

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

(3) 皮膚感作性

モルモットを用いた皮膚感作性試験

[資料 No. 8]

試験機関:

報告書作成年:

検体の純度:

供試動物: アルビノモルモット

体重 275~350 g、投与群 20 匹、対照群 10 匹

投与方法: 検体は Freud's adjuvant (Difco) に混入して投与した。

最終濃度は 0.5 % とし、全操作は Magnusson, B. 及び A. M. Kligman の記載 (The Journal of Investigat. Dermatology 52, 268-276 (1969): "The Identification of the Contact Allergens by Animal Assay, the Guinea Pig Maximization Test") と同様とした。

観察項目: 一般症状、生死及び適用部位の紅斑・浮腫の有無について観察した。

結果: 投与群の 4 例が 8 及び 9 日目に死亡し、他の 2 例が処理 24 及び 48 時間後に死亡した。

皮膚感作率は 0/16 であり、投与動物に薬物に対する反応は認められなかった。

以上の結果から、チオシクロラム原体の皮膚感作性はないと判断される。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

(4) 神経毒性

急性神経毒性試験

試験未実施：

90 日間反復経口投与神経毒性試験成績 [資料 No. 15] からの考察で対応。

ラットを用いた飼料混入投与による 90 日間反復経口投与神経毒性試験で神経毒性を示す所見がなく、かつ、既知神経毒性物質と化学的構造相関がないことから、当該試験を実施しなかった。

下記に、ラットを用いた飼料混入投与による 90 日間反復経口投与神経毒性試験の概要ならびに総合考察を記載する。

チオシクロラム 0、100、200 及 400 ppm の濃度 (♂ 6.6、13.0、26.9mg/kg ♀ 7.7、14.9、31.5 mg/kg) で飼料に混入し、ラットに 90 日間にわたって随時摂取させた反復経口投与神経毒性において、神経毒性を示唆する所見はない。

したがって、チオシクロラムは急性神経毒性を有さないものと判断された。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

ニワトリのひなを用いた急性遅発性神経毒性試験

[資料 No. 9]

試験機関：

報告書作成年：

検体の純度：

供試動物：ニワトリのひな 1群 20匹

観察期間：2ヵ月間

投与方法：検体をDMSOで希釈し、ゼラチンカプセルにつめて、40 mg/kgを投与した。  
0-Tricresylphosphate (TOCP)を陽性対照として投与した(2×800 mg/kg)。

試験項目：一般症状及び生死について2ヶ月間観察した。また、全例とも2ヶ月の期間中に10回体重を測定した。

結果：

一般症状及び死亡率；

投与1～16時間に軽度の中毒症状(中毒症状の詳細に関しては、原文に記載なし)が20例中17例に認められ、3例は8時間後に死亡した。その後のひなの行動は正常であった。また、麻痺は1例も認めなかった。

TOCP投与群では、投与12日間には中毒症状なかった。その後に行動変化が始まり、情緒不安・不穏(restlessness)とめまい感(giddiness)を示した。その後、運動失調が進行し、直立不能となり、最終的に全例とも完全に麻痺した。

体重変化；

チオシクロラム投与群の体重増加は正常であったが、TOCP投与群では投与14日後には減少した。

以上のように、チオシクロラムはニワトリのひなに対して2ヶ月の観察期間中に遅発性神経毒性の徴候を示さなかった。

【申請者注】

一般毒性の無毒性量は <40 mg/kg と考察した。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

(5) 亜急性毒性

ウサギの非擦過及び擦過皮膚への処理による 2 週間経皮毒性試験

[資料 No. 10]

試験機関：

報告書作成年：

検体の純度：

供試動物：

ウサギ 1 群雌雄各 5 匹

投与開始時体重；非擦過群 雄 2.16～2.70 kg、雌 2.20～2.74 kg

擦過群 雄 2.25～2.92 kg、雌 2.38～3.00 kg

投与期間：2 週間（10 回処理）

処理濃度及び処理法：

検体処理に先立ち、初回検体処理前 24 時間及び処理後 1 週間に、所定の背部位を剪毛した。擦過群の場合には、約 5 cm<sup>2</sup> の剪毛部位をサンドペーパーで擦過した。この擦過処理を初回直前及び 1 週間後の 2 回行った。

非擦過群及び擦過群ともに、0、0.5 及び 2.0 mg/kg/day を所定の検体水溶液を剪毛した背部位に処理した（10 回処理/2 週間）。対照群には検体を含まない水を同様に処理した。処理後処理部位を絆創膏で覆い、その上をプラスチック製カバーで 1 日 8 時間保護した。8 時間経過後、全ての覆いを除去したが、処理部の洗浄は行わなかった。

試験項目及び結果：

一般症状、死亡、摂餌量及び飲水量；

一般症状及び生死を 2 週間毎日観察し、摂餌量及び飲水量を測定した。

非擦過群及び擦過群ともに、死亡はなく、処理に伴う一般症状の変化はみられなかった。摂餌及び飲水にも影響はみられなかった。

体重変化；

処理開始前、処理後 1 週及び試験終了時に体重測定を行った。

平均体重及び 12 日後の体重増加量の変化を次表に示す。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

単位：g

性別	測定	非擦過群、mg/kg/day			擦過群、mg/kg/day		
		0	0.5	2.0	0	0.5	2.0
雄	0日						
	5日						
	12日						
	増加量						
雌	0日						
	5日						
	12日						
	増加量						

\*：P<0.05 (Dunnettの多重比較検定)：申請者にて実施

非擦過群の2.0 mg/kg/day 群雄では体重増加抑制がみられたが、雌では明確ではなかった。擦過群においては、特に対照群雄に体重増加抑制みられ、各処理群では体重が増加した。一方、雌では体重増加抑制がみられた。

これらの非擦過及び擦過群における結果を比較して考慮すると、投与の体重への一貫性のある明確な影響があるとは考えられなかった。

#### 血液学的検査；

処理開始前及び終了時に採血し、ヘマトクリット値、ヘモグロビン、赤血球数、MCV、MCH、MCHC、総白血球数、白血球百分率について検査を行った。

非擦過群の2.0 mg/kg/day 雌で、処理開始前にリンパ球の減少及び分葉核好中球の増加がみられたが、処理後2週には対照群と同等となった。擦過群では、2.0 mg/kg/day 雌でヘモグロビンの減少及び分葉核好中球 (segments) の増加がみられたが、いずれも対照群と同等であり、一定の傾向はみられず、病理性的な変化もみられなかった。

#### 血液生化学的検査；

処理開始前及び終了時に採血し、血漿コリンエステラーゼ、赤血球コリンエステラーゼ、GPT(ALT)、アルカリホスファターゼ、血漿グルコース、血漿尿素窒素、血漿総蛋白、血清アルブミン、血漿総コレステロールについて検査を行った。

非擦過群の0.5及び2.0 mg/kg/day 雌雄で、GPT(ALT)及びアルカリホスファターゼが処理後2週時に増加したが、対照群も同様に増加した。2.0 mg/kg/day 雄

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

全例の総コレステロールが増加したが、雌ではそのような変化はみられなかった。更に、下記するように擦過群ではこのような変化はみられなかった。これらを除き、その他の項目には変動はみられなかった。

擦過群では、アルカリホスファターゼが 0.5 mg/kg/day 群雄及び 2.0 mg/kg/day 雌の各 1 例でやや低かったが、その値は処理開始前の対照群と同程度であった。これを除き、その他の項目に変動はみられなかった。

以上のことから、項目に散発的に、かつ個体別に変動がみられる場合があったが、処理量及び処理時期との関連、あるいは擦過の有無における関連性はみられないことから、これらの変動は投与による影響とは考えられなかった。

肉眼的病理検査及び臓器重量；

試験終了時、全動物を屠殺、剖検後、下記の臓器の重量を測定した。なお、各臓器の体重相対比を算出した。

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

非擦過及び擦過群いずれの場合も、投与に起因すると考えられる肉眼的病理所見はみられなかった。

臓器重量では、非擦過群の場合において 0.5 及び 2.0 mg/kg/day 群雄の肝臓重量（実重量及び体重相対比）が、対照群に比べ明らかに低下した。これを除き、その他の臓器重量には投与の影響と考えられる変動はみられなかった。一方、擦過群の場合では、2.0 mg/kg/day 群雄の前立腺重量（実重量及び体重相対比）が、対照群に比べ増加した。また、同群雄の心臓重量（体重相対比）が減少した。0.5 mg/kg/day 群雌の脳重量（実重量）が高かった。しかしながら、擦過の有無における一貫性はみられず、いずれも対照群と同等であり、投与による変動とは考えられなかった。

以上の結果から、いずれの検査項目でも、非擦過及び擦過処理において検体投与に起因すると判断される一貫性のある影響は認められないことから、本試験における無毒性量は、非擦過群及び擦過群ともに 2.0 mg/kg であると推定される。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

ラットを用いた3ヵ月間混餌投与毒性試験

[資料 No. 11]

試験機関：

報告書作成年：

検体の純度：

供試動物：           ラット、投与開始時6週齢、体重；雄80～110 g、雌80～110 g  
1群雌雄各10匹

投与期間：13週間

投与方法：検体を飼料中に25、100、400、1600、3200 ppmの濃度で混入し、13週間自由に摂取させた。なお、検体の純度で補正して所定の投与濃度とした。対照群には検体を含まない飼料を同様に自由に摂取させた。

用量設定根拠；

試験項目及び結果：

一般症状及び死亡率；

一般症状及び生死を毎日観察した。

3200及び1600 ppm投与群では、強い摂食忌避が投与直後から現れ、それに伴って激しい衰弱がみられ、投与開始初期に全例が死亡した（3200 ppm投与群では投与後3日、1600 ppm投与群では投与後6日まで）。400 ppm投与群雄では投与後18、26、50及び57日に各1例が死亡し、同群雌では投与後15及び16日に各1例、ならびに投与後18日に2例が死亡した。対照群及び100 ppm以下の投与群では死亡動物はみられなかった。

対照群及び100 ppm以下の投与群には、中毒症状として投与に起因すると考えられる所見は何らみられなかった。400 ppm投与群で投与後7日頃から立毛、被毛光沢の欠如がみられ、長期にわたって持続した。死亡例では死亡する1～2日前に音及び光に対する反応が低下し、脱力様症状がみられた。全例が死亡した1600 ppm以上の投与群ではさらに“いらだち”、攻撃様症状、自発運動の低下、立毛、被毛光沢の欠如及び瘦削がみられたが、これらの症状は摂食活動の顕著な低下に起因するものと考えられる。なお、1600 ppm投与群における症状は、3200 ppm投与群に比べ、比較的軽度であった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

体重変化；

投与開始から週2回すべての生存動物について体重を測定した。

得られた結果を次表に示す。

数値は対照群を100とした場合の数

性別	投与群 (ppm)	投与後週				
		0.5 <sup>#</sup>	1	4	8	13
雄	25					
	100					
	400					
	1600					
	3200					
雌	25					
	100					
	400					
	1600					
	3200					

—：全例死亡のためデータなし 空欄は有意差なし

\*：P<0.05、\*\*：P<0.01、\*\*\*：P<0.001 (t-検定)

#：投与後1週間の中間測定時を示す。

1600 ppm 投与群雌雄では投与開始直後から検体投与による著しい体重への影響がみられた。400 ppm 投与群雌雄ともに投与後1週で対照群に対し有意な体重増加抑制がみられた。これは、摂食活動の低下と関連する投与の影響であると考えられる。100 ppm 以下の投与群では対照群と同等であった。

摂餌量及び食餌効率；

摂餌量は投与開始より週2回測定し、食餌効率は投与後1ヵ月間、ならびに13週間における計算を行い求めた。

得られた結果を次表に示す。



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

数値は対照群を 100 とした場合の数

性別	投与群 (ppm)	投与後週				
		0.5 <sup>#</sup>	1	4	8	13
雄	25					
	100					
	400					
	1600					
	3200	--				
雌	25					
	100					
	400					
	1600					
	3200					

—：全例死亡のためデータなし

#：投与後 1 週前の中間測定時を示す

摂餌量は 400 ppm 投与群雌雄で減少傾向がみられ、1600 ppm 以上の投与群では投与開始直後から顕著な減少がみられた。100 ppm 以下の投与群は対照群と同等であった。

次いで計算の結果得られた食餌効率(体重増加量÷摂餌量×100)を次表に示す。

項目		投与群 (ppm)					
		0	25	100	400	1600	3200
1 ヶ月時における食餌効率(%)	♂						
	♀						--
3 ヶ月時における食餌効率(%)	♂						
	♀						--

—：全例死亡のためデータなし

1 ヶ月時における 400 ppm 投与群雌雄の食餌効率は、対照群に比べやや低かったが、13 週間では雌雄の投与群とも対照群とほぼ同等であった。

検体摂取量；

摂餌量及び投与濃度から算出した 1 日あたりの平均検体摂取量を次表に示す。

単位：mg/kg/day

性別	0 ppm	25 ppm	100 ppm	400 ppm	1600 ppm <sup>#</sup>	3200 ppm <sup>##</sup>
雄	—	2.178	9.095	33.925	(146.592)	—
雌	—	2.363	9.340	37.048	(128.902)	—

#：投与開始後 6 日までに全例死亡したため、投与 4 日目摂餌量と体重より求めた。

##：投与開始後 3 日までに全例が死亡したため算出できなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

飲水量；

飲水量は週1回測定を行った。

得られた結果を次表に示す。

数値は対照群を100とした場合の数

性別	投与群 (ppm)	投与後週			
		1	4	8	13
雄	25	102	87	95	100
	100	106	88	91	99
	400	95	81	79	70
	1600	—	—	—	—
	3200	—	—	—	—
雌	25	114	91	101	101
	100	113	98	104	102
	400	97	92	86	84
	1600	—	—	—	—
	3200	—	—	—	—

—：全例死亡のためデータなし

400 ppm 投与群雄の飲水量が対照群に比べ、低値が認められた。

100 ppm 以下の投与群雌雄は対照群とほぼ同等であった。

血液学的検査；

試験終了時の全生存動物に対して尾静脈より採血し、赤血球数、白血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量、血小板数、白血球分画についての検査を行った。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

数値は対照群を100とした場合の数

検査項目	雄 (ppm)					雌 (ppm)				
	25	100	400	1600	3200	25	100	400	1600	3200
検査動物数	10	10	6	0	0	10	10	6	0	0
ヘモグロビン量				—	—				—	—
ヘマトクリット値				—	—				—	—

\*：P<0.05 (t-検定)、空欄は有意差なし

—：全例死亡のためデータなし

400 ppm 投与群雄でヘモグロビン量及び同群雌でヘマトクリット値の低下が、検体投与の影響として認められた。その他の項目には有意差はみられなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

血液生化学的検査；

試験終了時の全生存動物をエーテル麻酔下で心臓から採血し、GOT (AST)、GPT (ALT)、アルカリホスファターゼ、A/G 比、血糖、総蛋白、尿素窒素、コレステロール、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>を検査した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

数値は対照群を 100 とした場合の数

検査項目	雄 (ppm)					雌 (ppm)				
	25	100	400	1600	3200	25	100	400	1600	3200
検査動物数	10	10	6	0	0	10	10	6	0	0
A/G 比				-	-				-	-
コレステロール				-	-				-	-
GOT (AST)				-	-				-	-

\* : P<0.05 (t-検定)、空欄は有意差なし  
 - : 全例死亡のためデータなし

400 ppm 投与群雄では A/G 比が対照群に比べ有意に高く、コレステロールは有意に低かった。同群雌では GOT (AST) の低下がみられたが、これらの結果には雌雄一貫性はみられず、病理組織学検査においても関連すると考えられる肝臓あるいはその他の臓器／組織に変化はみられないことから、投与による毒性影響とは考えられなかった。

尿 検 査；

試験終了時に、潜血反応、ケトン体、糖、蛋白、pH、ウロビリノーゲン、ビリルビン、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>の検査を行った。

いずれの項目においても投与によると考えられる変化はみられなかった。

臓器重量；

採血、剖検後、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、胸腺、甲状腺、下垂体、膵臓、精巣、精囊、前立腺、卵巣及び子宮を摘出し、秤量した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

数値は対照群を 100 とした場合の数

検査項目		性別及び投与量 (ppm)									
		雄					雌				
		25	100	400	1600	3200	25	100	400	1600	3200
検査動物数		10	10	6	0	0	10	10	6	0	0
脳	絶対										
	相対										
脾臓	絶対										
	相対										
前立腺	絶対										
	相対										

\*: P<0.05, \*\*: P<0.01, \*\*\*: P<0.001 (t-検定) 空欄あるいは( )内数値は有意差なし  
絶対: 絶対重量、相対: 体重相対重量比

400 ppm 投与群雌雄の脳（相対）重量比が有意に増加し、同群雄では脾臓（絶対）重量が有意に低下し、前立腺（相対）重量比が有意に増加した。これらはいずれの場合も、主に投与の体重への影響に関連するものと考えられ、後述するように病理組織学所見にも投与に起因すると考えられる変化がみられなかったことから、投与の特定臓器への影響を示唆するものではないと考えられる。

#### 肉眼的病理検査；

試験終了時の全生存動物及び途中死亡動物を対象として検査を行った。

投与初期に全例死亡した 1600 及び 3200 ppm 投与群雌雄では、胃底部の出血、胃内出血がみられ、胃には内容物がみられない場合が多かった。加えて、肺の赤色化及び膀胱内に血尿がみられる場合があった。400 ppm 投与群の死亡例では雌の場合に肺の赤色化及び赤色肝葉変化が各 1 例みられた。

400 ppm 投与群の生存例を含めた 100 ppm 以下の投与群に、肺の赤色化や赤色肝様変化、小化膿巣及び心臓と肺の癒着の少数例が散発的にみられたが、それらの出現頻度及び程度には対照群と同等であった。

#### 病理組織学的検査；

上記の肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、重量測定臓器を含め、胃、腸管、腸間膜リンパ節、皮膚、骨格筋（大腿筋）、坐骨神経、唾液腺及び骨髄（大腿骨）を常法に従ってヘマトキシリン-エオジン染色し、検鏡した。

すべての供試動物が死亡した 1600 及び 3200 ppm 投与群雌雄に共通して、脾臓には白脾髄の萎縮、リンパ球流出による小型化、胸腺及び腸間膜リンパ節にはともにリンパ球流出、子宮では筋層が薄く、萎縮がみられ、卵巣には黄体形成がみられなかった。しかしながら、死亡した 400 ppm 投与群雌雄にはこれらの所見はみられなかった。更に、胃粘膜に出血痕、肺には肺胞壁の肥厚、気管支肺炎及び化

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

膿性肺炎がみられた。胃粘膜の変化は、肉眼的病理所見でみられた所見を勘案すると、摂食活動の著しい低下によるストレスとの関連が考えられる。なお、肉眼的病理検査で血尿が数例の膀胱にみられたが、1600 ppm 投与群雌の 1 例に膀胱粘膜下に出血がみられたのみであった。

生存例では、肺に肺胞壁の肥厚、気管支肺炎、気管支周囲炎など、腎盂炎、膀胱内結石の形成、子宮内腔の拡大及び心内膜炎が認められたが、対照群にもみられることから偶発的であり、投与に起因すると考えられる所見とは考えられなかった。

申請者考察：以上のことから、400 ppm 以上の投与群に認められた死因について考察すると、死亡 1～2 日前に立毛、被毛光沢の消失、外界刺激に対する反応の低下及び脱力様症状が発現したが、これらの要因が死亡に直接的に関連したとは考えられない。摂餌量をみると、1600 及び 3200 ppm 投与群では投与直後から、摂餌量が顕著に減少するかあるいは殆ど摂餌しなくなり、400 ppm 投与群でも投与後 1 週では対照群の約 80% となった。この摂食回避は直接的に体重に反映され、1600 ppm 投与群では投与開始後まもなく対照群の約 60 % となり、400 ppm 投与群でも対照群の約 90% となった。生化学検査、尿検査及び臓器重量の各項目には投与によると考えられる影響は認められなかった。肉眼的病理検査では、胃底部の出血に加え、胃内に内容物がみられない場合が多く、摂食が忌避されたことが裏付けられた。早期に死亡させた直接的原因であろうと推定される病理組織学所見は、特に認められなかった。これらを勘案するとその要因は高濃度の場合、激しい摂餌忌避が主要な要因であろうと考えられる。

以上の結果から、チオシクロラム原体の 3 ヶ月間混餌投与による影響として 400 ppm 投与群で雌雄各 4 例が死亡し、生存例では体重増加の抑制、摂餌量及び飲水量の低値が、雄でヘモグロビン量及び同群雌でヘマトクリット値の低下が認められたことから、本試験における無毒性量は 100 ppm (雄 9.095 mg/kg/day、雌 9.340 mg/kg/day) であると判断される。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

肉眼的病理検査所見

検査時期	性別		雄 (ppm)					雌 (ppm)						
	投与群 (ppm)		0	25	100	400	1600	3200	0	25	100	400	1600	3200
最終屠殺動物	臓器	所見\検査動物数	10	10	10	6	0	0	10	10	10	6	0	0
	心臓	心臓と肺の癒着					—	—					—	—
	肺	赤色化					—	—					—	—
		右葉赤色化					—	—					—	—
左葉化膿巣						—	—					—	—	
死亡動物	臓器	所見\検査動物数	0	0	0	4	10*	10**	0	0	0	4	10*	10**
	全身	自己融解												
	肺	赤色化												
		左葉化膿巣												
		左葉赤色肝様変化												
		左右上部赤色肝様変化												
	膀胱	血尿												
	胃	胃底部出血巣												
		胃底部小出血												
		胃底部出血												
		胃底部に小潰瘍												
		胃内出血												
		内容物なし												
	腸管	内容物なし												
精巣	精巣のうっ血													
全動物	臓器	所見\検査動物数	10	10	10	10	10*	10**	10	10	10	10	10*	10**
	全身	自己融解												
	心臓	心臓と肺の癒着												
	肺	赤色化												
		右葉赤色化												
		左葉化膿巣												
		左葉赤色肝様変化												
		左右上部赤色肝様変化												
	膀胱	血尿												
	胃	胃底部出血巣												
		胃底部小出血												
		胃底部出血												
		胃底部に小潰瘍												
		胃内出血												
内容物なし														
腸管	内容物なし													
精巣	精巣のうっ血													

# : 投与開始後6日までに全例死亡した。

## : 投与開始後3日までに全例が死亡した。

— : 検査対象から除外。

\* : P<0.05 (Fisher 検定) : 申請者にて実施

死亡動物では比較する対照群がないため、統計検定することは妥当性がないため実施していない。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

病理組織学的検査所見

検査時期	性別		雄 (ppm)						雌 (ppm)					
	投与群 (ppm)		0	25	100	400	1600	3200	0	25	100	400	1600	3200
最終尿殺動物	臓器	所見\検査動物数	10	10	10	6	0	0	10	10	10	6	0	0
	心臓	心内膜炎												
	肺	気管支肺炎												
		化膿性肺炎												
		肺胞壁の肥厚												
	腎臓	腎盂炎												
	膀胱	結石												
	子宮	内腔拡大												
死亡動物	臓器	所見\検査動物数	0	0	0	4	10 <sup>#</sup>	10 <sup>**</sup>	0	0	0	4	10 <sup>#</sup>	10 <sup>**</sup>
	全身	自己融解												
	肺	気管支肺炎												
		化膿性肺炎												
		肺胞壁の肥厚												
	脾臓	濾胞が小さい												
	膀胱	出血												
	胃	出血												
	胸腺	リンパ球流出												
	腸管膜リンパ節	リンパ球流出												
	卵巣	黄体形成なし												
子宮	筋層がうすい													
全動物	臓器	所見\検査動物数	10	10	10	10	10 <sup>#</sup>	10 <sup>**</sup>	10	10	10	10	10 <sup>#</sup>	10 <sup>**</sup>
	全身	自己融解												
	心臓	心内膜炎												
	肺	気管支肺炎												
		化膿性肺炎												
		肺胞壁の肥厚												
	脾臓	濾胞が小さい												
	腎臓	腎盂炎												
	膀胱	結石												
		出血												
	胃	出血												
	胸腺	リンパ球流出												
	腸管膜リンパ節	リンパ球流出												
	卵巣	黄体形成なし												
	子宮	内腔拡大												
	筋層がうすい													

# : 投与開始後 6 日までに全例死亡した。

## : 投与開始後 3 日までに全例が死亡した。

- : 検査対象から除外。

\* : P<0.05、\*\* : P<0.01 (Fisher 検定) : 申請者にて実施

死亡動物では比較する対照群がないため、統計検定することは妥当性がないため実施していない。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

ラットを用いた3ヵ月間混餌投与毒性試験

[資料 No. 12]

試験機関：

報告書作成年：

検体の純度：

供試動物： ラット、投与開始時4～5週齢

投与開始時平均体重；雄71.4～77.9 g、雌66.3～71.5 g

1群雌雄各35匹（体重及び摂餌量の測定には1群雌雄各25匹、血液学検査、生化学検査、尿検査、肉眼的病理検査及び病理組織学検査には1群雌雄各5匹供試）

投与期間：13週間

投与方法：検体を飼料中に5、25、100 ppmの濃度で混入し、13週間自由に摂取させた。  
対照群には検体を含まない飼料を同様に自由に摂取させた。

試験項目及び結果：

一般症状及び死亡率；

一般症状及び生死を毎日観察した。

試験期間中に著明な徴候あるいは中毒症状及び死亡例はなかった。

体重変化；

1群雌雄各25匹について、週1回測定した。

13週間にわたる体重増加の結果を次表に示す。

数値は対照群を100とした場合の数

投与群 ppm	体重増加		
	5	25	100
雄	98	99	96
雌	102	98	99

有意差なし（t-検定）



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

いずれも投与群も対照群との間に有意な差はみられなかった。

摂餌量及び食餌効率；

1 群雌雄各 25 匹について、週 1 回測定した。

13 週間にわたる合計摂餌量及び食餌効率への結果を次表に示す。

数値は対照群を 100 とした場合の数

投与群 (ppm)	摂餌量			食餌効率		
	5	25	100	5	25	100
雄						
雌						

\*\* : P<0.01、\*\*\* : P<0.001 (t-検定)

摂餌量では、雌の場合いずれの投与群で、雄では 25 ppm 投与群で対照群に比べ有意に増加した。しかしながら、いずれの場合も軽微であり、投与量との相関もみられないことから、検体投与の影響とは考えられなかった。これを除いて、いずれも投与群も対照群との間に有意な差はみられなかった。

飲水量；

1 群雌雄各 25 匹について、週 1 回測定した。

13 週間にわたる飲水量の結果を次表に示す。

数値は対照群を 100 とした場合の数

投与群 (ppm)	体重増加		
	5	25	100
雄	98	95	93
雌	98	95	97

有意差なし (t-検定)

いずれも投与群も対照群との間に有意な差はみられなかった。

検体摂取量；

摂餌量及び投与濃度から 1 日あたりの平均検体摂取量 (mg/kg/day) を算出した。

単位 : mg/kg/day

投与濃度 (ppm)	雄	雌	雌/雄
5	0.367	0.430	1.17
25	1.88	2.17	1.15
100	7.62	8.52	1.12

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

血液学的検査：

投与後 4、8 及び 13 週に 1 群当り雌雄各 5 匹を用いて、1 晩絶食させた後、舌下静脈から採血した。ヘマトクリット、ヘモグロビン、赤血球数、MCV、MCH、MCHC、白血球数及び白血球百分率（リンパ球、単球、好酸球、好塩基球及び好中球）についての検査を行った。

数値は対照群を 100 とした場合の数

項目	検査時期(週)	雄 (ppm)			雌 (ppm)		
		5	25	100	5	25	100
赤血球数	4						
	8						
	13						
MCV	4						
	8						
	13						
MCH	4						
	8						
	13						
MCHC	4						
	8						
	13						
リンパ球	4						
	8						
	13						
好中球 (分葉核)	4						
	8						
	13						

\* : P<0.05、\*\* : P<0.01、\*\*\* : P<0.001 (t-検定)

a : P<0.05、aa : P<0.01、aaa : P<0.001 (U-検定)

空欄は有意差なし

対照群と比較して、雄は全投与群において血液学的に投与によると考えられる変化はみられなかった。雌では、赤血球数の減少及び、赤血球及びヘモグロビン濃度に関連する MCV、MCH 及び MCHC の増加がみられた。また、高投与群雌でリンパ球数の増加及び分葉核好中球の減少がみられたが、投与量との相関性は認められなかった。

[申請者注] 投与群雌に 赤血球及びヘモグロビン濃度に関連する項目 (MCV、MCH 及び MCHC) に変動がみられたが、ヘモグロビン濃度には変動は見受けられないことから、主に赤血球数の減少に起因するものと考えられた。対照群と比べると有意ではあるが、明らかな投与量との関係はみられず、これらの変動は雄にはみられないことから毒性学的意義はないものと考えられる。また、リン

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

パ球及び好中球（分葉核）に変動がみられたが、投与による組織傷害あるいは胸腺、骨髄及脾臓等に投与との関連を示唆する病理組織学的所見は認められないことから、毒性学意義はほとんどないものと考えられる。

血液生化学的検査；

投与後 4、8 及び 13 週に 1 群当り雌雄各 5 匹を用いて、1 晩絶食させた後、舌下静脈から採血した。コリンエステラーゼ（血漿及び血球）、GPT(ALT)、アルカリホスファターゼ、糖、尿素窒素、総蛋白、アルブミン、コレステロールについて検査を行った。

対照群と比べ有意差が認められた項目を次表に示す。

数値は対照群を 100 とした場合の数

項 目	検査時期(週)	雄 (ppm)			雌 (ppm)		
		5	25	100	5	25	100
糖	4						
	8						
	13						
総蛋白	4						
	8						
	13						
コレステ ロール	4						
	8						
	13						

\* : P<0.05、\*\* : P<0.01、\*\*\* : P<0.001 (t-検定) 空欄は有意差なし  
表中下段の ( ) 内数値は実測値を示す (各単位は以下の<参考>に記す)

各検査時期において、投与群雌雄の糖が対照群に比較して有意に増加したが、以下の参考に示す正常値の範囲内であった。総蛋白及びコレステロールにおいても、有意な増減がみられたが、いずれの場合も、投与量との相関はみられず、その実測値は正常値の範囲内であった。従って、各項目における変動が投与に起因し、かつ毒性学的に意味ある変動とは考えられなかった。

[参考] 当該毒性試験機関における各項目における正常範囲は次の通りである。

糖	65	～	110	mg/dL
尿素窒素	10	～	25	mg/dL
アルブミン	2.1	～	3.5	g/dL

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

総蛋白	6.0 ~ 8.0 g/dL
コレステロール	60 ~ 120 mg/dL
GPT (ALT)	10 ~ 30 IU
アルカリホスファターゼ (加齢とともに数値は小さくなる)	
	雄 : 70~130 IU ⇒ 45~80 IU
	雌 : 40~ 80 IU ⇒ 30~60 IU

コリンエステラーゼ検査；投与終了時に脳アセチルコリンエステラーゼ (AChE)、肝ブチルコリンエステラーゼ (肝 BuChE)、肝 N - デメチラーゼ活性を 1 群当り雌雄各 5 匹について測定した。酵素活性は蛋白 1 mg 当り、組織 1 g 当り及び臓器全体当りで比較した。

対照群と比べ有意差が認められた項目を次表に示す。

数値は対照群を 100 とした場合の数

項目	雄 (ppm)			雌 (ppm)		
	5	25	100	5	25	100
肝臓重量 g						
蛋白量 mg/g						
肝 BuChE	μ M/ g 肝臓					
	μ M/ mg 蛋白					
N - デメチラーゼ	μ M/ 肝臓					

\* : P<0.05, \*\* : P<0.01 (t-検定) 空欄は有意差なし

すべての投与群雌雄における脳 AChE は、対照群と同等であり、投与に関連する変化はみられなかった。

肝 BuChE の場合には、25 ppm 投与群雌で肝蛋白量が有意に減少し、蛋白 1 mg 当たりの酵素活性が有意に増加した。しかしながら、この増加には投与量との関連はみられず、肝臓 1 g 当たり及び肝臓全体における ChE には投与の影響がみられないことを考慮すると、この有意な増加には毒性学的意義はないものと考えられる。

肝 N - デメチラーゼでは 5 ppm 投与群雄に、活性の減少がみられたが (対照群の 82 %、有意差なし)、これを除いて、その他の投与群雌雄では対照群と同等であったことから、投与との関連はないものと考えられる。

#### 尿 検 査；

投与後 4、8 及び 13 週に 1 群当り雌雄各 5 匹を用いて、pH、比重、蛋白、糖、尿素、ケトンについて検査し、更に沈渣の鏡検を行った。

いずれの検査時期におけるいずれの検査項目についても、不規則、かつ散発的な変化がみられるものの、投与に起因すると考えられる変化はみられなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

臓器重量及び体重相対比；

1 群当り雌雄各 5 匹を肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、投与終了の前日に一晚絶食させた後、甲状腺、副腎、腎臓、脾臓、肝臓、胸腺、心臓、肺、貯精嚢、精巣、卵巣、前立腺、子宮、脳、下垂体を摘出し、秤量した。なお、各臓器における体重相対比（%）を算出した。

有意差を示す臓器は、各投与群雌雄ともみられず、投与の臓器重量への影響はないものと考えられる。

肉眼的病理検査；

1 群当り雌雄各 5 匹を対象として、投与終了前日に一晚絶食させた後、検査を行った。

投与に関連すると考えられる病変はみられなかった。

病理組織学的検査；

対照群及び 100 ppm 投与群について、上記の肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、重量測定した臓器を含め、唾液腺、乳腺、皮膚、腸間膜のリンパ節、脾臓、気管、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、膀胱、坐骨神経、骨髓（大腿骨）、骨格筋、眼、眼神経についての検査を行った。

同系統及び同週齢に一般的にみられる病変を除き、投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

以上の結果から、チオシクロム原体の 3 ヶ月間混餌投与よると考えられる影響が、検査した各項目に認められなかったことから、本試験における無毒性量は 100 ppm（雄 7.62 mg/kg/day、雌 8.52 mg/kg/day）であると判断される。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

病理組織学的検査所見

検査時期	性別		雄 (ppm)		雌 (ppm)	
	投与群 (ppm)		0	100	0	100
最終屠殺	臓器	所見\検査動物数	5	5	5	5
	肺	慢性呼吸器系疾患				
	気管	粘膜下腺の拡大				
		粘膜下炎、細胞集				
	胃	漿膜下炎、変化				
	腎臓	近位尿細管退行性変化				
		近位部の円柱				
		ヘンレ系蹄部の円柱				
	前立腺	限局性間質炎変化				
	膀胱	内腔に好酸性栓				
		限局性粘膜下炎変化				
	骨格筋	限局性間質炎変化				
	肝臓	限局性円形細胞集				

対照群及び100 ppm投与群の各5匹について検査実施した。

有意差なし (Fisher 検定) : 申請者にて実施

— : 検査対象から除外。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

ラットを用いた3ヶ月間混餌投与毒性試験

[資料 No. 13]

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

検体の純度：

供試動物： ラット（4週齢）、投与開始時体重；雄 219～255 g、雌 132～181 g  
1群雌雄各 10 匹（健康状態の検査用動物として雌雄各 5 匹）

群 構 成；

雌雄とも各群 10 匹からなる 4 群を設定（さらに、雌雄各 5 匹は動物の健康状態の確認のため、馴化期間中に採血して白血球数の測定及びウイルス血清学的検査に供し、屠殺剖検後、肉眼的に病変が認められた部位及び肺、肝臓、腎臓、脾臓、心臓の病理組織学的検査を実施した）。

群	雄	雌
K 対照 (0 ppm) 群	10 匹	10 匹
A 低用量 (50 ppm) 群	10 匹	10 匹
B 中用量 (175 ppm) 群	10 匹	10 匹
C 高用量 (600 ppm) 群	10 匹	10 匹

投与期間：13 週間（ 11 月 17 日～ 2 月 23 日）

投与方法：16 日間の飼育環境への馴化後、検体を 0、50、175、600 ppm の濃度でラット飼育用標準 KLIBA 粉末飼料 No. 32-343-4 に混入し、自由に摂取させた。なお、検体を混入した飼料は週 2 回調製し、1、5、10 週に調製した飼料サンプル中の検体の含有量を分析した。

なお試験期間中、飲料水は自由摂取させた。

用量設定根拠；

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

統計解析：すべての測定値は、コンピュータにプログラムされたパラメトリックあるいはノンパラメトリックな統計解析法を用いて自動的に行った。すなわち、分散分析の結果、分散が均一の場合には一元配置分散分析を行い、次いで Dunnett の検定法により多重比較を実施した。分散が均一でない場合、Kruskal-Wallis 検定で群間に有意な差が認められた場合には、Dunn-Bonferroni の検定法により多重比較検定を行った。

さらに、肉眼的病理所見及び病理組織学的所見に関しては、発生頻度を基に Fischer の正確確率検定法（両側検定法）により有意差検定を実施した。

試験項目及び結果：

一般症状及び死亡率；

一般症状及び動物の生死を 1 日 2 回（ただし週末及び休日は 1 日 1 回）観察し、さらに投与開始 2 週間は毎日、その後は週 1 回個別臨床症状記録用紙を用いて詳細な臨床症状の観察を行った。

投与期間中、死亡例はなく検体投与に起因したと考えられる一般状態の変化は認められなかった。

体重及び摂餌量；

全ての動物について、投与開始より 1 週間に 1 度の頻度で電子天秤を用いて体重及び摂餌量を測定した。その結果、下頁表に示すように 600 ppm 群の雌雄ともに投与第 1 週から体重増加抑制が認められ、雄では統計学的に有意であった。50 及び 175 ppm 群では検体投与による体重への影響は認められなかった。



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		0	50	175	600	0	50	175	600
検査項目	測定週								
体重	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	6								
	7								
	8								
	9								
	10								
	11								
	12								
	13								

a) : 上段の数値は対照群を 100 とした場合の変動率 下段の( ) : 体重 (g)  
 \* : P<0.05、\*\* : P<0.01 (Dunnet t-検定法)

投与 1 週目及び 13 週間をとおしての平均体重増加量を次表に示したが、雌雄ともに投与 1 週目の体重増加量の低下が顕著であった。

性	体重増加量	群			
		対照群	50 ppm	175 ppm	600 ppm
雄	第 1 週体重増加量 (g/rat/week)				
	対照群を 100 とした場合の変動率 (%)				
	第 1~13 週体重増加量 (g/rat/week)				
	対照群を 100 とした場合の変動率 (%)				
雌	第 1 週体重増加量 (g/rat/week)				
	対照群を 100 とした場合の変動率 (%)				
	第 1~13 週体重増加量 (g/rat/week)				
	対照群を 100 とした場合の変動率 (%)				

\*\* : P<0.01 (Dunnet t-検定法)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

また、下表に示すように雄の 600 ppm 群では投与開始後第 3 週まで摂餌量の低下があり、雌においても 175 及び 600 ppm 群で投与第 1 週に摂餌量が軽度に低下した。さらに、雄 600 ppm 群では投与第 10 週以降も摂餌量の低下が認められたが、175 ppm の雄及び 50 ppm 群の雌雄では検体投与による摂餌量への影響は認められなかった。

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		0	50	175	600	0	50	175	600
検査項目	測定週								
摂餌量	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	6								
	7								
	8								
	9								
	10								
	11								
	12								
	13								

a) : 上段の数値は対照群を 100 とした場合の変動率 下段の ( ): 摂餌重 (g)  
\* : P<0.05、\*\* : P<0.01 (Dunn-Bonferroni 検定法)

各動物の摂餌量を基に算出した、各投与群におけるラット 1 匹あたりの平均摂餌量 (g/rat/week) は次頁表のとおりである。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

性	平均摂餌量	群			
		対照群	50 ppm	175 ppm	600 ppm
雄	第1週平均摂餌量 (g/rat/week)				
	対照群を100とした場合の変動率 (%)				
	第1～13週平均摂餌量 (g/rat/week)				
	対照群を100とした場合の変動率 (%)				
雌	第1週平均摂餌量 (g/rat/week)				
	対照群を100とした場合の変動率 (%)				
	第1～13週平均摂餌量 (g/rat/week)				
	対照群を100とした場合の変動率 (%)				

\*\* : P<0.01 (Dunn-Bonferroni 検定法)

なお、投与第1週に特に著明な摂餌量の低下が認められた原因としては、検体混入による飼料の味の変化により、摂餌を忌避したものと考えられる。

食餌効率；

体重増加量及び摂餌量を基に飼料要求量 (FCR : 体重増加量 1 g 当たりの摂餌量) を算出すると、次表のように雌雄ともに 600 ppm 群で飼料要求率の軽度の上昇が認められたことから、わずかながら飼料効率も低下していることが示唆された。

性	飼料要求量	群			
		対照群	50 ppm	175 ppm	600 ppm
雄	第1週				
	第1～13週				
雌	第1週				
	第1～13週				

有意差検定は実施せず

検体摂取量；

摂餌量及び投与濃度から算出した1日当りの平均検体摂取量は、次の通りである。

性		雄			雌		
投与量 (ppm)		50	175	600	50	175	600
検査項目	測定週						
1日平均検 体摂取量	1	4.9	16.7	51.0	5.3	17.9	60.8
	1～13	3.5	12.2	40.9	4.3	14.6	52.7

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

飲水量；

投与第5週に、給水開始時の給水瓶の重量と7日間の給水後の給水瓶重量との差として飲水量を求めた。その結果、雄600 ppm群において飲水量の有意な減少が認められた。さらに、摂餌量に対する飲水量の比（飲水量/摂餌量）を算出すると600 ppm群の雄で有意に低下したが、飲水量と摂餌量の間には正の相関があることが知られていることから、600 ppm投与群で認められた飲水量の減少は、摂餌量の減少のみに起因するものではないことが示唆された。

性	飲水量	群			
		対照群	50 ppm	175 ppm	600 ppm
雄	実飲水量 (g/rat/week)				
	対照群を100とした場合の変動率 (%)				
	飲水量/摂餌量				
雌	実飲水量 (g/rat/week)				
	対照群を100とした場合の変動率 (%)				
	飲水量/摂餌量				

\* : P<0.05 (Dunnett t-検定法)

眼科的検査；

投与開始前（投与1週前）及び投与終了時（投与13週目）に、対照群及び600 ppm群の全例について検眼鏡による検査を実施した。

その結果、検体投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。なお、対照群を含む各群で一部の動物に自然発生性の変化と考えられる軽微な角膜混濁が観察された。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

尿 検 査 ;

投与第 4 週及び 12 週に全動物を対象に絶食、絶水下で一晩尿を採取して、尿量、pH、比重を測定し、尿試験紙を用いて、蛋白、糖、ケトン体、潜血、ウロビリノーゲンを半定量的に測定し、さらに尿沈査を光学顕微鏡により観察した。その結果、第 4 週目の検査では雄の 600 ppm 群で尿量が増加する傾向がみられ、また、第 12 週の検査では雌の 600 ppm 群で尿量が有意に増加し、これに伴って比重が低下する傾向が認められた。しかし、腎機能障害を示唆する血液生化学的検査における電解質値、尿蛋白の増加は認められないことから、一時的変化であり検体投与に起因する変化とは考えなかった。

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		0	50	175	600	0	50	175	600
検査項目	測定週								
尿量	4								
	12								
比重	4								
	12								

上段の数値は対照群を 100 とした場合の変動率  
 尿量 \*\*: P<0.01 (Dunnet t-検定法)  
 比重 \*: P<0.05 (Dunn-Bonferroni 検定法)

血液学的検査 ;

採尿の翌日に無麻酔下で舌下静脈穿刺により採血し、EDTA を抗凝固剤として用いた。ヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数、網状赤血球数、総白血球数を測定し、これらの測定値に基づいて、MCV、MCH、MCHC を算出するとともに、血液塗沫標本の顕微鏡観察により白血球分類を行って、その百分比を算出した。

その結果、血液学的検査所見に検体投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。なお、投与第 4 週において 600 ppm 群の雄に MCV、MCH が統計学的に有意に低下したが、赤血球数がわずかに高値であったことに起因するものであり、毒性学的な意義はないと思われる。

血液学的検査

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		0	50	175	600	0	50	175	600
検査項目	測定週								
MCV (CMU)	4								
MCH (PG)	4								

上段の数値は対照群を 100 とした場合の変動率  
 \*: P<0.05 (Dunnet t-検定法)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

血液生化学的検査；

血液学的検査と同時にヘパリンを抗凝固剤として採取した血液を用いて、血漿中の総ビリルビン濃度、クレアチニン濃度、アルブミン濃度、総蛋白濃度、カルシウム濃度、塩素濃度、無機リン濃度、血漿総コレステロール濃度、GPT (ALT) 活性、GOT (AST) 活性、アルカリホスファターゼ (AP) 活性、血糖値、尿素濃度、ナトリウム濃度、カリウム濃度を測定した。

その結果、検体投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。なお、投与 12 週目の検査において、雌の検体投与群でカリウム濃度が増加する傾向にあったが、採血時の溶血によるものと考えられた。

血液生化学的検査

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		0	50	175	600	0	50	175	600
検査項目	測定週								
カリウム濃度 (mmol/L)	4								
	12								
溶血 (score)	4								
	12								

上段の数値は対照群を 100 とした場合の変動率

下段の ( ) : 実測値

カリウム \* :  $P < 0.05$  (Dunn-Bonferroni 検定法)

溶血 \* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$  (Dunnett  $t$ -検定法)

病理学的検査；

13 週の投与期間終了時に全例について二酸化炭素ガスにより窒息死させて、外表、天然孔、頭蓋腔及び脳、胸腔、腹腔、及び骨盤腔並びにそれぞれの体腔の関連器官・組織、頸部及び付属器官・組織を肉眼的に観察し、以下に示す器官の重量を測定した。なお、剖検時の測定した各動物の最終体重と絶対重量を基に、体重に対する臓器重量の比（相対重量）を算出した。

重量測定対象臓器

脾臓、肝臓、副腎、脳、心臓、腎臓、卵巣、下垂体、精巣

剖検時に採取した以下に示す組織を 4 %ホルマリンで固定したのち（ただし、眼球は、Davidson 液で固定）、パラフィン包埋してヘマトキシリン-エオジン染色標本作製して、対照群及び 600 ppm 群の全例について光学顕微鏡で観察した。

病理組織学的検査対象臓器

脳、下垂体、大動脈、気管、甲状腺、上皮小体、食道、胸腺、心臓、肺、肝臓、脾臓、膵臓、胃、十二指腸、回腸、空腸、盲腸、結腸、直腸、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、膀胱、膾、子宮（頸管部を含む）、卵巣、乳腺、

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

皮膚、リンパ節、唾液腺、坐骨神経、脊髄、大腿骨（膝関節を含む）、骨格筋、胸骨（骨髄を含む）、眼（視神経を含む）、及びすべての肉眼病変部

さらに、50及び175 ppm群に関しては、全動物を対象に腎臓、肺、肝臓及び肉眼病変部についてのみ病理組織標本を作製し病理組織学的検査を実施した。

臓器重量；

600 ppm群の雄で肝臓の絶対重量の有意な低下が認められたが、相対重量で比較すると対照群との間に差は認められなかった。したがって、600 ppm群の雄の肝臓の絶対重量の低下は、体重増加抑制に伴う変化であることが示唆された。その他の各臓器の重量は絶対重量、相対重量いずれも対照群と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。

臓器重量

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		0	50	175	600	0	50	175	600
臓器									
肝臓	絶対重量								
	相対重量								

上段の数値は対照群を100とした場合の変動率

下段の( )：実測値

\*\*：P<0.01 (Dunnett t-検定法)

肉眼的病理所見；

雌雄各群ともに、幾つかの臓器・組織に所見が観察されたが、検体投与群におけるこれらの所見の発生頻度はいずれも対照群の発生頻度を超えるものではなかった。なお、雌雄ともに対象群を含む各群（雌50ppm群を除き）に通常あまり観察されない肝臓における分葉の形態発生異常が認められたが、これらの変化は発生過程における分葉の変異であった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

肉眼的所見 (1)

性別		雄				雌			
投与群 (ppm)		0	50	175	600	0	50	175	600
臓器	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10
副腎	巣状変化								
	大型化								
	小型化								
	腫瘍								
盲腸	血管の明瞭化								
心臓	心耳の大型化								
	心耳表面の粗造化								
	心室の大型化								
	心室表面の粗造化								
腎臓	大型化								
	異常色調								
	褪色								
	嚢胞状								
下顎 リンパ節	暗色化								
	大型化								
	巣状変化								
肝臓	腫大								
	表面粗造化								
	分葉の形態発生異常								
	褪色								
前立腺	大型化								
	小型化								
皮膚	肥厚								
	中等度脱毛								
	重度脱毛								
脾臓	異常形態								
胃	異常内容物								
胸腺	巣状変化								
甲状腺	大型化								
膀胱	拡張								
	異常内容物								
腹腔内	腫瘍								
その他	衰弱								

\* : P<0.05 (Fischer の正確確率検定法)



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

病理組織学的所見；

種々の臓器・組織に、本系統のラットに自然発生すると考えられる様々な変化が観察されたが、これらの変化の発生頻度に対照群との間で差は認められなかった。

観察された病理組織学的変化の発生例数を次表に示す。

病理組織学的所見 (1)

性別		雄				雌			
投与群 (ppm)		0	50	175	600	0	50	175	600
臓器	所見								
副腎	検査動物数								
	変性細胞巣 (発生異常)								
眼球	検査動物数								
	網膜萎縮								
心臓	検査動物数								
	心室の心内膜鉄食細胞巣								
腎臓	検査動物数								
	髄質の石灰沈着								
	皮質の好塩基性尿細管								
	腎乳頭上皮過形成								
	水腎症								
	腎乳頭上皮限局性鉍質沈着								
下顎リンパ節	検査動物数								
	色素食大食細胞								
肝臓	検査動物数								
	炎症								
	分葉の形態発生異常								
肺	検査動物数								
	巣状肺炎								
	肺胞化骨								
前立腺	検査動物数								
	リンパ球浸潤								
皮膚 乳腺部	検査動物数								
	包皮腺炎症								
	肉芽腫								
胃	検査動物数								
	境界縁部炎症								

有意差なし (Fischer の正確確率検定法)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

病理組織学的所見 (2)

性別		雄				雌			
投与群 (ppm)		0	50	175	600	0	50	175	600
臓器	所見								
精巣	検査動物数								
	精細管精子形成細胞消失								
胸腺	検査動物数								
	点状出血								
気管	検査動物数								
	腺腔拡張								
膀胱	検査動物数								
	精液栓								
子宮	検査動物数								
	生理的拡張								
膣 (性周期による分類)	検査動物数								
	扁平角化上皮化								
	扁平上皮化								
	粘液分泌上皮化								
腹腔	検査動物数								
	限局性脂肪壊死								

有意差なし (Fischer の正確確率検定法)

結論： ラットを用いて、雌雄各 10 匹からなる 4 群に分け、1 群を対照群として基礎飼料のみを与え、他の 3 群には検体チオシクロラムを 50 ppm (雄：3.5 mg/kg/day、雌：4.3 mg/kg/day に相当)、175 ppm (雄：12.2 mg/kg/day、雌：14.6 mg/kg/day に相当)、あるいは 600 ppm (雄：40.9 mg/kg/day、雌：52.7 mg/kg/day に相当) の割合で基礎飼料に添加し、13 週間ラットに混餌投与した。その結果、600 ppm 投与群において、雌雄ともに体重増加抑制があり、特に投与第 1 週において著明な体重増加抑制が認められた。体重増加抑制にほぼ並行して摂餌量の低下が認められたことから、体重増加抑制は主として摂餌量の低下に起因するものと考えられるが、飼料効率もわずかに低下していることから、体重増加抑制の原因のすべてが摂餌量の低下によるものではないと思われる。なお、摂餌量の低下は、検体添加による飼料の味の変化が原因と考えられた。一方、雌雄ともに一般状態に中毒性の変化はなく、死亡例も認められなかった。さらに、血液学的検査所見、血液生化学的検査所見、尿検査所見に検体投与に起因したと考えられる影響は認められず、投与終了時に実施した病理学的検査 (肉眼観察、臓器重量測定、病理組織学的検査) においても、検体投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下におけるチオシクロラムの無毒性量は、雄 175 ppm (12.2 mg/kg/day)、雌 175 ppm (14.6 mg/kg/day) であると判断される。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

イヌを用いた 20 週間混餌投与による毒性試験

[資料 No. 14]

試験機関：

報告書作成年：

検体の純度：

供試動物：ビーグル犬、投与開始時 6～8 ヶ月齢、体重；雄 5.2～12.7 kg、雌 6.7～12.1 kg  
1 群雌雄各 6 匹（肝薬物代謝酵素系に関する試験、臓器測定、肉眼的病理検査  
及び病理組織学検査では 1 群雌雄各 4 匹）

投与期間：20 週間

試験方法：検体を飼料中に 15、75 及び 375 ppm の濃度で混入し、13 週間自由に摂取させた。  
対照群には検体を含まない飼料を同様に自由に摂取させた。飼料は毎週 1  
回調製した。

用量設定根拠；

試験項目及び結果；

一般状態及び死亡；

一般症状及び生死を毎日観察した。

投与 19 週後に 375 ppm 群雄 1 例が、投与に関連しないと考えられる肺炎で死亡した。この死亡を除いて、死亡はみられなかった。

投与 10 週後に 375 ppm 群雄数例に、時々後肢の痙攣が観察され、歩行失調の状態となったが、この症状は観察後 30 分程度で消失し、正常に回復した。

体重変化；

毎週 1 回体重を測定した。

平均体重、及び各群の試験開始時から 20 週間後における平均体重増加量を次表に示す。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

単位：kg

性別	雄 (ppm)				雌 (ppm)			
投与量 (ppm)	0	15	75	375	0	15	75	375
測定週								
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
19								
20								
体重増加量								

有意差なし (t-検定法)

各投与群雌雄ともに、20 週間における平均体重増加量には有意な変動はみられなかった。しかしながら、15 及び 75 ppm 投与群雄では、対照群よりも僅かに増加傾向であり、375 ppm 投与群雄では対照群に比べ約 9 %少ない増加であった。

15 及び 75 ppm 投与群雌では、雄と同様に僅かな増加傾向であったが、375 ppm 投与群雌では体重が減少した。これは同群の 2 例による体重が減少したことによると考えられた。

以上のことから、375 ppm 投与群には検体投与による体重への影響がみられるものと考えられた。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

摂餌量；

毎日測定し、1週間単位で表示した。

得られた結果を次表に5週間隔で示す。

数値は対照群を100とした場合の数

投与後週	雄 (ppm)			雌 (ppm)		
	15	75	375	15	75	375
1	116	119	84	104	92	81
5	97	94	91	104	92	84
10	106	100	100	98	99	80
15	111	111	106	95	93	67
20	112	100	92#	86	80	62

#: 1例死亡のため、動物数は5

雄の場合、15及び75 ppm投与群で投与期間をとおし、対照群に比べやや高い傾向がみられ、375 ppm投与群では低い傾向がみられた。雌では375 ppm投与群で摂餌量は減少した。この摂餌量の減少が体重増加に影響を及ぼしているものと考えられた。

検体摂取量；

摂餌量及び投与濃度から算出した1日あたりの平均検体摂取量を次表に示す。

単位：mg/kg/day

性別	15 ppm	75 ppm	375 ppm
雄	0.48	2.23	11.32
雌	0.50	2.31	10.81

血液学的検査；

投与開始前(0日)、投与後1、4、8及び13週にすべての動物を対象に検査し、投与後18週では対照群及び375 ppm投与群のみ検査した。

ヘモグロビン量(Hb)、赤血球数(RBC)、ヘマトクリット値(HCT)、網赤血球(Ret)、血小板数(Plt)、白血球数、白血球分画及びプロトロンビン時間(ProT)についての検査を行った。なお、赤血球数及びヘモグロビン関連項目であるMCV、MCH及びMCHCを算出した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

検査項目	検査時期 (週)	雄 (ppm)				雌 (ppm)			
		0	15	75	375	0	15	75	375
HCT (%)	8								
	13								
Hb (g/dL)	8								
	13								
RBC (10 <sup>6</sup> cell/mm <sup>3</sup> )	8								
	13								
MCV (μ <sup>3</sup> )	1								
	8								
MCH (pg)	0								
	13								
MCHC (%)	0								
	1								
	4								
	8								
Plt (TM/CMM)	1								
ProT (sec.)	13								
Ret (‰)	1								

上段の数值は対照群を100とした場合の数 下段の( ): 実測値  
 \*: P<0.05、 \*\*: P<0.01、 \*\*\*: P<0.001 (t-検定) 空欄は有意差なし

雌では投与後13週のRBCに75及び375 ppm投与群で対照群に比べ有意差がみられたが、以下の表に示すように、投与開始前(0日)のRBCにおいて既に低値がみられ、更に、投与後13週でも対照群との割合にほとんど変化がみられないことから、投与による影響があったとは考えられなかった。

検査時期	0ppm	15ppm	75ppm	375ppm
0				
13週時				

上段の数值は対照群を100とした場合の数 下段の( ): 実測値 単位は×10<sup>6</sup>  
 \*: P<0.05、 \*\*: P<0.01 (t-検定)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

RBC、HCT 及び Hb の値から、75 及び 375 ppm 投与群雌におけるそれらの関連項目である MCV、MCH 及び MCHC に反映し有意差がみられた。しかしながら、これらの結果は投与開始前の各投与群における供試動物集団の状態を反映しているものと推測され、投与による影響とは考えられなかった。

その他の項目に有意差が散見されたが、いずれの場合も投与量とは関連はないものと考えられた。

血液生化学的検査；

投与開始前（0 日）、投与後 1、4、8 及び 13 週にすべての動物を対象に検査し、投与後 18 週に対照群及び 375ppm 投与群のみ検査し、投与の影響を検討した。検査前の一晩絶食させた。

GOT(AST)、GPT(ALT)、アルカリホスファターゼ、乳酸脱水素酵素 (LDH)、血漿/赤血球コリンエステラーゼ (PL/ER ChE)、A/G 比、血糖、総蛋白 (TPro)、アルブミン (Alb)、全ビリルビン (Bili)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Crea)、尿酸、コレステロール (Chol)、Na、K、Ca、P、Cl を検査した。更に、BSP を投与開始前（0 日）及び投与後 13 週に測定した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

検査項目	検査時期 (週)	雄 (ppm)			雌 (ppm)		
		15	75	375	15	75	375
血糖 (mg/dL)	0						
	4						
	8						
	13						
BUN (mg/dL)	1						
Crea (mg/dL)	0						
	4						
	8						
	13						
	18						
尿酸 (mg/dL)	0						
Bili (mg/dL)	4						
	13						

上段の数値は対照群を 100 とした場合の数  
\* : P<0.05、\*\* : P<0.01、\*\*\* : P<0.001 (t-検定)  
#: 検査せず

下段の ( ) : 実測値  
空欄は有意差なし

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

検査項目	検査時期 (週)	雄 (ppm)			雌 (ppm)		
		15	75	375	15	75	375
Chol (mg/dL)	0						
	1						
T Pro (g/dL)	0						
	13						
Alb (g/dL)	8						
Na (mMol/L)	0						
	1						
	8						
K (mMol/L)	13						
Ca (mEq/L)	0						
	1						
	8						
Cl (mMol/L)	1						
	8						
P (mgP/dL)	1						
	4						
	8						
	13						
	18						
ER ChE (U/mL)	0						
	1						
	4						
GOT (AST) (IU)	1						
LDH (IU)	0						

上段の数値は対照群を 100 とした場合の数

\*: P<0.05, \*\*: P<0.01, \*\*\*: P<0.001 (t-検定)

#: 検査せず

下段の( ): 実測値

空欄は有意差なし

375 ppm 投与群雄における血糖は、既に投与開始前に対照群に比べ有意に高く、投与後 4、8 及び 13 週時でも有意に高かったが、投与前の状態の延長によるものと考えられた。8 週時ではすべての投与群の血糖が有意に高かったが、いず



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

れの場合も当該試験機関における正常値範囲内（空腹時血糖濃度：80～120 mg/dL）であり、投与による影響とは考えられなかった。上表に示すように、他にも多くの項目に有意差がみられたが、いずれの場合も投与開始前の検査値との比較、項目毎の以下に示す正常値範囲あるいは投与量との関係を勘案すると、みられた有意差を有する変化が投与に関連するとは考えられなかった。

[参考] 当該毒性試験機関における各項目における正常範囲は次の通りである。

血糖(空腹時)	80	～	120	mg/dL
尿素窒素(BUN)	8	～	25	mg/dL
クレアチニン(Crea)	0.3	～	1.0	mg/dL
尿酸	0.5	～	1.6	mg/dL
ビリルビン(Bili)	0.2	～	1.0	mg/dL
アルブミン(Alb:血漿)	2.0	～	3.7	g/dL
総蛋白(T Pro:血漿)	5.7	～	7.4	g/dL
コレステロール(Chol:血漿)	115	～	250	mg/dL
ナトリウム(Na)	130	～	160	mMol/L
カリウム(K)	4.0	～	5.8	mMol/L
カルシウム(Ca)	4.5	～	5.8	mMol/L
塩素(Cl)	100	～	120	mMol/L
リン(P)	3.5	～	6.4	mMol/L
血漿コリンエステラーゼ <sup>※</sup> (PL ChE)	2.0	～	4.0	U/mL
赤血球コリンエステラーゼ <sup>※</sup> (ER ChE)	1.2	～	3.6	U/mL
GOT(AST)	9.0	～	30	IU
GPT(ALT)	20	以下	(25を除く)	IU
アルカリホスファターゼ(加齢とともに数値は小さくなる)				
	雄	:	30～80 IU	⇒ 20～50 IU
	雌	:	30～90 IU	⇒ 10～40 IU
乳酸脱水素酵素(LDH)	20	～	70(100以下)	IU
BSP(静脈注射15分後の回収率)	3	～	9	%

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

#### 肝薬物代謝酵素への影響；

投与後 20 週に屠殺した 1 群当たり雌雄各 2 頭の肝臓を採取し、その重量を測定後ホモジネートした。遠心分離後、その上澄液を用いて下記の肝薬物代謝酵素活性ならびにグリコーゲン、全蛋白及び全脂質を測定した。

チトクローム P-450、N-脱メチル化酵素、O-脱メチル化酵素、S-脱メチル化酵素、アニリン-4-ヒドロキシラーゼ

Student's t-検定の結果、有意差はないものの投与量に従って、肝臓重量がやや低くなる傾向がみられた。チトクローム P-450 濃度は 15 及び 75 ppm 投与群で有意ではないが減少した。肝薬物代謝酵素には投与による変動はみられなかった。従って、いずれの項目においても投与による影響はないものと考えられた。

#### 眼科学的検査；

投与開始前（0 日）及び投与後 13 週に検眼した。

いずれの場合も正常であり、投与による傷害はみられなかった。

#### 尿 検 査；

投与開始前（0 日）、投与後 1、4、8 及び 13 週にすべての動物を対象に以下の項目を検査した。

pH、比重、蛋白、糖、血色素、ケトン及び沈渣の顕微鏡検査（上皮細胞、白血球、赤血球、尿酸結晶、蔞酸カルシウム等）

各検査時に蛋白、上皮細胞及びリン酸塩等に時折変動がみられたが、検査時期及び投与量との間に明確な関係はみられないことから、投与による影響はないものと考えられた。

#### 臓器重量；

投与後 20 週に屠殺した 1 群当たり雌雄各 2 頭の下記臓器の重量を測定した。

なお、最終体重を基に各臓器の体重相対比を算出した。また、有意差検定するに当たり、雌雄合計して検定を行った。

脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、胸腺、甲状腺、下垂体、精巣、精囊、前立腺、卵巣及び子宮

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

数値は対照群を 100 とした場合の数

臓器		投与群 (ppm) (雌雄合計として)		
		15	75	375
最終体重				
心臓	絶対			
	相対+			
肝臓	絶対			
	相対			
胸腺	絶対			
	相対			

+ : 体重相対比

\* : P<0.05、\*\* : P<0.01 (t-あるいはU-検定)

( ) 内数値及び空欄は有意差なし

375 ppm 投与群における心臓 (絶対) 重量が対照群に比べ、有意に減少したが、同群の体重は、有意差はないが対照群に比べ低いこと及び相対重量には変化がみられないことを考慮すると、体重減少に伴う影響と考えられる。その他、75 ppm 投与群では、肝臓及び胸腺 (相対) 重量の有意な減少がみられたが、投与量との明らかな関係はみられず、投与による悪影響とは考えられなかった。

肉眼的病理検査；

投与後 20 週に屠殺した 1 群当たり雌雄各 2 頭 (臓器重量を測定したと同一個体) について、肉眼的病理検査を行った。

腎臓及び消化管の充血、肝臓の蒼白化、水頭症、卵巣の萎縮あるいは肥大及び気管支肺炎等が、対照群及び投与群に散見された。これらの病変はいずれも通常みられる病変であり、投与に関連すると考えられる所見はみられなかった。

病理組織学的検査；

投与後 20 週に屠殺した 1 群当たり雌雄各 2 頭 (臓器重量を測定したと同一個体) について、下記の臓器/組織を採取して、定法に従って標本作製後、ヘマトキシリン・エオシン及びスダンⅢで染色した。

観察された各臓器/組織の病理組織学所見を表 1 に示す。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

375 ppm 投与群雌雄合計 4 例中 2 例に、胸腺の退縮性変化がみられたが、投与との関連は明確ではなかった。その他肺、肝臓、食道、腎臓及び肝臓に肉芽腫様巣状変化が対照群を含め散見されたが、一般的にみられる変化であり、投与によるものとは考えられなかった。

以上の結果から、375 ppm 投与群において歩行失調（雄）、後肢痙攣（雄）が時折観察され、摂餌量及び体重減少が認められたことから、本試験における無毒性量は、75 ppm（雄：2.23 mg/kg/day、雌：2.31 mg/kg/day）と判断された。

表 1 臓器／組織に関する病理組織学所見（統計検定は未実施）

臓器 / 組織	投与群 (ppm)	雄				雌			
		0	15	75	375	0	15	75	375
所見		2	2	2	2	2	2	2	2
検査動物数		2	2	2	2	2	2	2	2
顎下腺	間質炎症性変化								
肺	肉芽腫様巣状変化								
	慢性肺炎								
甲状腺	肉芽腫様変化(両側)								
胸腺	退縮性変化								
食道	粘膜下肉芽腫様巣状								
肝臓	肉芽腫様巣状変化								
	クッパー細胞増加								
膵臓	外分泌腺組織線維化								
小腸	粘膜炎症								
リンパ節	炎症性被膜膨化								
	肉芽腫様皮質変化								
	ヘモジデリン症								
骨髄	ヘモジデリン症								
腎臓	肉芽腫様皮質変化								
	髄質間質炎症								
	髄質好塩基性円柱								

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

ラットを用いた飼料混入投与による 90 日間反復経口投与神経毒性

[資料 No. 15]

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

検体の純度：

供試動物： ラット、投与開始時 5 週齢、1 群雌雄各 10 匹

投与期間：90 日間 雄； 12 月 27 日～ 3 月 27 日  
雌； 12 月 28 日～ 3 月 28 日

投与方法：検体のプレミックス混合飼料を作製し、これを 10～20 倍に希釈混合して、0、100、200 及び 400 ppm の濃度で飼料に混入し、90 日間にわたって随時摂取させた。検体を混入した飼料は 3～11 日の間隔で計 13 回調製した。

用量設定根拠；

観察・検査項目及び結果：

死亡率；

生死を毎日、午前午後の 2 回観察した。

試験終了時の死亡率を下表に示す。

投与量 (ppm)		0	100	200	400
死亡率 (%)	雄	0	0	0	0
	雌	0	0	0	0

試験期間中死亡した動物はなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

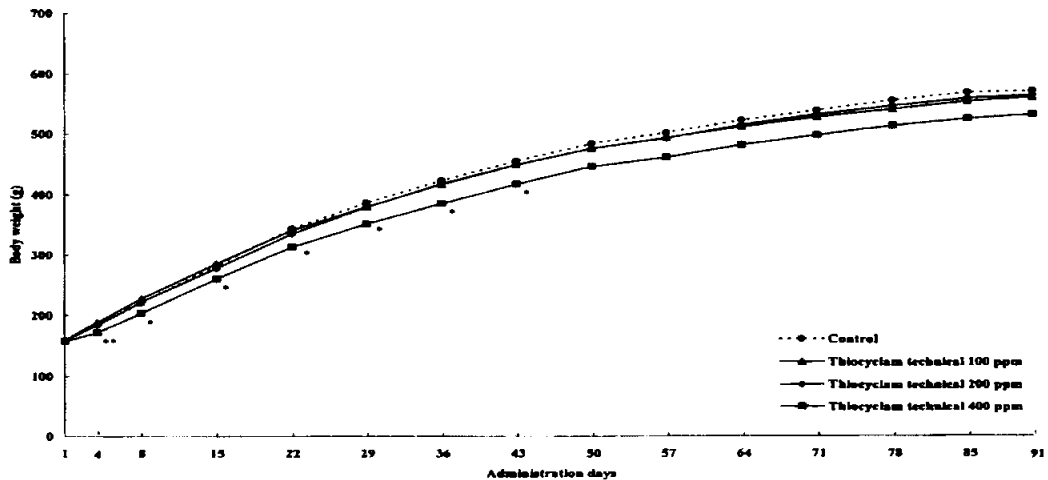
一般状態；

一般状態を毎日、午前午後の2回観察した。

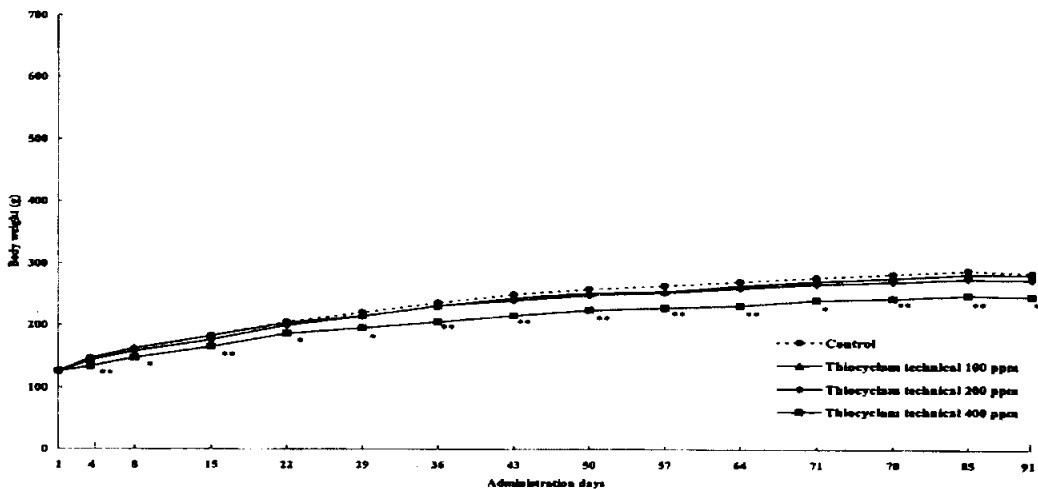
その結果、各投与群の雌雄ともに、投与期間中に検体投与に関連した異常は認められなかった。

体重変化；

投与 1、4、8、15、22、29、36、43、50、57、64、71、78、85 及び 91 日にすべての動物の体重を測定した。



雄の体重変化 \* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$  (Dunnett t-検定法)



雌の体重変化 \* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$  (Dunnett t-検定法)

その結果、100 及び 200 ppm 投与群では、雌雄とも投与期間中に対照群と比較して有意な差は認められなかった。

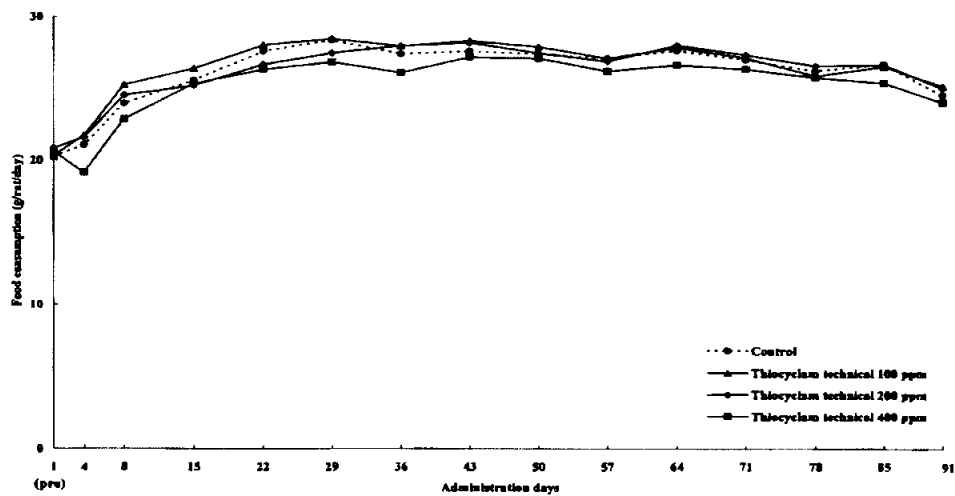
100 ppm 投与群では、雄に投与 4~43 日、雌に投与 4 日以降投与期間中をとおして有意な低値が認められた。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

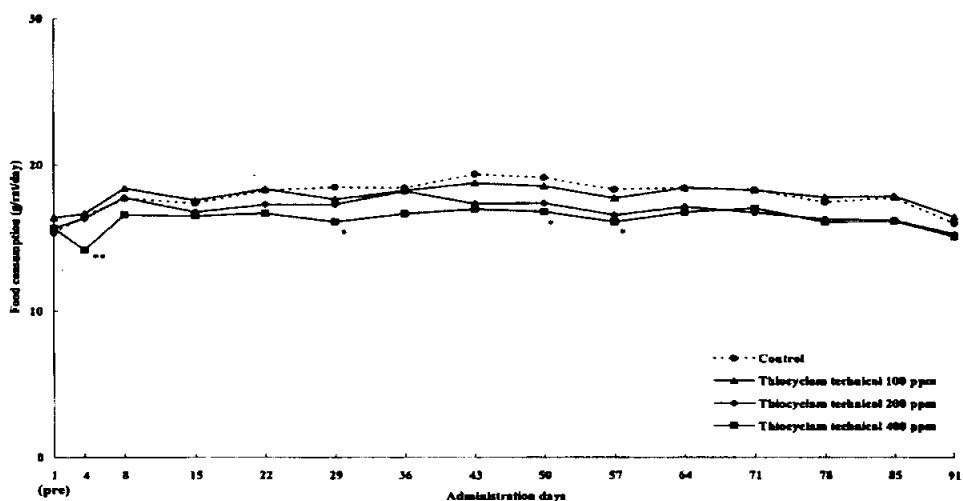
### 摂餌量；

ケージ毎に投与 1、4、8、15、22、29、36、43、50、57、64、71、78、85、及び 91 日の午前中に給餌量及び残量を測定した。

なお、投与開始前日に基礎飼料のみの摂餌量（投与 0～1 日）を求め、参考データとした。



雄の摂餌量 有意差なし (Dunnet t-検定法)



雌の摂餌量 \* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$  (Dunnet t-検定法)

その結果、100 及び 200 ppm 投与群では、雌雄とも投与期間中に対照群と比較して有意な差は認められなかった。

400 ppm 投与群では、雌において検体投与に関連するものではなく、嗜好的要素によると推測される有意な低値が投与 4、29、50 及び 57 日に認められた。雄では投与期間中をとおして有意な差は認められなかったが、投与 4 日の摂餌量は雌と同様に低値を示した。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

検体摂取量；

投与期間中の平均検体摂取量は以下の通りであった。

投与量 (ppm)		100	200	400
平均検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	6.6	13.0	26.9
	雌	7.7	14.9	31.5

詳細な状態の観察；

投与開始前、投与 2、4、8 及び 13 週時に、全例を対象として、以下の項目の測定を行なった。

- ① ケージの外から、体位・姿勢、呼吸状態、振せん・痙攣、常同行動/回転・旋回、異常行動/自咬について観察した。
- ② ケージから取り出す際に、取り出し易さ、取り扱い易さ、筋収縮性、立毛、被毛の状態、眼・眼球及び粘膜の外観、皮膚、瞳孔径、流涙、流涎、その他分泌物の有無について観察した。
- ③ オープンフィールド内で、歩行、運動協調性、環境刺激に対する反応、探索行動、排泄状態/排尿・排糞、常同行動/身づくろい・くびふり、異常行動/後ずさり・異常発声、攻撃性について観察した。

その結果、各投与群の雌雄ともに、各検査時のいずれにも対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

機能検査；

投与開始前、投与 2、4、8 及び 13 週時に、全例を対象として、以下の項目の測定を行なった。

- ① 作業台の上で、視覚刺激（接近反応）、触覚刺激（接触反応）、聴覚刺激（音に対する反応）、痛覚刺激（尾根部を挟む）、固有受容器刺激（強制姿勢からの復帰）、空中正向反射について観察した。
- ② 握力について測定した。
- ③ 自発運動量について測定した。

対照群と比較して統計学的有意差が認められた項目を次頁の表に示す。

その結果、各投与群の雌雄とも検体投与に関連した変化は認められなかった。



性別	雌														
	100					200					400				
投与量 (ppm)															
検査時期 (日)	前	2週	4週	8週	13週	前	2週	4週	8週	13週	前	2週	4週	8週	13週
後肢の握力															
自発運動量 (0-10分)															
自発運動量 (30-40分)															
自発運動量 (40-50分)															

Mann-Whitney の U-検定    ↑↓ :  $P \leq 0.05$     ↑ :  $P \leq 0.01$

数値は対照群を 100 とした場合の数

空欄は統計学的有意差の認められなかった項目

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

100 ppm 投与群では、投与開始前の検査において、雌で自発運動量に对照群と比較して、測定開始後 40-50 分に有意な高値が認められた。雄では有意な変化は認めなかった。投与期間中の検査においては、雌雄ともに有意な変化は認めなかった。

200 ppm 投与群では、投与開始前の検査において、雌で自発運動量に測定開始後 30-40 分の有意な高値が、投与期間中の検査においては、雌の投与 8 週時検査で、測定開始後 0-10 分の自発運動の有意な低値が認められたが、これら有意差はいずれも一過性のものであり、総運動量には有意な差は認められなかったことから、毒性学的な意義はないと判断した。また、雌の投与 13 週検査において、後肢の握力の有意な低値が認めれらるが、用量依存的な変化ではなく、検体投与に関連した変化ではないと考えられた。雄では投与開始前及び投与期間中の検査において、有意な変化は認めなかった。

400 ppm 投与群では、投与開始前の検査において、雌で自発運動量に測定開始後 30-40 分及び 40-50 分の有意な高値が認められた。雄では有意な変化は認めなかった。投与期間中の検査においては、雌雄ともに有意な変化は認めなかった。

#### 眼科学的検査；

投与開始前（順化期間中に実施）は全例、投与13週時は对照群及び400 ppm 群の全例について検査した。

その結果、400 ppm 投与群の雌雄ともに検体投与に関連のある異常は認められなかった。100 及び 200 ppm 投与群の雌雄については眼科的検査は行わなかった。

#### 肉眼的病理検査；

投与91日に、各群の雌雄各5匹を灌流固定動物とした。灌流固定動物については、心臓全身灌流固定後に、病理組織学的検査用の器官・組織を摘出する際に肉眼的観察をした。また、灌流固定用以外の生存動物については、エーテル麻酔下で放血により安楽死させ、全身の器官・組織について肉眼的に観察した。

その結果、对照群及び 100 ppm 群投与の雌雄ともに、異常所見は認められなかった。

200 ppm 群投与群において、検体投与に関連しない変化として、雄 1 例で、回腸の憩室、他の 1 例に前胃粘膜の白色腫瘍が認められたが、雌では異常所見は認められなかった。

400 ppm 群雌雄ともに、検体投与に関連した変化は認められなかった。

#### 病理組織学的検査；

各投与群の灌流固定動物の全例について、ペントバルビタールナトリウム（約 40 mg/kg）による深麻酔下にて、前処理液としてヘパリン・亜硝酸ナトリウム添加ラクトリンゲル液、固定液として 3% グルタルアルデヒド、3% パラホルムアルデヒ

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

ド、0.1%ピクリン酸及び0.05%塩化カルシウムを含む0.1Mリン酸緩衝液を用いて灌流固定した後、以下の器官・組織について病理標本を作成し、検鏡した。前脳及び海馬を含む大脳中心部、中脳、小脳、橋、延髄、視神経及び網膜を含む眼球、脊髄の頸膨大及び腰膨大、脊髄神経節、神経線維の前根及び後根、近位の坐骨神経、近位の脛骨神経（膝部）及び脛骨神経の腓腹筋分岐部、骨格筋（腓腹筋）をパラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色した。また、末梢神経については、樹脂包埋ののち薄切し、トルイジン・ブルー染色した。

その結果、各群雌雄の検鏡したいずれの器官・組織に検体投与に関連した異常所見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90日間飼料混入投与による神経毒性試験における影響として、400 ppm投与群の雌雄ともに体重増加抑制が認められた。しかし、他には各投与群の雌雄ともに一般状態、詳細な状態観察、機能検査、摂餌量、眼科学的検査、剖検所見及び病理組織学的所見のいずれにも神経毒性を示唆する変化は認められなかった。

本試験条件下における一般毒性の無毒性量は、雌雄ともに200 ppm（雄13.0 mg/kg/day、雌13.9 mg/kg/day）であると判断され、神経毒性の無毒性量は雌雄ともに400 ppm（雄26.9 mg/kg/day、雌31.5 mg/kg/day）と考えられた。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

(6) 慢性毒性及び発がん性

イヌを用いた2年間混餌投与による毒性試験

[資料 No. 16]

試験機関:

報告書作成年:

検体の純度:

供試動物: ビーグル犬、投与開始時6~8ヵ月齢、体重; 雄8.2~12.2 kg、雌6.7~12.1 kg  
1群雌雄各4匹

投与期間: 107週間

試験方法: 検体を飼料中に15、75及び375 ppmの濃度で混入し、2年間自由に摂取させた。  
対照群には検体を含まない飼料を同様に自由に摂取させた。飼料は毎週1回調製した。

投与量設定根拠:

試験項目及び結果:

一般状態及び死亡;

一般症状及び生死を毎日観察した。

投与後16週に375 ppm群雌雄各1例に流涎、その後、後肢痙攣、引き続き運動失調が時折みられた。これらの症状は、検体を含む飼料の摂餌後約30分から始まり、2~3時間継続したが、その後全て正常に回復するという状況が反復した。これらの症状は投与の経過に伴い一層明確となり、ほぼ全例で同様な症状を呈するに至った。

死亡では375 ppm投与群において、投与後83週に重篤な疥癬をもった雄1例、ならびに雌では71及び78週に各々1例みられた。これらの死亡動物における末期症状として、振せん、痙攣、完全な運動失調及び重度の流涎がみられた。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

体重変化；

毎週1回体重を測定した。

2年間にわたる各群の月毎平均体重を次表に示す。

単位：kg

投与量(ppm)	雄 (ppm)				雌 (ppm)			
	0	15	75	375	0	15	75	375
測定週								
1								
4								
8								
13								
17								
21								
26								
30								
34								
39								
43								
47								
52								
56								
60								
65								
69								
73								
78								
82								
86								
91								
95								
99								
104								
体重増加量								

有意差なし (Dunnett の多重比較検定) : 申請者にて実施  
 なお、375 ppm 群雌では78週以降、生存動物が2例であるため検定より除外した。

雄の各投与群では2年間における平均体重増加量は対照群と同等であり、開始時体重より0.8~1.6 kgの体重増加がみられた。一方、雌では0、15及び75 ppm投与群で0.7~1.2 kgの体重増加がみられたが、375 ppm投与群の2年間生存した2例のうち、1例は投与開始時と同体重であり、他の1例は約0.7 kg減少した。以上のことから、375 ppm投与群雌には投与による体重増加への影響がみられた。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

摂 餌 量；

毎日測定し、1週間単位で表示した。

2年間にわたる平均総摂餌量を次表に示す。

単位：kg

性別	投与群 (ppm)			
	0	15	75	375
雄	212.2	213.7	243.9	208.1+
雌	203.5	192.1	193.7	164.2++

[本表は申請者作成]

+ : 1例死亡のため、供試動物数は3

++ : 2例死亡のため、供試動物数は2

雄では全投与群とも対照群とほぼ同等であり、雌では15及び75 ppm投与群で投与期間をとおし、対照群とほぼ同等であった。しかしながら、375 ppm投与群雌では対照群に比べ低かった。

検体摂取量；

体重、摂餌量及び投与濃度から算出した平均の検体総摂取量(g)を次表に示す。

性別	15 ppm	75 ppm	375 ppm
雄	3.2 (0.41)	18.3 (2.11)	78.0+ (11.1)
雌	2.9 (0.45)	14.5 (2.17)	61.7++ (10.7)

+ : 1例死亡のため、供試動物数は3

++ : 2例死亡のため、供試動物数は2

( )内の数値は、1口当りの平均検体摂取量 (mg/kg/day)

飲 水 量；

投与後40から104週時まで毎日測定した。

投与後40から104週にわたる平均飲水量の経過を20週間隔で次表に示す。

単位：g/day

投与後 週	雄 投与群 (ppm)				雌 投与群 (ppm)			
	0	15	75	375	0	15	75	375
40								
60								
80								
100								
104								

\* : P<0.05 (Dunnettの多重比較検定) : 申請者にて実施

雄では時期により変動はみられるものの対照群との間に大きな差はみられなかった。雌では375 ppm投与群で投与後40週に有意な減少がみられ、それ以降の測定期間中、有意差はないが飲水量の明らかな減少傾向がみられた。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

血液学的検査；

投与開始前、投与後 1、4、8 及び 13 週及び、その後 3 カ月毎に全ての生存動物を対象に検査した。検査前の一晩絶食させた。

ヘモグロビン量 (Hb)、赤血球数 (RBC)、ヘマトクリット値 (HCT)、網赤血球 (Ret)、血小板数 (Plt)、白血球数 (WBC)、白血球分画及びプロトロンビン時間についての検査を行った。なお、赤血球数及びヘモグロビン関連項目である MCV、MCH 及び MCHC を算出した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

数値は対照群を 100 とした場合の数

検査項目	検査時期 (週)	雄 (ppm)			雌 (ppm)		
		15	75	375	15	75	375
RBC	0						
	4						
	13						
	52						
	78						
MCV	1						
	4						
	8						
	103						
MCH	0						
	39						
	52						
MCHC	0						
	8						
	64						
	103						
WBC	26						
	78						
Plt	1						
	78						
Ret	26						
Lymph (%WBC)	39						
	52						
Segm n (%WBC)	39						
	52						

\* : P<0.05、\*\* : P<0.01、\*\*\* : P<0.001 (t-検定) 空欄は有意差なし

@ : P<0.01 (Non-parametric による比較検定)

Lymph : リンパ球 Segm n : 分葉核好中球

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

75 ppm 以上の投与群雌において、赤血球及びヘモグロビンに関連する項目である MCV、MCH 及び MCHC に、有意差を示す検査時期が多くみられた。これらは、検査時期によっては RBC が有意に減少するが、ヘモグロビン (Hb) 濃度には変動がみられなかったことに対応する結果と考えられる。赤血球数、MCV、MCH 及び MCHC の変化は、投与量との相関性も見られず、かつ、投与終盤における検査及び最終検査時期 (投与後 103 週) ではいずれの場合も対照群との間に有意な差はみられなかったことから、検体投与による影響とは考えられなかった。

その他の項目においても、投与途中の時期に有意差がみられたが、投与期間をとおした変動、あるいは投与終了時にはみられないことから、毒性学的意味はほとんどないものと考えられた。

#### 血液生化学的検査；

投与開始前、投与後 1、2、4、8 及び 13 週及び、その後 3 カ月毎に全ての生存動物を対象に検査した。検査前の一晩絶食させた。

GOT (AST)、GPT (ALT)、アルカリホスファターゼ、乳酸脱水素酵素 (LDH)、脳及び肝臓 (最終屠殺) コリンエステラーゼ及び血漿/赤血球コリンエステラーゼ (ER ChE)、A/G 比、血糖、総蛋白 (TPro)、アルブミン (Alb)、全ビリルビン (bili)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Crea)、尿酸、コレステロール (Chol)、Na、K、Ca、P、Cl を検査した。

更に、BSP (Bromsulphaphtalein) による肝機能検査を投与開始前及び投与後 3、6、12、18 及び 24 カ月に測定した。

更に、対照群及び 375 ppm 投与群に対して、Phenolsulfonphthalein (PSP) による腎機能検査を投与後 78 及び 105 週に実施し、更に、耐糖試験を投与後 85 週に実施し糖調節機能への影響を検討した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

数値は対照群を 100 とした場合の数

検査項目	検査時期 (週)	雄 (ppm)			雌 (ppm)		
		15	75	375	15	75	375
血糖	0						
	8						
	13						
	26						
	52						
BUN	39						
Crea	0						
尿酸	4						
	26						
Bili	26						
	77						
Alb	1						
	103						
T Pro	0						
	1						
	13						
Na	39						
K	4						
	13						
	91						
Ca	0						
	1						
	26						
Cl	91						
P	0						
	1						
	4						
	13						
	52						
	64						
	103						
Chol	0						
	1						
	13						
	26						
GOT (AST)	0						
	13						
	26						
	52						
	64						
	77						
LDH	0						
	4						
	52						
	77						
	103						
ER ChE	1						
	8						

\*: P<0.05、\*\* : P<0.01 (t-検定) ( ) 内数値及び空欄は有意差なし  
 @: P<0.05 (Non-parametric による比較検定)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

[申請者注] 投与群における投与開始前の検査値が、有意差はないものの対照群に比べ低いあるいは高い場合がみられるが、該当項目の変動が投与による影響か否かを判断する必要があると考えられる場合には、投与開始前の検査結果（対照群を 100 とした場合の数）を上表に記載した。

血糖は 375 ppm 投与群雄で投与後 8 及び 13 週に対照群に比べ有意に高かったが、投与開始前においても有意に高く、その後の検査では有意差を示す結果は得られないことを考慮すると、検体投与による影響とは考えられなかった。加えて、影響の可能性を検討するため、投与後 85 週に耐糖試験を実施したが、対照群における血糖半減期（平均）は 14.0 分（範囲：7～20 分）であり、375 ppm 投与群のそれは 13.4 分（8～20 分）と、ほぼ同等であったことから、本剤は糖代謝調節系に影響を及ぼしていないであろうことが示唆された。

雄の Chol は、投与後 1 週では全ての投与群で有意に減少したが、投与後 13 及び 26 週では 375 ppm 投与群のみが有意に減少した。しかしながら、投与開始前においても、対照群に比べ有意に低く、投与後もその相対値には変化がみられないことを考慮すると、検体投与に起因するものとは考えられなかった。一方、雌では投与群及び対照群ほぼ同等であった。

[申請者注] 雄の Alb では、投与期間中変化がみられなかったが、375 ppm 投与群雌では試験終了時に対照群に比べ有意に減少し、検体投与の影響であると考えることが、妥当であると考えた。

GOT (AST) 及び LDH では比較的多くの検査時期（投与開始前期、中間期及び後期）に、375 ppm 投与群雄の値が対照群に比べ有意に増加した。雌では LDH の場合には前期に有意に低下し、GOT (AST) では中間期に有意に増加した。

[申請者注] GOT (AST) 及び LDH が有意に高かった検査時期が多くみられ、これらは検体投与による影響であると考えることが、妥当であると考えられる。

電解質を含め、その他の項目にも、有意な増加あるいは減少がみられたが、投与開始前にも高い場合がみられ、あるいは散発的である場合ならびに投与量との関係が明白でない場合もあり、一定の傾向がみられないことから、これらの変動は投与に起因するものではないと考えられた。

BSP を用いた肝機能検査では、全ての投与群においていずれの検査時期でも対照群に対する有意な変動はみられなかった。

血漿コリンエステラーゼでは、投与期間をとおしていずれの雌雄投与群においても有意な変動はみられなかった。しかしながら、83 週に死亡した 375 ppm 投与群雄 1 例の個別測定値は、投与後 13 週（対照群平均の約 80 %）から徐々に減少し、死亡前の検査（投与後 77 週）では約 59 %であった。375 ppm 投与群雌の死亡例ではそのような傾向はみられなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

赤血球コリンエステラーゼ (ER ChE) において、投与後 1 及び 8 週に 75 ppm 投与群で有意な増加がみられたことを除いて、いずれの検査時期及び投与群においても対照群とほぼ同等であった。脳及び肝臓における ChE においても、投与群の値は対照群とほぼ同等であった。

PSP を用いた腎機能検査において、血中 PSP 濃度の平均半減期 (分) を比較すると、投与後 78 週では対照群 (雌雄各 4 頭の平均) 及び 375 ppm 投与群 (雄 3 頭及び雌 2 頭の平均) は、各々 14.4 分及び 15.1 分であり、最終検査時 (投与後 105 週) では、同様に各々 14.1 分及び 12.1 分でほぼ同等であった。従って、腎機能に及ぼす影響はないものと考えられた。

#### 肝薬物代謝酵素への影響；

投与終了時生存動物を屠殺し、肝臓を採取し、その重量を測定後ホモジネートした。遠心分離後、その上澄液を用いて下記の肝薬物代謝酵素活性ならびに総蛋白、コレステロール (Chol)、グリコーゲン (Glyc)、トリグリセリド (Trig) 及び脂質 (Lip) を測定した。

N-脱メチル化酵素 (N-Dem)、O-脱メチル化酵素 (O-Dem)、S-脱メチル化酵素、アニリン-4-ヒドロキシラーゼ (AH)

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

数値は対照群を 100 とした場合の数

検査項目	雄 (ppm)			雌 (ppm)		
	15	75	375	15	75	375
Chol						
Glyc						
Lip						
Trig						
N-Dem						
O-Dem						
AH						

\*: P<0.05 (t-検定) ( ) 内数値及び空欄は有意差なし

#: データなし

375 ppm 投与群雌雄では、Chol、Glyc 及び Trig に減少の傾向がみられ、更に、O-Dem 及び AH に増加の傾向がみられた。375 ppm 投与群雌の Trig にのみ有意差はみられたが、同群における生存動物数は雄で 3 例、雌で 2 例であり、その毒性的意義は定かではなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

眼科学的検査；

投与開始前及び投与後 13、26、52、78 及び 104 週に検眼した。

各検査時期ともにいずれの場合も正常であり、検体投与によると考えられる傷害はみられなかった。

尿 検 査；

投与開始前、投与後 4、8 及び 13 週、及びその後 3 カ月毎に全ての生存動物を対象に検査した。検査前の一晩絶食させた。以下の項目を検査した。

pH、比重、蛋白、糖、血色素、ケトン及び沈渣の顕微鏡検査（上皮細胞、白血球、赤血球、尿酸結晶、蔞酸カルシウム等）

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

数値は対照群を 100 とした場合の数

検査項目	検査時期 (週)	雄 (ppm)			雌 (ppm)		
		15	75	375	15	75	375
比重	0						
	13						
	26						
	65						
	91						

\* : P<0.05、\*\* : P<0.01 (t-検定) 空欄は有意差なし

@@ : P<0.01 (Non-parametric test)

比重に関して、上表に示すように、75ppm 以上の投与群雄で投与期間中に有意差を示す時期も散発的にみられたが、投与終了時期の近くでは有意差がみられず、検体投与に起因する影響とは考えられなかった。その他の検査項目は、対照群とほぼ同等であり、検体投与によると考えられる変動はみられなかった。

臓器重量；

投与時に生存した全ての動物を対象とし、以下の臓器の重量を測定した。なお、最終体重を基に各臓器体重相対比を算出した。

脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、胸腺、甲状腺、下垂体、精巣、前立腺、卵巣及び子宮

いずれの投与群雌雄にも対照群と比べ、統計学的有意差の認められた臓器はみられなかった。

肉眼的病理検査；

途中死亡動物及び投与終了時に生存した全ての動物を対象とし、肉眼的病理検査を行った。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

375 ppm 投与群の死亡動物、雄 1 例では、広範囲に出血性梗塞を伴う小腸の捻転がみられ、これが原因で恐らく死亡したと考えられた。雌 2 例では肺におけるうっ血及び浮腫、ならびに肝臓におけるうっ血がみられたが、死因は不明であった。生存動物にみられた主な肉眼的病理所見は、腸管膜リンパ節、腎臓及び脾臓における充血、胆石及び骨髄淡赤色化等であった。これらの所見は対照群にもみられ、同系統及び相当する年齢のイヌに一般的にしばしばみられる病変であり、検体投与に起因すると考えられる特異な病変は観察されなかった。

病理組織学的検査；

死亡動物及び投与終了時に生存した全ての動物を対象とし、下記の臓器／組織を採取して、定法に従って標本を作製後、エオシン・ヘマロウン (eosin-hemalaun) 及びスダンⅢで染色した。

眼、骨格筋 (舌、腰筋、肋骨筋)、脳、リンパ節、甲状腺、食道、消化管、気管、肺、心臓、肝臓、胆嚢、脾臓、脾臓、腎臓、膀胱、坐骨神経、骨髄、唾液腺、乳腺、皮膚、生殖腺、子宮、前立腺、副腎

観察された各臓器／組織の病理組織学所見を表 1 に示す。

検査した臓器／組織にみられた病理組織学所見は、同系及び同年齢に一般的にみられるものであり、検体投与に起因すると考えられる病変はみられなかった。

以上の結果から、375 ppm 投与群雌雄に流涎、後肢痙攣及び運動失調が観察された。更に、同群雌雄の試験後半には死亡がみられ、体重増加抑制、摂餌量及び飲水量の減少、並びに終了時期における Alb の減少と試験後半期における GOT (AST) の増加が認められたことから、本試験における無毒性量は、75 ppm (雄：2.11 mg/kg/day、雌：2.17 mg/kg/day) と判断された。

[申請者注]

以上の結果から、375 ppm 投与群雌雄に流涎、後肢痙攣及び運動失調が観察された。更に、同群雌雄の試験後半には死亡がみられ、体重増加抑制、摂餌量の減少、雌において飲水量の減少が認められた。また、雄で比較的多くの検査時期 (投与開始前期、中間期及び後期) に GOT (AST) 及び LDH の増加、雌で検査前期に LDH の低下、GOT (AST) の中間期に増加、終了時期における雌における Alb の減少が認められたことから、本試験における無毒性量は、75 ppm (雄：2.11 mg/kg/day、雌：2.17 mg/kg/day) と判断された。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

病理組織学所見 1 (発生頻度)

性別		雄				雌			
臓器	投与群(ppm)	0	15	75	375	0	15	75	375
肺	所見/検査動物数	4	4	4	3	4	4	4	4
	肺炎、限局性間質性								
	肉芽腫(寄生虫?)、限局性								
	うっ血								
	浮腫								
肝臓	所見/検査動物数								
	肝細胞脂肪滴変化								
	うっ血、小葉中心性								
	胆管増殖								
	色素沈着、肝細胞(脂肪合成)								
	リンパ(細網細胞)浸潤、限局性								
	多形核球細胞浸潤								
	肝細胞空胞変性、小葉中心性								
胆嚢	所見/検査動物数								
	リンパ(網状球)浸潤								
腎臓	所見/検査動物数								
	色素沈着(脂肪合成)、尿細管上皮								
	脂質、上皮、皮質深層部								
膀胱	所見/検査動物数								
	多形核細胞浸潤、粘膜								
	線維化、限局性上皮								
小腸	所見/検査動物数								
	広域うっ血、浮腫・出血、全壁、限局性、(腸軸捻又は死因)								
舌	所見/検査動物数								
	単核細胞浸潤、粘膜								
皮膚	所見/検査動物数								
	皮膚炎、限局性、化膿								
	過角化症、限局性								
	毛嚢炎、限局性単核細胞								
卵巣	所見/検査動物数								
	濾胞状嚢胞								
甲状腺	所見/検査動物数								
	傍濾胞細胞過形成、限局性								
	傍濾胞細胞増殖、限局性								
	甲状腺炎、リンパ細胞								
	単核細胞浸潤、結膜部								

\* : P<0.05 (Fisher 検定) : 申請者にて実施

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

病理組織学所見 2 (発生頻度)

性別		雄				雌			
臓器	投与群(ppm)	0	15	75	375	0	15	75	375
副甲状腺	所見/検査動物数	2	3	4	3	4	4	3	3
	嚢胞								
副腎	所見/検査動物								
	結節性過形成、皮質								
	単核細胞浸潤、皮質								
	形質変化領域、皮質								
骨髓	所見/検査動物								
	白結球産生減少								
	巨核球細胞産生減少								
脾臓	所見/検査動物								
	濾胞萎縮								
	ヘモジデリン増加								
	造血像								
胸腺	所見/検査動物								
	退縮								
下垂体	所見/検査動物								
	嚢胞(前葉)								
神経	所見/検査動物								
	変性、限局性マクロファージ								
眼球	所見/検査動物								
	単核細胞浸潤、周囲部								
	単核細胞浸潤、結膜部								

\* : P<0.05 (Fisher 検定) : 申請者にて実施

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

ラットを用いた2年間混餌投与試験

[資料 No. 17]

試験機関：

報告書作成年：

検体の純度：

供試動物： SPF ラット、投与開始時3～4週齢  
体重；雄 57.4～111.4 g、雌 52.9～111.8 g、1群雌雄各40匹

群構成；雌雄とも各群40匹からなる4群を設定

群	雄	雌
K 対照 (0 ppm) 群	40 匹	40 匹
A 低用量 (5 ppm) 群	40 匹	40 匹
B 中用量 (25 ppm) 群	40 匹	40 匹
C 高用量 (100 ppm) 群	40 匹	40 匹

投与期間：104週間



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

投与方法：検体を 0、5、25、100 ppm の濃度でラット飼育用標準粉末飼料 (NAFAG No. 895) に混入し、2 年間摂取させた。なお、検体を混入した飼料は週 1 回調製し、検体の含有量は定期的にチェックした。

投与量設定根拠；

統計解析：通常、体重、摂餌量、摂水量の解析は、Student の t-検定で、それ以外の計測データはパラメトリックまたはノンパラメトリックな統計解析法を用い、一部特殊な解析は、背景データの対照値の分布を基に行った。母数による解析には、変動の均一性の検定、変動の片側解析、t-検定、Dunnett の検定を用い、母数によらない解析は、Mann-Whitney の U 検定、Kruskal-Wallis の検定、Dunn-Bonferroni の検定により実施した。

試験項目及び結果：

一般症状及び死亡率；

一般症状及び生死を 2 年間毎日観察した。

試験期間中、中毒症状は認められなかった。

死亡例は、各群ともに投与期間の終期 6 ヶ月間に集中しており、雄の中用量群及び高用量群で死亡率の低下が認められたが、対照群と比較して明確な差ではなかった。

性	投与群	死亡例数		生存動物数
		75~104 週	1~104 週	
雄	対照群	18/40	25/40 (63%)	15/40
	5 ppm 群	17/40	25/40 (63%)	15/40
	25 ppm 群	14/40	19/40 (48%)	21/40
	100 ppm 群	15/40	19/40 (48%)	21/40
雌	対照群	9/40	13/40 (33%)	27/40
	5 ppm 群	8/40	14/40 (35%)	26/40
	25 ppm 群	9/40	15/40 (38%)	25/40
	100 ppm 群	9/40	16/40 (40%)	24/40

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

体重変化；

1群当り雌雄各30匹について、体重を週1回測定した。2年間にわたる各群の月毎平均体重を次表に示す。

単位：g

性別 投与量(ppm)	雄 (ppm)				雌 (ppm)			
	0	5	25	100	0	5	25	100
測定週								
0								
4								
8								
13								
17								
21								
26								
30								
34								
39								
43								
47								
52								
56								
60								
65								
69								
73								
78								
82								
86								
91								
95								
99								
104								

有意差なし (t-検定)

雄の100 ppm投与群において、投与4週以降ほとんどの体重測定時に、他の群と比較すると体重が下回る傾向にあり、特に投与98週以降では、対照群と比較し20~30g低値であった (t-検定で有意差なし)。雌では、25 ppm投与群で投与後半に他の群と比較すると体重がやや低値 (t-検定で有意差なし) となったが、雌雄ともに、全投与期間をとおして対照群と各投与群間で体重に t-検定の結果、有意な差は認められなかった。

[申請者注]

雄の100 ppm投与群及び雌の25 ppm投与群で見られた体重低値は、有意差のない変化であることから、検体投与の毒性影響としないことを妥当と判断する。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

飼料摂取量；

1群当り雌雄各30匹について、飼料摂取量を週1回測定した。摂取量は雄の25 ppm投与群と100 ppm投与群で軽度の減少（それぞれ対照群比で-4.2%と-3.4%）があったが、雌では3投与群とも、わずかに増加（+2.8~3.8%）した。

	全飼料摂取量 (g)		一口平均飼料摂取量	
	雄	雌	雄	雌
対照群	15250 (100)	11395 (100)	21.0	15.9
5 ppm 群	15125 (99.1)	11827 (103.8)	20.8	16.2
25 ppm 群	14610 (95.8)	11705 (102.8)	20.1	16.0
100 ppm 群	14630 (96.6)	11728 (102.9)	20.2	16.0

( ) : 数値は対照群を100とした場合の数

2年間にわたる各群の月毎平均飼料摂取量を示す。

単位：g/週

性別 投与量(ppm)	雄 (ppm)				雌 (ppm)			
	0	5	25	100	0	5	25	100
測定週								
1	66	74***	69	65	71	71	68	66*
4	133	135	134	136	106	106	104	101
8	142	138	138	140	105	104	104	103
13	144	136*	138	137	105	102	99	104
17	142	140	140	141	103	109*	106	109*
21	148	147	138*	138	104	112*	113*	112*
26	149	147	144	148	110	111	126	108
30	158	149	142**	146*	105	116*	116**	112
34	152	148	144*	141*	109	113	111	112
39	159	151	145**	147*	104	108	113*	110
43	157	146*	142**	150	107	112	114	110
47	154	155	136*	152	110	118*	113	112
52	149	155	150	145	1110	113	119*	114
56	154	151	144*	138*	104	119**	116*	118**
60	157	151	141	147	109	110	126**	116
65	159	154	147	147	114	120	122	122
69	152	141	152	146	115	118	122	118
73	149	141	135*	148	116	118	115	114
78	151	149	145	150	117	117	118	118
82	146	145	144	147	118	123	112	123
86	155	145	140**	148	120	127	118	127
91	153	154	149	144	120	121	117	118
95	142	152	144	136	115	121	120	117
99	140	132	141	142	116	120	118	119
104	132	146	145	130	117	119	115	117

\* : P<0.05、\*\* : P<0.01、\*\*\* : P<0.001 (t-検定)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

[申請者注]

平均飼料摂取量に関し、上記の表のとおり有意差が散見されるが、投与用量又は投与期間に相関した関係が見られず、雄の投与群では低値傾向が、雌投与群では増加傾向と雌雄間においても一定傾向が見られないことから、検体投与の毒性影響としないことを妥当と判断する。

検体摂取量；

飼料摂取量及び投与濃度から算出した1日当りの平均検体摂取量は次の通りであり、実際の1日当たりの検体摂取量は、雄よりも雌が17～26%高かった。

	検体総摂取量 (mg)		1日当り平均検体摂取量 (mg/kg/day)	
	雄	雌	雄	雌
対照群	—	—	—	—
5 ppm 群	77	59	0.25	0.30
25 ppm 群	365	293	1.22	1.54
100 ppm 群	1473	1173	5.1	6.0

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

血液学的検査；

試験開始1、2、3、6、9、12、15、18、21、24ヶ月後に、採血前1晩絶食させたのち、1群当り雌雄各5匹を対象として血液を採取して、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数、網状赤血球数、総白血球数を測定し、これらの測定値に基づいて、MCV、MCH、MCHCを算出するとともに、血液塗沫標本の顕微鏡観察により白血球分類を行って、その百分比を算出した。

その結果、検体投与群では幾つかの測定項目で、単発的に対照群との間で差がみられたが、認められた変化に用量や投与期間との相関はなく、一定の傾向も認められなかった。

[申請者注]

血液学的検査に関し、下記の表のとおり有意差が散見されるが、投与用量又は投与期間に相関した関係が見られず、雌雄間においても一定傾向が見られないことから、検体投与の毒性影響としないことを妥当と判断する。

血液学的検査結果

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		5	25	100	5	25	100
検査項目	検査時期 (月)						
赤血球数	1						
	2						
	15						
ヘマトクリット	15						
ヘモグロビン	1						
MCV	3						
	15						
MCH	1						
	2						
	3						
	6						
	12						

↑↓ : P<0.05    ↑↓ : P<0.01 (多重比較検定)  
 表中の数字は対照群を100とした場合の数を示す

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

#### 血液生化学的検査；

血液学的検査と同時に採取した血液を用いて、代謝への影響の指標として、血糖、BUN、総蛋白、アルブミン、総コレステロールを、酵素系の指標として血漿 GPT (ALT)、アルカリホスファターゼ、血漿及び赤血球中のコリンエステラーゼ活性値を測定し、さらに投与終了後の剖検時に脳の一部を採取して脳内のコリンエステラーゼ活性を測定した。

血糖、尿素窒素 (BUN)、総蛋白、アルブミン、総コレステロールに関しては、個体別にみると対照群を含む一部の動物で、正常値をわずかに超える測定項目が認められたが、平均値で比較するといずれの項目も正常の範囲内にあり、用量あるいは投与期間との相関も認められなかった。なお、加齢に伴う変化として、特に雄で投与 26 週以降、総コレステロールの上昇を認めたが、検体投与用量および投与期間と相関した差は認められなかった。

血漿中のコリンエステラーゼ活性は、同一群内においても個体差が大きかったが、雄では統計学的に有意な差は認められなかった。一方、雌では 100ppm 投与群において、対照群に比較して投与 7～18 ヶ月までの検査期間において活性が低下していたが、統計学的な有意差はなく、いずれも許容範囲内の変化であり (対照群：4.236～5.486 U/mL、100ppm 投与群：3.796～4.478 U/mL (対照群を 100 とした場合の値：90～82%))、投与末期にはこのような変化は消失した。雌雄ともに赤血球中の及び脳内のコリンエステラーゼ活性に生物学的に意味のある変化は認められなかった。以上のように、本検体はコリンエステラーゼ活性に影響を与えなかった。

SGPT (ALT) 活性、アルカリホスファターゼ活性とともに、対照群と比較すると幾つかの測定時期において統計学的に有意な差が認められたが、これらの変化はいずれも不規則で用量との相関も認められず、検体投与の影響ではなかった。

[参考] 当該毒性試験機関における各項目における正常範囲は次の通りである。

血糖	60	～	115	mg/dL
尿素窒素 (BUN)	10	～	30	mg/dL
総蛋白 (血漿)	6.0	～	8.0	g/dL
アルブミン (血漿)	2.9	～	4.1	g/dL
総コレステロール (加齢とともに増加する。雌より雄で高値。)	60	～	250	mg/dL
血漿コリンエステラーゼ (加齢とともに増加する。)				
雄	0.7	～	1.5	U/mL
雌	2.0	～	5 又は以上	U/mL
赤血球コリンエステラーゼ	2.0	～	3.5	U/mL
GPT (ALT)	10	～	40	mg/dL
アルカリホスファターゼ (加齢とともに数値は小さくなる)				
雄	200	～	10	IU
雌	160	～	0	IU

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

血液生化学的検査における週毎の群平均値

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		0	5	25	100	0	5	25	100
検査項目	検査時期(月)								
血糖値	2								
	15								
	18								
	24								
BUN	2								
総蛋白量	1								
	6								
	12								
	15								
	24								
アルブミン量	12								
	15								
	24								
総コレステロール量	2								
赤血球コリン エステラーゼ 活性	2								
	3								
	6								
	12								
	24								
アルカリホス ファターゼ 活性	2								
	3								
	6								
	24								

上段の数値は対照群を 100 とした場合の数  
 ↓ : P<0.05      ↑↓ : P<0.01 (多重比較検定)      下段の ( ) : 実測値

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

肝薬物代謝酵素の測定；

検体投与終了後、剖検時に1群当り雌雄各5匹を対象として肝臓組織の一部を採取して、肝ホモジネートを作製し、10000×gで10分間冷却遠心した後、ミトコンドリア層を取り除いて、全蛋白量、コレステロール量、N-デメチラーゼ(NDM)、O-デメチラーゼ(ODM)、S-デメチラーゼ(SDM)、アニリン-4-ヒドロキシラーゼ(ANHYDR)、チトクロームP-450活性(P-450)を測定した。

その結果、雌雄全投与群でチトクロームP-450活性が軽度に減少したが、投与量との相関は認められなかった。また、雄では25 ppm投与群においてN-デメチラーゼ活性が低下する傾向にあり、雌では、25 ppm投与群でN-デメチラーゼ活性、O-デメチラーゼ活性、及びS-デメチラーゼ活性が軽度に上昇した。さらに100 ppm投与群ではN-デメチラーゼ活性が上昇したが、いずれの変化も対照群との間に統計学的な有意差はなく、用量との相関も認められなかった。

肝薬物代謝関連酵素の検査結果

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		0	5	25	100	0	5	25	100
検査項目	検査時期(月)								
P-450 NMol	24								
NDM NMol/E									
ODM NMol/E									
SDM NMol/E									
ANHYDR NMol/E									

上段の数値は対照群を100とした場合の数 下段の( )：実測値  
 ↓：P<0.01 (多重比較検定) 空欄は有意差なし

以上のように、血液生化学検査において幾つかの検査項目に所見が認められたが、いずれも用量あるいは投与期間との相関は認められなかった。また、検体投与によるコリンエステラーゼ、SGPT(ALT)、アルカリホスファターゼへの影響も認められなかった。さらに肝ホモジネートを用いた検査では、各投与群でチトクロームP-450活性が軽度に低下したが、用量相関はなく、その他の薬物代謝関連酵素への影響も認められなかった。

なお、104週の投与終了時に、雌の対照群及び100 ppm投与群から各8匹の動物を選択して、BSP試験を実施したが、対照群と100 ppm投与群の間で血中のBSPの残存率に有意な差はなく、肝における色素排泄能に対する検体投与の影響も認められなかった。



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

#### 尿 検 査 ;

試験開始 1、3、6、12、15、18、21、24 ヶ月後に 1 群当り雌雄各 5 匹を対象として採尿用の特殊ケージに個別に収容して 24 時間尿を採取し、pH、比重、蛋白、グルコース、潜血、ケトンについて検査し、更に 1000×g で 5 分間遠心して得られた沈渣の鏡検を行った。また、21 ヶ月後からは尿量も測定した。なお、採尿中は絶食としたが、飲料水は自由に摂取させた。

その結果、対照群を含むすべての試験群で、尿蛋白が増加したが、この変化は雄の方が雌より早期に現れた。投与期間中に、雌雄ともに、対照群を含む全試験群でケトン、潜血が散発的に陽性となり、雄では 65 週以降、雌では 52 週以降白血球数が増加したが、これらの所見はいずれも毒性学的に重要な所見ではなかった。

#### 臓器重量 ;

投与期間中に死亡または瀕死状態に陥り屠殺した例は、病理解剖後、病理組織検査用に組織を採取した。104 週の投与期間終了時に生存していた全例については、24 時間の絶食後、ネンブタール麻酔下で屠殺剖検し、各群雌雄各 10 匹を対象に最終体重及び以下の臓器の重量を測定して、体重に対する臓器重量比（相対重量：%）を算出した。

##### 重量測定臓器

甲状腺、副腎、腎臓、脾臓、肝臓、心臓、肺、精のう、精巣、卵巣、前立腺、子宮、脳、下垂体

その結果、各群の各臓器重量は絶対重量、体重に対する相対重量いずれも対照群と比較して統計学的に有意な差はなく、検体投与の影響は認められなかった。

#### 肉眼的病理検査 ;

投与期間中に死亡または瀕死状態に陥り屠殺した例、104 週の投与期間終了時に生存していた全例については、24 時間の絶食後、ネンブタール麻酔下で屠殺剖検し、肉眼的病理検査を実施した。

投与期間中に死亡した例あるいは投与終了時に屠殺剖検した例で、幾つかの臓器に所見が観察されたが、これらの所見はいずれもこの系統のラットで通常みられる所見であり、検体投与の影響は認められなかった。

#### 病理組織学的所見 ;

剖検時に採取した以下に示す組織または臓器をブアン液あるいはさらに 4%ホルマリンで固定したのち、パラフィン包埋し、常法に従って標本作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色標本作製した。さらにズダンⅢ染色標本作製して顕微鏡観察した。

病理組織検査は、対照群及び投与群全例について実施した。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

### 検査対象臓器

甲状腺、副腎、腎臓、脾臓、肝臓、胸腺、心臓、肺、精のう、精巣、卵巣、前立腺、子宮、脳、下垂体、唾液腺、乳腺、皮膚、腸間膜のリンパ節、膵臓、気管、舌、食道、腎臓、十二指腸、小腸、大腸、膀胱、坐骨神経、骨髄（大腿骨）、骨格筋、眼、視神経

なお、各病理変化の強さはその程度に応じて4段階に格付けした。

0=両側臓器に変化なし

1=軽度の病変または顕微鏡下で確認できるほどの小さな腫瘍

2=中等度の病変または中等大の腫瘍

3=重度の病変または大きい腫瘍

### 非腫瘍性病変

観察された主な非腫瘍性病変の発生例数を表1に示す。

主な非腫瘍性病変として観察された病変の多くは、加齢に伴う自然発生性と考えられる変化であった。すなわち、腎臓における慢性進行性腎症とこれに伴う上皮小体の過形成、膵臓における外分泌腺の萎縮、線維化、腺管の増殖などのほかに多くの臓器に多発性動脈炎（特に雄に多発し、同様の動脈病変は腸間膜、消化管、精巣にも観察された）が観察されたほか、雄ではしばしば動脈炎との関連が認められた両側性あるいは片側性の精細管萎縮も高頻度に認められたが、これらの変化の発生頻度あるいは変化の強度には、対照群と比較して差は認められなかった。また、加齢とともに自然発生する末梢神経の変性、ビタミンEあるいはセレン欠乏による変化と類似した筋ジストロフィーなどが比較的高頻度に観察されたが、雌雄ともに、この変化の発生頻度は対照群と比較して各投与群で著しく減少していた。さらに、肝細胞の脂肪化、核の大小不同の発生頻度も投与群で減少する傾向にあったが、いずれも用量に関連した変化ではなかった。

一方、肺の病理所見として主に肺炎、間質性肺炎、泡沫細胞集簇巣などが観察されたが、雌雄ともに検体投与群では肺炎の発生例数が減少し、逆に間質性肺炎の発生例数が増加する傾向にあり、雌雄の100 ppm投与群で特に著明であった。また副腎では、対照群を含むすべての実験群で皮質細胞の異型細胞巣が散発的に認められたが、雌雄ともに100 ppm投与群で発生例数が増加する傾向にあった。なお、腎臓における慢性進行性腎症は、本系統のラットに自然発生する加齢性疾患で、その発生頻度及び変化の強度は雌より雄で顕著であり、雄途中死亡例の死因の大部分は慢性進行性腎症によるものであった。

### 腫瘍性病変

各群に観察された各種腫瘍の発現頻度を臓器別に表2に示す。

腫瘍性病変の総括を表3に示すように、病理組織学的検査を実施した動物の中で、何らかの腫瘍が認められた動物数は、雄では対照群40匹中21匹(52.5%)、25 ppm投与群40匹中11匹(27.5%)、50 ppm投与群40匹中17匹(42.5%)、100 ppm投与群39匹中24匹(61.5%)、雌では対照群40匹中26匹(65%)、25 ppm投与

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

群 38 匹中 24 匹 (63.2%)、50 ppm 投与群 38 匹中 19 匹 (50%)、100 ppm 投与群 40 匹中 31 匹 (77.5%) であった。

雄では、25 ppm 投与群及び 50 ppm 投与群、雌では 50 ppm 投与群で対照群に比較すると腫瘍発生動物数がやや減少する傾向にあり、雌雄ともに 100 ppm 投与群のそれはやや増加する傾向にあったが、その発現頻度は対照群のそれに相応するものであった。

また、雌雄ともに、25 ppm 投与群及び 50 ppm 投与群で総腫瘍数が減少する傾向が認められたが、100 ppm 投与群では対照群との間に差は見られなかった。

このうち、悪性腫瘍は、雄の対照群に 2 個、100 ppm 投与群に 5 個、雌の対照群、50 ppm 投与群及び 100 ppm 投与群にそれぞれ 2 個、25 ppm 投与群に 3 個認められたが、これらは様々な臓器から発生し、これらの腫瘍はある決まった特徴を有するものではなく、どの例も検体投与との関連を思わせるものではなかった。

なお、加齢に伴う自然発生性病変と考えられる甲状腺の傍濾胞細胞の慢性あるいは限局性増殖巣が、対照群を含め検体投与群で多発した。

なお、雌の 100 ppm 投与群で腫瘍発生例数がやや増加した原因は、主として良性の乳腺腫瘍特に線維腺腫の発生が増加したことによるものである。

結論：以上の結果に示される様に、検体チオシクロラムを 5 ppm (雄：0.25 mg/kg/day、雌：0.30 mg/kg/day に相当)、25 ppm (雄：1.22 mg/kg/day、雌：1.54 mg/kg/day に相当)、100 ppm (雄：5.1 mg/kg/day、雌：6.0 mg/kg/day に相当) の割合で飼料に添加し、2 年間ラットに混餌投与した結果、100ppm 投与群の雄の体重が対照群と比較して投与 4 週以降やや低くなる傾向にあり、投与終了時では平均体重が約 36 g (約 8%) 低かったが、雌雄ともに対照群と比較すると体重に全投与期間をとおして統計学的に有意な差は認められなかった。

また、雌雄ともに一般状態に中毒性の変化はなく、飼料摂餌量、血液学的検査所見、血液生化学的検査所見、尿検査所見に検体投与に起因したと考えられる影響は認められなかった。さらに、血漿中、赤血球中、脳内のコリンエステラーゼ活性に検体投与の影響はなく、剖検時採取した肝組織を用いて肝薬物代謝関連酵素を測定した結果、各投与群でチトクローム P-450 の活性がわずかに低下したが、N-デメチラーゼをはじめとするその他の肝薬物代謝関連酵素への影響は認められなかった。

投与終了時に実施した病理学的検査においても、検体投与による発がん性を示唆する変化はなく、非腫瘍性変化として、雌雄ともに検体投与群で、肺炎の減少傾向、100 ppm 投与群で間質性肺炎及び副腎での異型細胞巣の増加傾向が認められたが、その他に検体投与により惹起されたと考えられる病理学的変化も認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下におけるチオシクロラムの無毒性量は、雌雄とも 100 ppm (雄 5.1 mg/kg/day、雌 6.0 mg/kg/day) であると判断される。また、検体投与による発癌性は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表1 主な非腫瘍性病変（1）

検査時期	性別		雄				雌			
	臓器	投与群 (ppm)	0	5	25	100	0	5	25	100
死亡・切迫殺	肝臓	所見/検査動物数	25	25	19	19	13	14	14	11
		核大小不同								
		空胞化								
		胆管過形成								
		線維化								
		細胞壊死								
		リンパ球浸潤								
		動脈炎								
	膵臓	所見/検査動物数								
		線維化								
		外分泌腺萎縮								
		外分泌腺過形成								
		島過形成								
		動脈炎								
	腎臓	所見/検査動物数								
		慢性進行性腎症								
		水腎症								
		尿細管拡張								
		乳頭・腎盂石灰化								
		動脈炎								
	甲状腺	所見/検査動物数								
		傍濾胞細胞;び慢性/限局性増殖巣								
	上皮小体	所見/検査動物数								
		過形成								
	肺	所見/検査動物数								
		肺炎								
		間質性肺炎								
		泡沫細胞集簇巣								
肺胞上皮細胞増生										

\* : P<0.05、\*\* : P<0.01 (Fisher 検定) : 申請者にて実施

表 1 主な非腫瘍性病変 (2)

検査時期	性別		雄				雌				
	臓器	投与群 (ppm)	0	5	25	100	0	5	25	100	
死亡・ 切迫殺	心臓	所見/検査動物数									
		単核細胞浸潤巣									
		限局性/び慢性線維化									
		動脈炎									
	骨格筋	所見/検査動物数									
		筋ジストロフィー									
	精巣	所見/検査動物数									
		精細管変性・萎縮									
		動脈炎									
	子宮	所見/検査動物数									
		扁平上皮化生									
		腺内腔拡張									
		腺増生									
	副腎	所見/検査動物数									
		束状層細胞脂肪化									
		網状層細胞色素沈着									
皮質異型細胞巣											
最終屠殺	肝臓	所見/検査動物数									
		核大小不同									
		空胞化									
		胆管過形成									
		線維化									
		細胞壊死									
		リンパ球浸潤									
		動脈炎									
	膵臓	所見/検査動物数									
		線維化									
		外分泌腺萎縮									
		外分泌腺過形成									
		島過形成									
		動脈炎									

\* : P<0.05、\*\* : P<0.01 (Fisher 検定) : 申請者にて実施

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表1 主な非腫瘍性病変(3)

検査時期	性別		雄				雌				
	臓器	投与群(ppm)	0	5	25	100	0	5	25	100	
最終屠殺	腎臓	所見/検査動物数									
		慢性進行性腎症									
		水腎症									
		尿細管拡張									
		乳頭・腎盂石灰化									
		動脈炎									
	甲状腺	所見/検査動物数									
		傍濾胞細胞;び慢性/限局性増殖巣									
	上皮小体	所見/検査動物数									
		過形成									
	肺	所見/検査動物数									
		肺炎									
		間質性肺炎									
		泡沫細胞集簇巣									
		肺胞上皮細胞増生									
	心臓	所見/検査動物数									
		単核細胞浸潤巣									
		限局性/び慢性線維化									
		動脈炎									
	骨格筋	所見/検査動物数									
		筋ジストロフィー									
	精巣	所見/検査動物数									
		精細管変性・萎縮									
		動脈炎									
	子宮	所見/検査動物数									
		扁平上皮化生									
		腺内腔拡張									
		腺増生									
	副腎	所見/検査動物数									
		束状層細胞脂肪化									
		網状層細胞色素沈着									
		皮質異型細胞巣									

\*: P<0.05, \*\*: P<0.01 (Fisher 検定): 申請者にて実施

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 1 主な非腫瘍性病変 (4)

検査時期	性別		雄				雌				
	臓器	投与群 (ppm)	0	5	25	100	0	5	25	100	
全動物	肝臓	所見/検査動物数									
		核大小不同									
		空胞化									
		胆管過形成									
		線維化									
		細胞壊死									
		リンパ球浸潤									
		動脈炎									
	膵臓	所見/検査動物数									
		線維化									
		外分泌腺萎縮									
		外分泌腺過形成									
		島過形成									
		動脈炎									
	腎臓	所見/検査動物数									
		慢性進行性腎症									
		水腎症									
		尿細管拡張									
		乳頭・腎盂石灰化									
		動脈炎									
	甲状腺	所見/検査動物数									
		傍濾胞細胞;び慢性/限局性増殖巣									
	上皮小体	所見/検査動物数									
		過形成									
	肺	所見/検査動物数									
		肺炎									
		間質性肺炎									
		泡抹細胞集簇巣									
肺胞上皮細胞増生											

\* : P<0.05、\*\* : P<0.01 (Fisher 検定) : 申請者にて実施

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 1 主な非腫瘍性病変 (5)

検査時期	性別		雄				雌				
	臓器	投与群 (ppm)	0	5	25	100	0	5	25	100	
全動物	心臓	所見/検査動物数									
		単核細胞浸潤巣									
		限局性/び慢性線維化									
		動脈炎									
	骨格筋	所見/検査動物数									
		筋ジストロフィー									
	精巣	所見/検査動物数									
		精細管変性・萎縮									
		動脈炎									
	子宮	所見/検査動物数									
		扁平上皮化生									
		腺内腔拡張									
		腺増生									
	副腎	所見/検査動物数									
		束状層細胞脂肪化									
		網状層細胞色素沈着									
皮質異型細胞巣											

\* : P<0.05、\*\* : P<0.01 (Fisher 検定) : 申請者にて実施



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 2 腫瘍性病変 (1)

検査時期	性別		雄				雌					
	臓器	投与群 (ppm)	0	5	25	100	0	5	25	100		
死亡・切迫殺	乳腺	所見/検査動物数	B/M									
		腺腫	B									
		線維腺腫	B									
		腺癌	M									
	下垂体	所見/検査動物数	B/M									
		腺腫	B									
		腺癌	M									
	脾臓	所見/検査動物数	B/M									
		島腺腫	B									
	甲状腺	所見/検査動物数	B/M									
		腺腫	B									
		傍濾胞細胞腺腫	B									
	副腎	所見/検査動物数	B/M									
		皮質腺腫	B									
		褐色細胞腫	B									
	肺	所見/検査動物数	B/M									
		気管支肺癌	M									
	皮膚	所見/検査動物数	B/M									
		血管周囲細胞腫	B									
		線維肉腫	M									
	肝臓	所見/検査動物数	B/M									
リンパ肉腫		M										
腎臓	所見/検査動物数	B/M										
	腎芽細胞腫	M										
膀胱	所見/検査動物数	B/M										
	移行上皮腺腫	B										
胃	所見/検査動物数	B/M										
	平滑筋線維肉腫	M										
リンパ節	所見/検査動物数	B/M										
	血管腫	B										

略号：B/良性腫瘍、M/悪性腫瘍

有意差なし (Fisher 検定)：申請者にて実施

注：100 ppm 投与群雄の肝臓、脾臓及び骨髄にみられたリンパ肉腫は、同一個体である (動物番号 201)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 2 腫瘍性病変 (2)

検査時期	性別		雄				雌					
	臓器	投与群 (ppm)	0	5	25	100	0	5	25	100		
死亡・切迫殺	脾臓	所見/検査動物数	B/M									
		リンパ肉腫	M									
	骨髄	所見/検査動物数	B/M									
		リンパ肉腫	M									
最終屠殺	乳腺	所見/検査動物数	B/M									
		腺腫	B									
		線維腺腫	B									
		腺癌	M									
	下垂体	所見/検査動物数	B/M									
		腺腫	B									
		腺癌	M									
	膵臓	所見/検査動物数	B/M									
		島腺腫	B									
	甲状腺	所見/検査動物数	B/M									
		傍濾胞細胞腺腫	B									
		傍濾胞細胞癌	M									
	副腎	所見/検査動物数	B/M									
		皮質腺腫	B									
		褐色細胞腫	B									
		線維粘液腫	B									
	皮膚	所見/検査動物数	B/M									
		脂腺腺腫	B									
		線維腫	B									
		血管腫	B									
		血管肉腫	M									
	卵巢	所見/検査動物数	B/M									
		肉腫	M									
	腎臓	所見/検査動物数	B/M									
		線維脂肪腫	B									
	子宮	所見/検査動物数	B/M									
		平滑筋線維腫	B									
		円形細胞肉腫	M									

略号：B/良性腫瘍、M/悪性腫瘍

\*: P<0.05、\*\*: P<0.01 (Fisher 検定) : 申請者にて実施

注： 100 ppm 投与群雄の肝臓、脾臓及び骨髄にみられたリンパ肉腫は、同一個体である (動物番号 201)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表2 腫瘍性病変(3)

検査時期	性別		雄				雌					
	臓器	投与群(ppm)	0	5	25	100	0	5	25	100		
最終屠殺	膀胱	所見/検査動物数	B/M									
		移行上皮腺腫	B?									
	リンパ節	所見/検査動物数	B/M									
		リンパ肉腫	M									
	小腸	所見/検査動物数	B/M									
		腺癌	M									
	大網	所見/検査動物数	B/M									
		平滑筋肉腫	M									
		血管肉腫	M									
全動物	乳腺	所見/検査動物数	B/M									
		腺腫	B									
		線維腺腫	B									
		腺癌	M									
	下垂体	所見/検査動物数	B/M									
		腺腫	B									
		腺癌	M									
	膵臓	所見/検査動物数	B/M									
		島腺腫	B									
	甲状腺	所見/検査動物数	B/M									
		腺腫	B									
		傍濾胞細胞腺腫	B									
		傍濾胞細胞癌	M									
	副腎	所見/検査動物数	B/M									
		皮質腺腫	B									
		褐色細胞腫	B									
		線維粘液腫	B									
	皮膚	所見/検査動物数	B/M									
		脂腺腺腫	B									
		線維腫	B									
		血管腫	B									
血管周囲細胞腫		B										
線維肉腫		M										
血管肉腫		M										

略号：B/良性腫瘍、M/悪性腫瘍

\*\*：P<0.01 (Fisher 検定)：申請者にて実施

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 2 腫瘍性病変 (4)

検査時期	性別		雄				雌			
	臓器	投与群(ppm)	0	5	25	100	0	5	25	100
全動物	肺	所見/検査動物数	B/M							
		気管支肺癌	M							
	卵巣	所見/検査動物数	B/M							
		肉腫	M							
	腎臓	所見/検査動物数	B/M							
		線維脂肪腫	B							
		腎芽細胞腫	M							
	膀胱	所見/検査動物数	B/M							
		移行上皮腺腫	B							
	子宮	所見/検査動物数	B/M							
		平滑筋線維腫	B							
		円形細胞肉腫	M							
	胃	所見/検査動物数	B/M							
		平滑筋線維肉腫	M							
	小腸	所見/検査動物数	B/M							
		腺癌	M							
	リンパ節	所見/検査動物数	B/M							
		血管腫	B							
		リンパ肉腫	M							
	肝臓	所見/検査動物数	B/M							
		リンパ肉腫	M							
	脾臓	所見/検査動物数	B/M							
		リンパ肉腫	M							
	骨髄	所見/検査動物数	B/M							
リンパ肉腫		M								
大網	所見/検査動物数	B/M								
	平滑筋肉腫	M								
	血管肉腫	M								

略号：B/良性腫瘍、M/悪性腫瘍

有意差なし (Fisher 検定)：申請者にて実施

注：100 ppm 投与群雄の肝臓、脾臓及び骨髄にみられたリンパ肉腫は、同一個体である(動物番号 201)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 3 腫瘍性病変

性 別	雄				雌			
投与群 (ppm)	0	25	50	100	0	25	50	100
検査動物数								
腫瘍発生動物数								
総腫瘍数								
良性腫瘍数								
悪性腫瘍数								

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

[申請者注] ラット2年間混餌投与試験の供試動物数および投与量の妥当性について

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

マウスを用いた飼料混入投与による 78 週間発がん性試験

[資料 No. 18]

試験機関：

報告書作成年：

検体の純度：

供試動物： マウス、投与開始時 5 週齢、  
開始時平均体重：雄 28.1 g、雌 23.6 g、1 群雌雄各 52 匹

試験期間：18 ヶ月 雄； 年 9 月 5 日～ 年 3 月 4 日  
雌； 年 9 月 13 日～ 年 3 月 12 日

投与方法：検体を 0、30、100 及び 300 ppm の濃度で飼料に混入し、18 ヶ月間にわたって随時摂食させた。検体を混入した飼料は原則として 1 週間に 1 回の頻度で調製した。

用量設定根拠：

試験項目及び結果：

一般状態及び死亡率；

一般状態及び生死を毎日観察した。また触診を含む詳細な臨床観察を少なくとも毎週 2 回実施した。

対照群と比べ統計学的有意差が認められた一般症状を下表に示す。

一般症状	投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	0	30	100	300	0	30	100	300
自発運動量の減少								
呼吸緩徐								
触毛脱毛								
被毛の汚れ								
脱毛								

Fisher の直接確率計算法 ↑ ↓ : P<0.05 ↑ ↓ : P<0.01  
表中の数値は実測値を示す

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

統計学的に有意な変動が各検体投与群で観察されたが、いずれも発生頻度の有意な減少あるいは投与用量との相関性のない変化であることから、検体投与に関連のない変化であると考えられた。

試験終了時の死亡率を下表に示す。

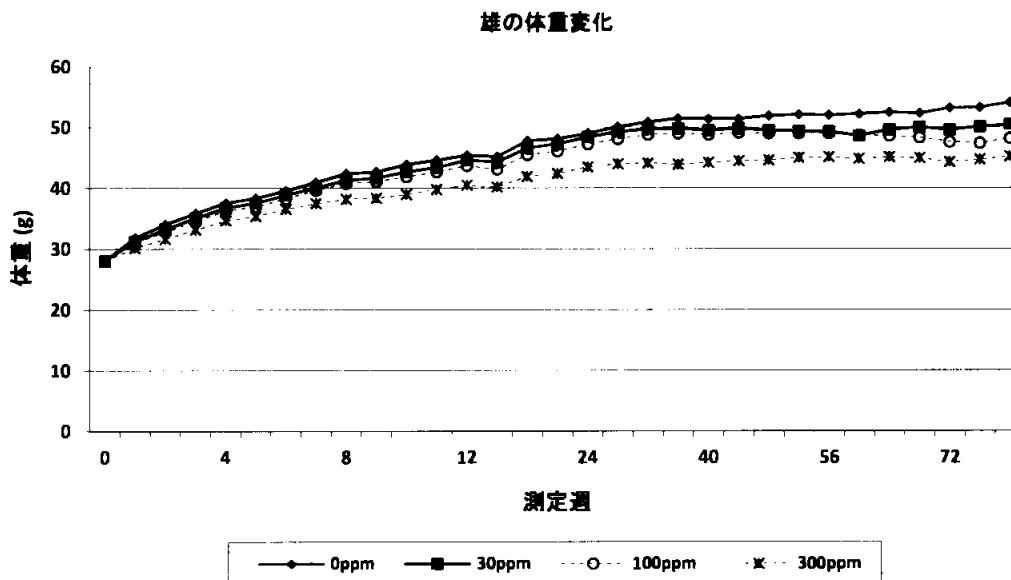
投与量 (ppm)	0	30	100	300
死亡率 (%)	雄			
	雌			

いずれの投与群においても雌雄とも検体投与の影響はみられなかった。

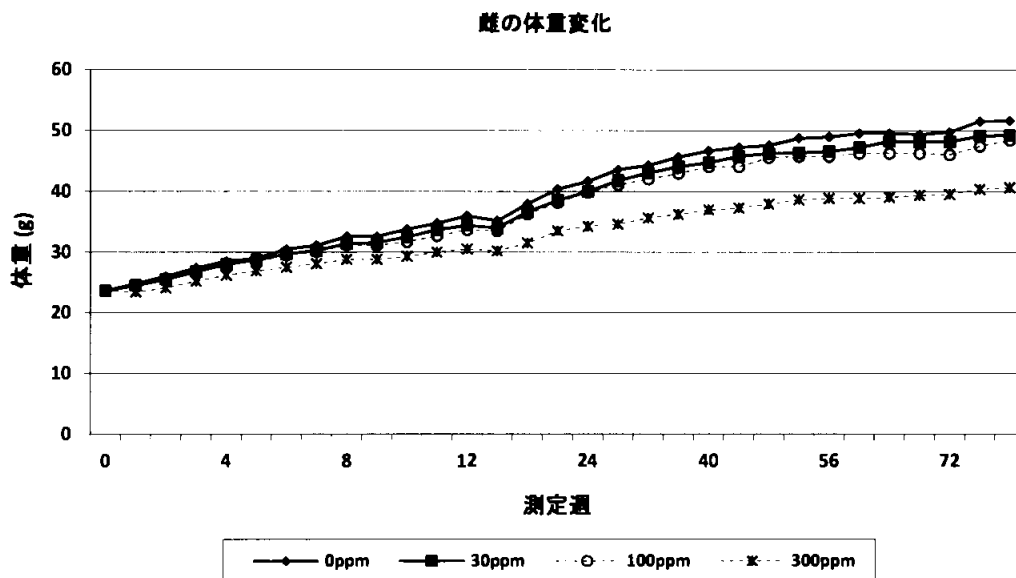
体重変化；

生存動物全例の体重を投与開始後 13 週時まで毎週 1 回、その後 16 週時から 76 週時までは 4 週に 1 回、及び 78 週時に 1 回測定した。

試験期間中の体重変化を下図に示す。



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。



対照群と比べ統計学的有意差の認められた体重変化を下表に示す。

測定週	投与量 (ppm)					
	雄			雌		
	30	100	300	30	100	300
1						
2						
3						
4						
5						
6-7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
16-64						
68						
72						
76						
78						

Dunnett または Sheffe の多重比較法 ↑ ↓ : P<0.05 ↑ ↓ : P<0.01

表中の数値は変動の日安として対照群を 100 とした場合の数を示す。なお、変動幅で示した週の数値は、その間の最小変動及び最大変動を示した。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

300 ppm 群では、雌雄とも平均体重が全投与期間を通じ対照群に比し統計学的に有意に低値で推移した。

100 ppm 群でも、雌雄とも平均体重が全投与期間を通じ対照群に比し低値で推移し、散発的に統計学的有意差が観察された。

30 ppm 群では雌雄とも検体投与による影響は認められなかった。

摂餌量及び食餌効率；

全動物の摂餌量を投与開始後 13 週時まで毎週 1 回、その後 16 週時から 76 週時までは 4 週に 1 回の頻度でケージごとに測定し、この値をケージごとの延べ動物数で除して 1 日 1 匹あたりの摂餌量（ケージ別平均摂餌量）を算出した。また、投与開始後 13 週時までの食餌効率も算出した。食餌効率は、平均体重増加量を平均摂餌量（ケージ別平均摂餌量の群平均値）で除して算出した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた摂餌量を下表に示す。

測定週	投与量 (ppm)					
	雄			雌		
	30	100	300	30	100	300
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
10						
11						
12						
16						
24						
32						

Dunnett または Sheffe の多重比較法 ↑ ↓ : P<0.05    ↑ ↓ : P<0.01  
 表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の数を示す。

300 ppm 投与群の雌雄で、対照群と比較し統計学的に有意に低い値が投与期間中散発的に観察された。投与期間中の平均値では、対照群に比し雄では 8.2 %、雌では 4.9 % 低値を示した。

100 ppm 群では雄が投与 1 週時のみ有意な減少を示したが、その後は対照群に比べ明らかな差はみられなかった。

30 ppm 群では、雌雄とも検体投与による影響はみられなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

また食餌効率でも 300 ppm 群の雌雄とも 13 週間の検査時期の大部分で対照群に比べ低値を示した。

100 及び 30 ppm 群では検体投与の影響は認められなかった。

検体摂取量；

投与期間中の平均検体摂取量は次の通りであった。

投与量 (ppm)		30	100	300
検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	2.970	10.43	31.89
	雌	2.966	10.04	33.81

血液学的検査；

投与後 52、78 週後に全生存動物を対象として尾端部切断により採取した血液を用いてメイグリュンワルド・ギムザ染色を施して血液塗抹標本を作製した。また、投与期間中の切迫殺動物についても可能な限り血液塗抹標本を作製した。これらの標本のうち対照群と最高用量群の全ての血液塗抹標本について鏡検し白血球百分率を算定した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

検査項目	測定 時期 (週)	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		0	30	100	300	0	30	100	300
好中球桿状核 (相対値%)	52								
	78								

Mann-Witney の  $\chi$  検定  $\uparrow \downarrow$  :  $P < 0.05$   $\uparrow \downarrow$  :  $P < 0.01$

表中の数値は実測値を示す。

— : 検査しなかった。

血液学的検査において検体投与の影響は認められなかった。

300 ppm 群の雄の 78 週時及び雌の 52 週時に好中球桿状核の割合が有意に減少したが、両者とも非常に軽度な変化であり、さらに雌雄とも分葉核球の割合はいずれの検査時期にも異常は観察されなかったことから、本変化は検体投与に関係のない偶発性所見と判断された。

臓器重量；

78 週間投与終了後に、各群雌雄各 10 匹を対象として最終体重及び以下の臓器重量（絶対重量）を測定し、最終体重に対する対体重比（相対重量）も算出した。

脳、肝臓、腎臓（両側）、副腎（両側）、脾臓、精巣（両側）、卵巣（両側）

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

検査項目	投与量 (ppm)					
	雄			雌		
	30	100	300	30	100	300
最終体重						
精巢	相対					
脳	相対					
腎臓	相対					
副腎	相対					

Dunnett または Sheffe の多重比較法 ↑↓ : P<0.05 ↑↓ : P<0.01

表中の数値は変動の日安として対照群を 100 とした場合の数を示す。

( ) 内の数値は、統計学的有意差は認められなかったが、参考値として記載した

300 ppm 群において雄の精巢の相対重量及び雌の脳、腎臓及び副腎の相対重量が統計学的に有意に増加した。しかし、どの臓器も絶対重量には異常はなく、病理組織学的検査ではこれらの臓器において検体投与に起因する変化は認められなかったことから、同変化は有意な体重増加抑制に伴う二次的变化であると判断された。

30 及び 100 ppm 群では対照群との間に有意差は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

肉眼的病理検査；

途中死亡、切迫殺動物及び78週投与終了時の全生存動物について剖検を行った。

対照群と比べ統計学的有意差が認められた剖検所見を次表に示す。

検査 時期	性別		雄				雌				
	投与群 (ppm)		0	30	100	300	0	30	100	300	
死亡 ・ 切迫 殺	臓器	所見\検査動物数									
	全身	触毛脱毛									
		腹部のよごれ									
		外陰部のよごれ									
	胸腺	腫大									
	脾臓	腫大									
	肺	腫瘤									
	肝臓	腫瘤									
	腎臓	嚢胞									
	精囊	拡張									
	凝固腺	拡張									
	子宮	腔水症									
	皮膚	脱毛									
痂皮											
最終 屠殺	臓器	所見\検査動物数									
	全身	触毛脱毛									
		腹部のよごれ									
		外陰部のよごれ									
	胸腺	腫大									
	脾臓	腫大									
	肺	腫瘤									
	肝臓	腫瘤									
	腎臓	嚢胞									
	精囊	拡張									
	凝固腺	拡張									
	子宮	腔水症									
	皮膚	脱毛									
痂皮											

Fisherの直接確率計算法 ↑↓: P<0.05 ↑↓: P<0.01



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	30	100	300	0	30	100	300
全 動 物	臓器	所見\検査動物数								
	全身	触毛脱毛								
		腹部のよごれ								
		外陰部のよごれ								
	胸腺	腫大								
	脾臓	腫大								
	肺	腫瘤								
	肝臓	腫瘤								
	腎臓	嚢胞								
	精囊	拡張								
	凝固腺	拡張								
	子宮	腔水症								
	皮膚	脱毛								
		痂皮								

Fisher の直接確率計算法    ↑ ↓ : P<0.05    ↑ ↓ : P<0.01

300 ppm 群では、雄の腎臓嚢胞の総発生頻度が有意に増加したが、組織学的検査において特に異常がみられなかったことから偶発性変化と考えられた。

300 及び 100 ppm 群の雄で最終屠殺時に皮膚の脱毛が有意に増加したが、総発生頻度では有意差はみられず、病理組織学的検査においても特に異常はみられなかったことから、偶発性変化であると考えられた。

その他の統計学的に有意な所見は、いずれも毒性学的に意義のない発生頻度の減少あるいは投与用量と無関係に発現しており、偶発性変化であると判断された。

#### 病理組織学的検査；

肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、以下の組織について常法に従って病理標本を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色し、検鏡した。

脳 (3カ所)、脊髄 (頸部、胸部、腰部)、末梢神経 (坐骨神経)、下垂体、胸腺 (または胸腺部分)、甲状腺 (上皮小体を含む、両側)、副腎 (両側)、脾臓 (2カ所)、骨・骨髄 (胸骨、大腿骨、椎骨)、リンパ節 (頸部、腸間膜)、心臓 (2カ所)、大動脈 (胸部)、唾液腺、食道、胃 (前胃、腺胃)、肝臓 (2カ所)、胆のう、膵臓、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、気管、肺、腎臓 (両側)、膀胱、精巣 (両側)、精巣上体 (両側)、前立腺、精のう及び凝固腺、卵巣 (両側)、子宮 (角部、頸部)、眼球及びハーダー腺 (両側)、骨格筋 (下腿三頭筋)、皮膚、乳腺 (原則として腹部、雌のみ)、肉眼的異常部位 (正常組織との境界部を含む)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

#### 非腫瘍性病変

認められた主な非腫瘍性病変（対照群と比べ統計学的に有意差のあった病変）を本文末の表 1-1～表 1-2 に示す。

300 ppm 群の雌雄及び 100 ppm 群の雌で前胃の粘膜上皮過形成及び粘膜角化亢進が観察された。さらに 300 ppm 群の雌雄で膀胱の粘膜上皮過形成及び粘膜上皮空胞化が観察され、これらは検体投与による変化であると考えられた。

その他の変化は自然発生性の病変としてマウスにしばしば観察される変化であり、検体投与と関連性のない偶発性変化と判断された。

#### 腫瘍性病変

認められた全ての腫瘍性病変を表 2-1～表 2-5 に示す。

統計学的有意差の認められた腫瘍性病変の発生頻度はいずれも減少を示しており、毒性上問題ではない変化と考えられた。有意差を示した腫瘍性病変以外にも種々の腫瘍性病変が各検体投与群で観察されたが、本試験において観察された腫瘍性病変はいずれも本系統マウスに背景的に認められる自然発生性病変であり、検体投与に起因すると考えられる特異的腫瘍性病変の発生はなく、各腫瘍の発生時期にも対照群との間に差はみられなかった。

以上の結果から、本剤のマウスに対する 78 週間飼料混入投与による発がん性試験における影響として、300 ppm 群の雌雄に体重、摂餌量、食餌効率の減少がみられ、病理組織学的検査において前胃の粘膜上皮過形成及び粘膜角化亢進ならびに膀胱の粘膜上皮過形成及び粘膜上皮空胞化がみられた。100 ppm 群でも全投与期間を通じて体重増加抑制傾向が雌雄にみられ、雌では前胃の粘膜上皮過形成及び粘膜角化亢進もみられた。30 ppm 群では投与の影響はみられなかった。

従って、無毒性量は雌雄とも 30 ppm（雄 2.970 mg/kg/day、雌 2.966 mg/kg/day）と判断される。また、いずれの用量においても腫瘍の発生率の増加はみられなかったことから催腫瘍性はないものと判断される。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 1-1 主な非腫瘍性病変

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	30	100	300	0	30	100	300
死亡 ・ 切迫 殺	臓器	所見\検査動物数								
	前胃	粘膜上皮過形成								
		粘膜角化亢進								
	肝臓	巣状肝細胞壊死								
腎臓	尿細管萎縮									
	腎盂拡張									
最終 屠殺	臓器	所見\検査動物数								
	前胃	粘膜上皮過形成								
		粘膜角化亢進								
	肝臓	肝細胞小増殖巣 (好酸性細胞型)								
		小葉中心性肝細胞脂肪化								
		肝細胞小増殖巣 (明細胞型)								
	脾臓	島細胞過形成								
	膀胱	粘膜上皮過形成								
		粘膜上皮空胞化								
	腎臓	初期慢性糸球体腎炎								
		尿円柱								
	精のう	分泌物うっ滞								
凝固腺	神経鞘腫									
胸腺	リンパ球系細胞過形成									
肺臓	単核細胞浸潤									
	好酸性結晶物									
脊髄/腰部	神経線維変性									

Fisher の直接確率計算法 ↑ ↓ : P<0.05 ↑ ↓ : P<0.01

— : 該当病変なし

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 1-2 主な非腫瘍性病変

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	30	100	300	0	30	100	300
全 動 物	臓器	所見\検査動物数								
	顎下腺	腺上皮萎縮								
	前胃	粘膜上皮過形成								
		粘膜角化亢進								
	肝臓	びまん性肝細胞脂肪化								
	膵臓	島細胞過形成								
	腎臓	尿出柱								
		腎盂拡張								
	膀胱	粘膜上皮過形成								
		粘膜上皮空胞化								
	肺臓	単細胞浸潤								
	精のう	分泌物うっ滞								
凝固腺	分泌物うっ滞									
甲状腺	のう胞									
副腎	腹膜下細胞増生									

Fisher の直接確率計算法    ↑ ↓ : P<0.05    ↑ ↓ : P<0.01

— : 該当病変なし

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 2-1 腫瘍性病変

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	30	100	300	0	30	100	300
死亡 ・ 切迫 殺	臓器	所見\検査動物数								
	全身	全身性組織球肉腫 (M)								
	全身	骨髓性白血病 (M)								
		悪性リンパ腫 (M)								
	脾臓	血管肉腫 (M)								
	肺臓	腺腫 (B)								
		腺肉腫 (M)								
	大腸	腺肉腫 (M)								
		骨肉腫 (M)								
	肝臓	肝細胞腺腫 (B)								
		血管腫 (B)								
		肝細胞癌 (M)								
		血管肉腫 (M)								
	胆のう	組織球肉腫 (M)								
		乳頭腫 (B)								
	精巣	血管腫 (B)								
	卵巣	奇形腫 (M)								
	子宮角	骨肉腫 (M)								
	膣	血管肉腫 (M)								
	副腎	皮質腺腫 (B)								
	甲状腺	濾胞状腺腫 (B)								
	骨/大腿	血管肉腫 (M)								
	ハーダー腺	腺腫 (B)								
	皮膚	神経鞘腫 (B)								
		線維肉腫 (M)								
		組織球肉腫 (M)								
		血管肉腫 (M)								
乳腺	腺腫 (B)									
	腺癌 (M)									
胸腔	悪性中皮腫 (M)									

Fisherの直接確率計算法 ↑↓ : P<0.05 ↑↓ : P<0.01

(B) : 良性腫瘍、(M) : 悪性腫瘍

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 2-2 腫瘍性病変

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	30	100	300	0	30	100	300
最終 屠殺	臓器	所見\検査動物数								
	全身	悪性リンパ腫 (M)								
	リンパ節	血管肉腫 (M)								
	脾臓	血管腫 (B)								
		血管肉腫 (M)								
		組織球肉腫 (M)								
	肺臓	腺腫 (B)								
		腺癌 (M)								
	大腸	平滑筋腫 (B)								
		平滑筋肉腫 (M)								
	肝臓	肝細胞腺腫 (B)								
		血管腫 (B)								
		肝細胞癌 (M)								
	胆のう	乳頭腫 (B)								
	腎臓	移行細胞癌 (M)								
		乳頭腫 (B)								
		移行細胞癌 (M)								
	膀胱	平滑筋腫 (B)								
		移行細胞癌 (M)								
		移行細胞癌 (M)								
精巣	間質細胞腫瘍 (B)									
	血管肉腫 (M)									
精巣上体	神経鞘腫 (B)									
卵巣	顆粒膜細胞腫 (B)									
ハーダー腺	顆粒膜莢膜細胞腫 (B)									
子宮角	子宮内膜間質型 ポリープ (B)									
	血管腫 (B)									
	血管肉腫 (M)									
		平滑筋肉腫 (M)								

Fisher の直接確率計算法 ↑ ↓ : P<0.05 ↑ ↓ : P<0.01

(B) : 良性腫瘍、(M) : 悪性腫瘍

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 2-3 腫瘍性病変

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	30	100	300	0	30	100	300
最終 屠殺	臓器	所見\検査動物数								
	甲状腺	乳頭腺腫 (B)								
		C細胞腺腫 (B)								
	下垂体	前葉腺腫 (B)								
	副腎	皮質腺腫 (B)								
		褐色細胞腫 (B)								
		皮質腺癌 (M)								
	ハーダー腺	腺腫 (B)								
	皮膚	乳頭腫 (B)								
		神経鞘腫 (B)								
		角質棘細胞腫 (B)								
		骨腫 (B)								
		線維肉腫 (M)								
乳腺	横紋筋肉腫 (M)									
	腺癌 (M)									
全 動 物	臓器	所見\検査動物数								
	全身	全身性組織球肉腫 (M)								
		骨髄性白血病 (M)								
		悪性リンパ腫 (M)								
	リンパ節	血管肉腫 (M)								
	脾臓	血管腫 (B)								
		血管肉腫 (M)								
		組織球肉腫 (M)								
	肺	腺腫 (B)								
		腺癌 (M)								
	大腸	平滑筋腫 (B)								
		腺癌 (M)								
		平滑筋肉腫 (M)								
骨肉腫 (M)										

Fisher の直接確率計算法 ↑ ↓ : P<0.05 ↑ ↓ : P<0.01

(B) : 良性腫瘍、(M) : 悪性腫瘍

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 2-4 腫瘍性病変

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	30	100	300	0	30	100	300
全 動 物	臓器	所見\検査動物数								
	肝臓	肝細胞腺腫 (B)								
		血管腫 (B)								
		肝細胞癌 (M)								
		血管肉腫 (M)								
		組織球肉腫 (M)								
	胆のう	乳頭腫 (B)								
	腎臓	移行細胞癌 (M)								
	膀胱	乳頭腫 (B)								
		平滑筋腫 (B)								
		移行細胞癌 (M)								
	精巣	間質細胞腫瘍 (B)								
		血管腫 (B)								
		血管肉腫 (M)								
	精巣上体	神経鞘腫 (B)								
	卵巢	顆粒膜細胞腫 (B)								
		顆粒膜莢膜細胞腫 (B)								
		奇形腫 (M)								
	子宮角	子宮内膜間質型 ポリープ (B)								
		血管腫 (B)								
		血管肉腫 (M)								
		平滑筋肉腫 (M)								
	膣	骨肉腫 (M)								
		血管肉腫 (M)								
	甲状腺	乳頭腺腫 (B)								
		C細胞腺腫 (B)								
		濾胞状腺腫 (B)								
	下垂体	前葉腺腫 (B)								

Fisher の直接確率計算法 ↑ ↓ : P<0.05 ↑ ↓ : P<0.01

(B) : 良性腫瘍、(M) : 悪性腫瘍



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 2-5 腫瘍性病変

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	30	100	300	0	30	100	300
全 動 物	臓器	所見\検査動物数								
	副腎	皮質腺腫 (B)								
		褐色細胞腫 (B)								
		皮質腺瘤 (M)								
	骨/大腿	血管肉腫 (M)								
	ハーダー腺	腺腫 (B)								
	皮膚	乳頭腫 (B)								
		角質棘細胞腫 (B)								
		骨腫 (B)								
		神経鞘腫 (B)								
		線維肉腫 (M)								
		血管肉腫 (M)								
		横紋筋肉腫 (M)								
	乳腺	腺腫 (B)								
腺癌 (M)										
胸腔	悪性中皮腫 (M)									
合計	検査動物数									
	腫瘍数	良性								
		悪性								
	腫瘍総数									
	担腫瘍動物数	良性								
悪性										
担腫瘍動物総数										

Fisherの直接確率計算法 ↑↓ : P<0.05    ↑↓ : P<0.01

(B) : 良性腫瘍、(M) : 悪性腫瘍