: P < 0.05)

B: 良性腫瘍、M: 悪性腫瘍

表2 腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性別		雄					雌					
	投与群 (ppm)		0	50	250	500	750	0	50	250	500	750	
最終屠殺・切迫殺	子宮	子宮内膜間質ポリープ	B	-	-	-	-	-	15	16	12	9	14
		子宮内膜間質ポリープ、2個	B	-	-	-	-	-	2	5	3	1	4
		子宮内膜間質ポリープ、3個	B	-	-	-	-	-	1	0	1	0	0
		子宮内膜間質ポリープ、様々な個数	B	-	-	-	-	-	18	21	16	10	18
		平滑筋腫	B	-	-	-	-	-	1	1	0	0	0
		平滑筋肉腫、転移なし	M	-	-	-	-	-	0	1	0	1	1
		平滑筋腫あるいは平滑筋肉腫	B M	-	-	-	-	-	1	2	0	1	1
		間質細胞肉腫、原発性	M	-	-	-	-	-	1	0	0	0	0
		間質細胞肉腫、転移あり、原発性	M	-	-	-	-	-	0	0	0	1	0
		間質細胞肉腫、転移なし、原発性	M	-	-	-	-	-	0	0	1	0	0
	間質細胞肉腫、転移あり、あるいはなし、原発性	M	-	-	-	-	-	0	0	1	1	0	
	膈	所見\検査動物数		-	-	-	-	-	50	9	8	10	50
		線維肉腫	M	-	-	-	-	-	0	0	0	0	1
		平滑筋肉腫、転移なし	M	-	-	-	-	-	0	0	0	0	1
ポリープ		B	-	-	-	-	-	1	0	0	0	0	
間質細胞肉腫		M	-	-	-	-	-	1	0	0	0	0	
合計	検査動物数		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
	腫瘍数	良性	111	80	91	96	113	89	59	59	58	62	
		悪性	22	24	20	24	27	24	24	18	22	22	
	腫瘍総数		133	104	111	120	140	113	83	77	80	84	
	担腫瘍動物数	良性	49	50	48	48	47	45	42	37	36	37	
		悪性	18	22	19	19	21	17	19	13	16	17	
担腫瘍動物数		49	50	50	48	50	47	45	44	43	42		

対照群との有意差検定はYates連続修正カイ二乗検定を用いて行った (†: P < 0.05)

B: 良性腫瘍、M: 悪性腫瘍

(2) スピネトラム原体のイヌを用いた飼料混入投与による1年間反復経口投与毒性試験
(資料 7-2)

試験機関: The Dow Chemical Company
[GLP 対応]

報告書作成年: 2006年

検体純度:

供試動物: ビーグル犬、1群雌雄各4匹、開始時約6ヵ月齢

投与期間: 1年間(雄: 2005年5月10日~2006年5月9日、雌: 2005年5月11日~2006年5月10日)

投与方法: 検体を0、50、100及び200 ppmの濃度で飼料に混入し、1年間にわたって随時摂食させた。検体を混入した飼料は2週間に1回調製した。

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、ケージ外からの観察を1日2回、全身状態や死亡状況、飼料及び水の摂取状況を1日2回以上観察した。さらに、投与前ならびに試験期間中は週1回の頻度で、詳細な臨床観察(DCO)検査を行った。試験期間中、死亡は認められなかった。ケージ外からの観察あるいは詳細な臨床観察で検体投与に関連した所見は認められなかった。軟/水様便、皮膚炎、過度の脱毛、剥離、鱗屑、発赤、肥厚した及び/あるいは炎症を起こした皮膚、皮膚の丘疹/膿疱、臍ヘルニア、指趾間部の嚢胞、粘膜の発赤、触診できる腫瘤及び雌の生殖器系の変化が散発的に認められたが、いずれもイヌの正常範囲内での変化であり、検体投与と関連性はないと考えられた。

眼科学的検査; 投与前及び剖検前に、倒像検眼鏡により全動物の眼を検査した。

検体投与に関連した所見は認められなかった。投与前及び投与後に網膜のタペタム領域における色素、眼底の色素沈着減少、網膜壁、脈絡網膜炎及び/あるいは視神経円板(乳頭)における小乳頭が認められたが、自然発生的な所見と

考えられた。

体重変化；投与前、及び最初の13週間は週1回、その後は少なくとも月1回全ての動物の体重を測定した。また、体重増加量を算出した。

体重及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。

摂餌量；全動物の摂餌量を投与前、及び最初の13週間は週1回、その後は約1ヵ月の間隔で測定した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた期間を下表に示す。

性別	雄		
	50	100	200
投与量 (ppm)			
337~344 日目	↑139	↑136	121

Dunnett 検定 ↑ : $\alpha = 0.05$ で対照群と有意差あり

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。

試験337~344日目に、50及び100ppm群の雄の平均摂餌量において対照群と比較して統計学的に有意な高値が認められた。この変化は一時的なもので、用量反応性がないことから、検体投与と関連性のないものと考えられた。したがって、摂餌量に検体投与に関連した有害影響は認められなかった。

検体摂取量；投与前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)		50	100	200
検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	1.57	2.96	5.36
	雌	1.31	2.49	5.83

血液学的検査；投与前、投与後3及び6ヵ月目、剖検の前の週に全絶食動物を対象として、頸静脈から血液を採取し、以下の項目の測定を行った。

ヘマトクリット値、血色素量、赤血球数、総白血球数、白血球分類値、血小板数、網状赤血球数、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、プロトロンビン時間

対照群と比べて差の認められた項目 (統計学的有意差なし) を下表に示す。

性別	平均赤血球数				
	投与量 (ppm)	投与前	3 ヶ月	6 ヶ月	12 ヶ月
雄	50				
	100				
	200	93	94	91	93
	平均血色素量				
	投与量 (ppm)	投与前	3 ヶ月	6 ヶ月	12 ヶ月
	50				
	100				
	200	93	93	89	91
	平均ヘマトクリット値				
	投与量 (ppm)	投与前	3 ヶ月	6 ヶ月	12 ヶ月
	50				
	100				
	200	94	94	90	92
	平均網状赤血球数				
	投与量 (ppm)	投与前	3 ヶ月	6 ヶ月	12 ヶ月
50					
100					
200	95	81	72	60	

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。

いずれの投与群の雌雄の、いずれの血液学的パラメーターにも統計学的有意差の認められた変化はなかった。200 ppm 投与群の雄において、3、6 及び 12 ヶ月目の試料採取時に平均赤血球数 (3 ヶ月; $7.45 \times 10^6/\mu\text{L}$ 、6 ヶ月; $7.46 \times 10^6/\mu\text{L}$ 、12 ヶ月; $7.72 \times 10^6/\mu\text{L}$)、血色素量 (3 ヶ月; 16.6g/dL、6 ヶ月; 16.9g/dL、12 ヶ月; 17.7g/dL)、ヘマトクリット値 (3 ヶ月; 48.8%、6 ヶ月; 49.8%、12 ヶ月; 51.9%) 及び網状赤血球数のわずかな低値が認められた。しかし、これらのパラメーターは (網状赤血球数を除いて)、投与前の試料採取時にも対照群と比較して低値であり、また、試験実施研究所で近年実施された背景値の範囲内 (平均赤血球数; 3 ヶ月 $6.17 \sim 7.71 \times 10^6/\mu\text{L}$ 、6 ヶ月 $6.92 \sim 7.35 \times 10^6/\mu\text{L}$ 、12 ヶ月 $7.14 \sim 7.43 \times 10^6/\mu\text{L}$ 、血色素量; 3 ヶ月 13.9~17.8 g/dL、6 ヶ月 15.9

～17.0 g/dL、12ヵ月 16.6～17.7 g/dL、ヘマトクリット値；3ヵ月 40.7～52.0%、6ヵ月 46.5～49.8%、12ヵ月 48.0～51.3%）であるか、あるいはわずかな高値であった。さらに、200 ppm 群のいずれの雄においても、投与に関連した骨髄における組織学的影響は認められなかった。したがって、平均赤血球数、色素量及びヘマトクリット値の低値は投与と関連性のないものと考えられた。200 ppm 群の雄の平均網状赤血球数は本試験における対照群より低値であった。しかし、個々の動物のデータを調べた結果、これらの変化は、投与前の時点を含む全ての試料採取時における2例の動物での低値を反映していることが示された。したがって、これらの変化もまた、他の赤血球パラメーターに投与に関連した変化が全く認められない事を特に考慮して、投与と関連性のないものと考えられた。

血液生化学検査；投与前、投与後3及び6ヵ月目、剖検の前の週に全絶食動物を対象として、頸静脈から血液を採取し、以下の項目の測定を行った。

アルカリ性ホスファターゼ (ALP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、 γ -グルタミルトランスアミナーゼ (GGT)、アルブミン (ALB)、コレステロール (CHOL)、クレアチニン (CREA)、電解質 (NA、K、PHOS、CL 及び CA)、グルコース (GLU)、総ビリルビン (TBIL)、総蛋白 (TP)、トリグリセライド (TRIG)、尿素窒素 (UN)、アルブミン/グロブリン比 (A/G)

いずれの投与群の雌雄の生化学的パラメーターにも検体投与に関連した変化は認められなかった。

尿検査；投与前、投与後3及び6ヵ月目、剖検の前の週に、動物を代謝ケージに約16時間入れて採取した尿について、以下の項目を検査した。

色調、外観、比重（屈折計）及び尿量、pH、ビリルビン、糖、蛋白、ケトン体、潜血、ウロビリノーゲン、尿沈査

いずれの投与群の雌雄の尿検査パラメーターにも検体投与に関連した変化は認められなかった。

臓器重量；試験366日目、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、肝臓（切開した胆嚢を含む）、腎臓、心臓、精巣、卵巣、精巣上体、子宮、脾臓、前立腺、下垂体、副腎及び甲状腺（上皮小体を含む）

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目あるいは検体投与に関連した変化が認められた項目を次頁表に示す。

肝臓 (雄)		
投与量 (ppm)	重量	対体重比
50		
100		
200	<u>118</u>	<u>119</u>
脳 (雌)		
投与量 (ppm)	重量	対体重比
50		
100		
200	↓ 86	

Dunnett 検定 ↓ : $\alpha = 0.05$ で対照群と有意差あり

太字は投与に関連すると考えられた影響を示す。

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。

200 ppm 群の雄の肝臓の平均絶対重量及び対体重比はそれぞれ対照群より 17.7%及び 19.4% 高値であった。肝重量の高値に統計学的有意差はなかったが、肝臓の平均絶対重量 (314.48 g) は試験実施研究所で近年実施された試験の背景値の範囲 (253.98~283.13 g) を上回るものであった。従って、肝重量の高値は検体投与に関連したものと考えられた。しかし、対応する臨床検査における変化あるいは組織学的変化が全く認められないことから、肝重量の高値の毒性学的意義は極めて低いと考えられた。

200 ppm 群の雌の脳の平均絶対重量は対照群と比較して統計学的に有意な低値であった。この変化は主に、体重が最高値で脳の絶対重量が最低値を示した雌 1 例を反映したものであった。200 ppm 群の他の雌 3 例の脳の絶対重量は 70.3~72.3 g であり、これは本試験の対照群よりわずかに低値であったが、背景値 (72.7~75.2 g) と同程度であった。さらに、雌の脳の対体重比には用量反応性がなく、いずれの投与群の雌雄の脳にも投与に関連した組織学的変化は認められなかった。したがって、200 ppm 群の雌の脳の平均絶対重量の低値は検体投与と関連性のないものと考えられた。

肉眼的病理検査；試験 366 日目、全動物について剖検を行った。

肉眼的病理所見は全て、検体投与と関連性のない、自然発生的な変化と考えられた。

病理組織学的検査；全動物を対象として以下の組織について病理標本を作製し、鏡検を行った。

副腎、大動脈、骨（関節を含む）、骨髄、脳（大脳、脳幹、小脳）、盲腸、子宮頸部、脳神経－視神経、結腸、十二指腸、精巣上体、食道、眼球、胆嚢、肉眼的病変部位、心臓、回腸、空腸、腎臓、喉頭、肝臓、肺、乳腺（雌のみ）、縦隔リンパ節、縦隔組織、腸間膜リンパ節、腸間膜組織、鼻孔組織／咽頭、口腔組織、卵巣、卵管、脾臓、上皮小体、末梢神経－脛骨、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺、骨格筋、皮膚及び皮下組織、脊髄（頸部、胸部、腰部）、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、舌、扁桃、気管、膀胱、子宮、膣

認められた主要な病理組織学的所見を表1に示す。

200 ppm 群の雄1例及び雌1例における動脈炎は、唯一認められた投与に関連した病理組織学的影響であった。動脈炎は200 ppm 群の雄1例の両側の精巣上体、200 ppm 群の雌1例の胸腺、甲状腺、喉頭及び膀胱で認められた。動脈炎は、影響の認められた動物の全例において動脈壁の壊死を伴い、遺伝的素因を持ったビーグル犬における自然発生的な動脈炎が投与に関連して増悪化されたものと考えられた。自然発生的に生ずる動脈炎は、実験動物であるビーグル犬においてかなり一般的に認められる症候群であるが、その原因は不明である (Snyder et al, 1995)。しかし、ビーグル犬を用いた試験により、これらの病変に遺伝的素因（傾向）が認められ (Ruben et al, 1989; Son, 1994)、その結果、そのような素因を持ったイヌにおいて、様々な種類の毒性レベルの実験化合物での処理により、潜在化している状態が発現する可能性のあることが示唆された (Hayes et al, 1989)。同様にスピネトラムを用いた本試験により、300 および 900ppm は、このような素因を持った動物において動脈炎の発現を高める引き金要因となる可能性のある毒性用量であることが証明された。

また、精巣上体の動脈炎が、100 ppm 群の雄1例（軽度）及び対照群の雄1例（軽微）において片側性で認められた。これらの2例で認められた動脈炎は片側性でその程度は軽度であり、試験実施研究所の対照群のビーグル犬におけるこの病変の背景値の発生頻度内（表2）であり、また、文献における対照値に一致したものであった。

[申請者注]高用量投与群において血管炎もしくは血管周囲炎のような血管異常の認められた組織について、血管異常の認められていない動物から作製された病理組織標本を含め、全ての病理組織標本は適切な血管を含んでおり、これらの病理組織学的検査の結果、雌雄各群において投与と関連する血管異常は認められなかったことを確認した。

したがって、これらの動物で認められた動脈炎は投与と関連性のないものと考え

えられた。また、全ての投与群におけるその他の病理組織学的所見は全て、検体投与と関連性のない自然発生的な変化と考えられた。

表 1. 主要な病理組織学的所見 (動脈炎)

性別	雄				雌			
	0	50	100	200	0	50	100	200
投与量 (ppm)	0	50	100	200	0	50	100	200
動物数	4	4	4	4	4	4	4	4
精巣上体; 慢性炎症 -軽微	1	0	0	0	-	-	-	-
精巣上体; 慢性活動性炎症、 -軽度 -中等度	0	0	1	0	-	-	-	-
	0	0	0	<u>1</u>	-	-	-	-
喉頭; 慢性炎症 -軽微	0	0	0	0	0	0	0	<u>1</u>
胸腺; 慢性炎症 -軽度	0	0	0	0	0	0	0	<u>1</u>
甲状腺; 慢性炎症 -軽微	0	0	0	0	0	0	0	<u>1</u>
膀胱; 慢性炎症 -軽微	0	0	0	0	0	0	0	<u>1</u>

太字は投与に関連すると考えられた影響を示す。

- 該当なし

表 2. 精巣上体の動脈炎の発生頻度の背景値

試験 1、28 日間、経路 - 強制経口、2006	対照群の雄 2 例中、精巣上体の動脈炎の認められた例数 0
試験 2、28 日間、経路 - 飲水、2006	対照群の雄 2 例中、中等度の片側性の精巣上体の慢性活動性動脈炎の認められた例数 1
試験 3、90 日間、経路 - 混餌、2005	対照群の雄 4 例中、精巣上体の動脈炎の認められた例数 0
試験 4、90 日間、経路 - 混餌、2005	対照群の雄 4 例中、軽度の片側性の精巣上体の慢性活動性動脈炎の認められた例数 1

以上の結果から、本剤のイヌを用いた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、200 ppm 群の雄において肝臓の絶対重量及び対体重比の高値が認められた。また、投与に関連していると考えられる動脈壁の壊死を伴う動脈炎が 200 ppm 群の雄 1 例及び雌 1 例で認められた。したがって、無影響量 (NOEL) *は雌雄とも 100 ppm (雄 2.96 mg/kg/day、雌 2.49 mg/kg/day) であると判断される。

* 申請者注：報告書中には無毒性量 (NOEL) について記載していないが、雌雄とも 200 ppm の投与群で動脈壁の壊死を伴う動脈炎が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 100 ppm (雄 2.96 mg/kg/day、雌 2.49 mg/kg/day) であると判断した。