

4. 亜急性毒性

(資料 4-1)

ラットを用いた混餌投与による 90 日間反復経口投与毒性試験(含 4 週間回復試験)

試験機関: ハンティンドン ライフ サイエンス社
英国 [GLP 対応]
報告書作成年: 1998 年

検体の純度:

試験動物 : SD 系ラット、開始時 35~42 日齢、主群一群雌雄各 10 匹、回復群一群雌雄各 5 匹
体重; 雄 134-177 g 雌 121-159 g

試験期間 : 投与期間 13 週間(1996 年 12 月 31 日~1997 年 4 月 1 日)
回復期間 4 週間(1997 年 4 月 1 日~1997 年 4 月 29 日)

投与方法 : 検体を 0、50、100、10000 及び 20000 ppm の濃度で飼料に混入し、13 週間にわたりて隨時摂食させた。検体を混入した飼料は毎週調製した。

投与量設定根拠:

試験項目及び結果:

一般状態及び死亡率; 一般状態及び死亡率を毎日観察し、触診を含む詳細な観察を毎週実施した。

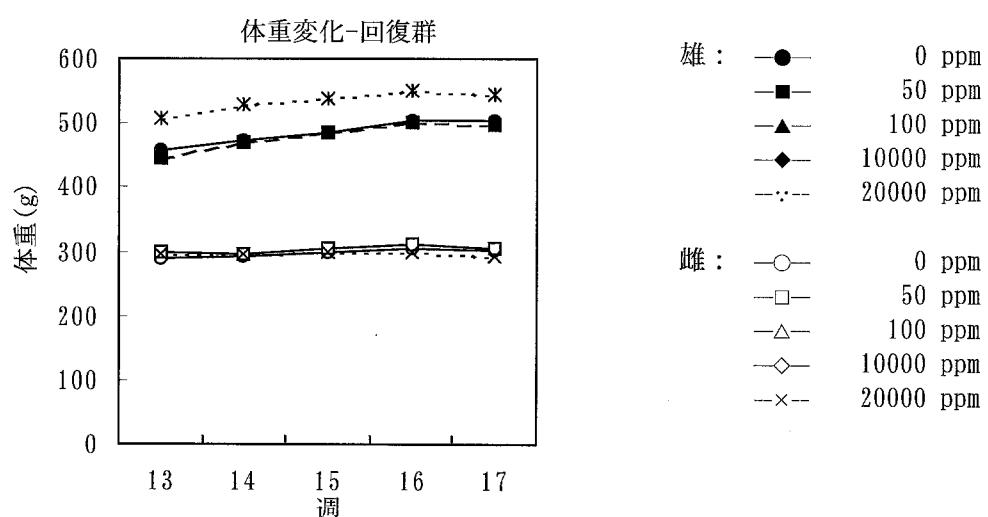
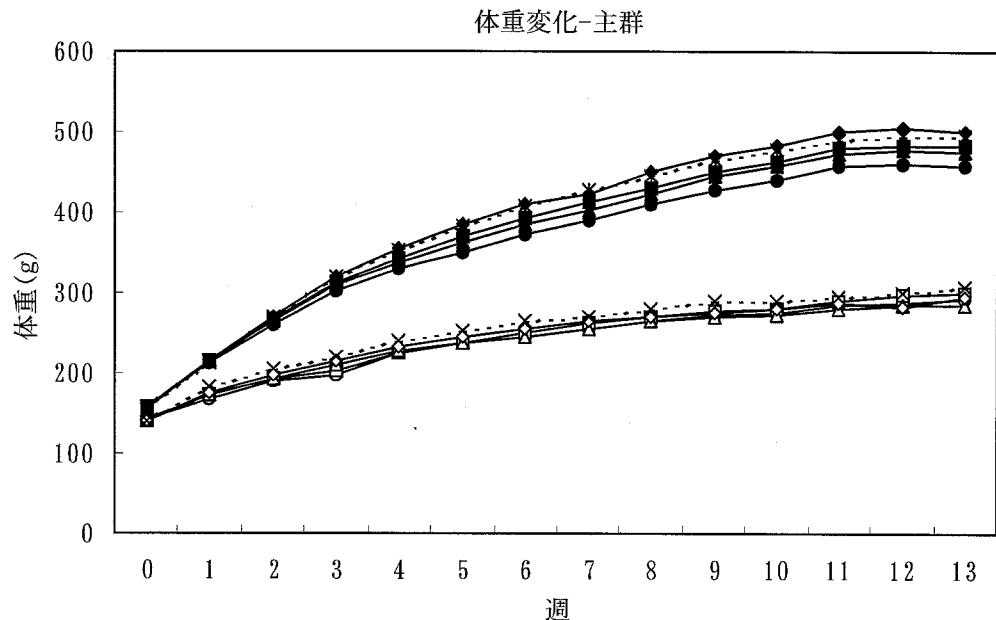
検体投与に関連する一般状態の異常及び死亡は認められなかった。

試験終了時の死亡数を下表に示す。

性別	雄					雌				
	0	50	100	10000	20000	0	50	100	10000	20000
死亡数(主群)	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
死亡数(回復群)	0/5	0/5			0/5	0/5	0/5			0/5

体重変化; 投与期間中全動物の体重を週 1 回測定した。

体重変化を次図に示す。



体重変化にはいずれの週においても有意差は認められなかった。体重増加量は、雄の 10000 及び 20000 ppm 群においてほぼ全試験期間を通して対照群と比較して有意に高く、雌においては 100 ppm の第 3 週、10000 ppm の第 1~3 週及び 20000 ppm のほぼ全期間で対照群と比較して有意に高かった。回復群では 20000 ppm 群の雌において対照群と比較して有意に減少した。これらの変化は検体投与による影響と判断した。

摂餌量及び食餌効率； 全動物の摂餌量を毎週測定し、食餌効率も算出した。

摂餌量は、投与期間、回復期間を通して対照群と同程度であった。

食餌効率は、10000 及び 20000 ppm 群の雌において統計学的に有意でないものの投与期間を通して対照群と比較して高く推移した。50 及び 100 ppm 群の雌ならびに雄

の食餌効率は対照群と同程度であった。

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)	50	100	10000	20000
検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	8.3	818.5	1666.9
	雌	4.7	8.9	871.0

尿検査； 投与 12 週時に全動物から採取した尿について以下の項目を検査した。

外観、尿量、pH、尿比重、蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、ビリルビン、潜血

20000 ppm 群の雌において尿量が統計学的に有意に増加したもの、検体投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

血液学的検査； 投与 13 週時及び回復期間 4 週時に全生存動物を対象として、後眼窩静脈から血液を採取し、以下の項目の測定を行った。供試動物は採血前に一晩絶食した。

ヘマトクリット値、血色素量、赤血球数、白血球数、血小板数、平均赤血球血色素濃度(MCHC)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球容積(MCV)、プロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(PTT)、白血球百分率、メトヘモグロビン(METHB)、スルフヘモグロビン、網赤血球数

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

項目	検査週	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		50	100	10000	20000	50	100	10000	20000
ヘマトクリット値	13						\downarrow 93	\downarrow 93	\downarrow 93
	R4	\uparrow 107							
血色素量	13			\downarrow 95	\downarrow 95		\downarrow 94	\downarrow 91	\downarrow 90
	R4	\uparrow 106							
赤血球数	13			\downarrow 93	\downarrow 95	\downarrow 96	\downarrow 92	\downarrow 85	\downarrow 85
MCH	13							\uparrow 106	\uparrow 106
MCHC	13			\downarrow 98	\downarrow 98			\downarrow 98	\downarrow 97
MCV	13			\uparrow 104				\uparrow 108	\uparrow 109
	R4					\uparrow 109			
好中球	13			\downarrow 63					
単球	13						\downarrow 67	\downarrow 67	
大型不染性細胞	13				\uparrow 100				
血小板	13								\uparrow 114
PT	13	\uparrow 105			\uparrow 104	\uparrow 104	\uparrow 108	\uparrow 104	\uparrow 104
メトヘモグロビン	13			\uparrow 193	\uparrow 198	\uparrow 127		\uparrow 298	\uparrow 345
	R4				\uparrow 129				\uparrow 149
網赤血球数	13			\uparrow 275	\uparrow 275			\uparrow 221	\uparrow 271

Wilcoxon の順位和検定あるいは Dunnett 法により統計解析を実施

$\uparrow\downarrow$: $P < 0.05$ $\uparrow\downarrow$: $p < 0.01$ $\uparrow\downarrow$: $P < 0.001$

表中の数値は変動の目安として群平均値の対照群に対する変動率(%)を表したもの

R4 : 回復期間 4 週

投与 13 週時における血液学的検査の結果、100 ppm 群の雌、10000 及び 20000 ppm 群の雌雄において血色素量及び赤血球数が対照群に比して有意に低下した。10000 及び 20000 ppm 群の雌雄において平均赤血球血色素濃度の低値、平均赤血球容積の高値、メトヘモグロビン濃度の高値が認められた。100 ppm 以上の投与群の雌においてヘマトクリット値が有意に低下した。さらに 10000 及び 20000 ppm 群の雌雄において網赤血球数が増加し、20000 ppm 群の雌において血小板値がわずかに増加した。平均赤血球血色素量が 10000 ppm 以上の投与群の雌においてわずかに高かった。これらは検体投与の影響と考えられた。50 ppm 群の雌において認められた赤血球数の低下はわずかなものであることから偶発的なものと考えられた。スルフヘモグロビン検査では異常は認められず、骨髓塗沫の骨髓白血球系/赤血球系細胞比に検体投与の影響は認められなかった。回復期間 4 週時では 20000 ppm 群の雌雄においてメトヘモグロビン濃度が対照群に比してまだ高かったが、その差は投与 13 週時にみられた差より小さかった。その他検体投与に関連すると思われる変化はすべて回復した。その他対照群と比して統計学的に有意差が認められた項目がいくつかあったが、その差はわずかであり通常の生物学的変動に起因するものと考えられた。

骨髓白血球系/赤血球系細胞比； 主群の 0、100、10000、20000 ppm 群及び回復群の 0、20000 ppm 群の全動物を対象にしてそれぞれ剖検時に大腿骨骨髓塗沫標本を作製し骨髓白血球系/赤血球系細胞比について観察した。

骨髓白血球系/赤血球系細胞比に検体投与の影響は認められなかった。

血液生化学的検査； 血液学的検査で使用した血液から得られた血清を用い、以下の項目の測定を行った。

アルカリホスファターゼ(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ペプチダーゼ(GGT)、血糖、総ビリルビン、総コレステロール、クレアチニン、尿素、総蛋白、アルブミン、アルブミン/グロブリン比(A/G 比)、ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン

統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

項目 検 査 週		投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		50	100	10000	20000	50	100	10000	20000
ALP	13					↑117			
総ビリルビン	13	↑300	↑300	↑300	↑200				↑133
血糖	13	↑125	↑134	↑136		↑112	↑122	↑116	
尿素	13						↓ 82	↓ 80	
総コレステロール	13								↑113
アルブミン	13			↑103	↑103				
ナトリウム	13	↑101		↑101	↑101	↑101	↑102	↑102	↑101
カリウム	13		↓ 86						
塩素	13						↑103	↑102	
カルシウム	13	↓ 95		↓ 96					
無機リン	13					↓ 90	↓ 85	↓ 86	

Wilcoxon の順位和検定あるいは Dunnett 法により統計解析を実施

↑↓ : P<0.05 ↑↓: p<0.01 ↑↓ : P<0.001

表中の数値は変動の目安として群平均値の対照群に対する変動率(%)を表したもの

雄の全投与群ならびに雌の 10000 及び 20000 ppm 群(10000 ppm 群は有意差なし)においてビリルビン濃度が有意に高くなったが、雄においては対照群の値(1 μmol/l)に対して背景データは 2 μmol/l が低かったことに起因し、雌においては変動がわずかであることから、毒性学的意義はないものと考えられた。20000 ppm 群の雌においてコレステロール値が有意に高かったが、この変動はわずかであり、片性のみで発生していることから毒性学的意義はないものと考えられた。

その他、いくつかの項目において対照群に比し統計学的に有意差の認められたものがあった。しかしながらこれらの変動は片性だけで発生したか、最高用量群ではみられなかったか、変動がわずかであるかであり、検体投与に起因するものではないと考えられた。

臓器重量； 投与期間終了時に主群の全生存動物を対象として、また回復期間終了時に回復群の全生存動物を対象として以下の臓器重量を測定(絶対重量)し、対体重比も算出した。

副腎(両側)、脳、精巣上体(両側)、心臓、腎臓(両側)、肝臓、卵巢(両側)、脾臓、精巣(両側)、胸腺、甲状腺及び上皮小体、子宮及び子宮頸部

統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

項目	検査週	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		50	100	10000	20000	50	100	10000	20000
脳	絶対重量	13							
	対体重比	13							↓ 92
精巣上体	対体重比	13			↓ 90				
腎臓	絶対重量	13		↑116					
	対体重比	13		↑111					
脾臓	絶対重量	13				↑121			↑131 ↑141
	対体重比	13						↑133	↑134
	R4								↑119
肝臓	対体重比	R4	↓ 79			↓ 86			
子宮及び	絶対重量	13					↓ 75		
子宮頸部	対体重比	13					↓ 79		

Behrens-Fisher 検定あるいは Dunnett 法により統計解析を実施

↑↓ : P<0.05 ↑↓: p<0.01 ↑↓ : P<0.001

表中の数値は変動の目安として群平均値の対照群に対する変動率(%)を表したもの

R4：回復期間 4 週

投与 13 週後の臓器重量測定では 20000 ppm 群の雄、10000 及び 20000 ppm 群の雌において脾臓の絶対重量が対照群に比し有意に増加した。10000 及び 20000 ppm 群の雌においては脾臓の対体重比も対照群に比して有意に増加した。回復期間 4 週間後では 20000 ppm 群の雌において脾臓の絶対重量がまだわずかに高かったものの対照群との差はわずかであり、投与期間終了時の測定値より低かったことから回復が示唆された。雄では完全な回復が認められた。

その他、臓器重量のわずかな変動がいくつかみられたが、これらの変動は単発的で

片性のみで認められた。これらの変動は群間の体重差に関連したもので検体投与の影響ではないと考えられた。

肉眼的病理検査； すべての動物について剖検した。

対照群と比較して統計学的に有意差の認められた肉眼病理学的所見はなく、観察された所見はいずれも散発的であり、検体投与によるものとは考えられない。

病理組織学的検査； 肉眼的病理検査を実施した対照群及び最高用量群の主群の全動物ならびに試験途中に死亡した動物を対象として、以下の組織について病理標本を作製し、検鏡した。

副腎(両側)、大動脈(頸部)、脳、盲腸、結腸、十二指腸、精巣上体(両側)、眼(両側)、大腿骨、心臓、回腸、空腸、腎臓(両側)、外涙腺(両側)、肝臓、肺及び主要気管支、リンパ節(下顎及び腸間膜)、乳腺(尾側部)、食道、卵巣(両側)、脾臓、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺(顎下腺、両側)、坐骨神経(左側)、精のう、骨格筋(大腿部、左側)、皮膚、脊髄、脾臓、胸骨、胃、精巣(両側)、胸腺、甲状腺及び上皮小体、気管、膀胱、子宮及び子宮頸部、肉眼的異常部位

また、50、100 及び 10000 ppm 群の主群の全動物を対象として、腎臓、肝臓、肺、脾臓及び肉眼的異常部位について、また、回復群においては、肝臓、脾臓及び肉眼的異常部位について病理標本を作製し、検鏡した。

認められた主要な所見を次表に示す。

対照群と比較して、統計学的に有意差が認められた項目を次表に示す。

性別	投与量(ppm)	雄					雌				
		0	50	100	10000	20000	0	50	100	10000	20000
主群	臓器	所見/検査例数	10	10	9	10	10	10	10	10	10
	肝臓	クッパー細胞の色素沈着	0	0	0	0	0	0	0	↑ 5	↑ 8
		髓外造血亢進	1	3	1	2	0	4	2	3	4
	脾臓	髓外造血亢進	4	8	7	↑10	↑10	4	7	9	↑10
		ヘモジデリン沈着の増加	1	2	2	↑ 9	↑ 9	0	↑5	↑ 8	↑10
	臓器	所見/検査例数	5	0	0	0	5	5	0	0	5
回復群	肝臓	クッパー細胞の色素沈着	0	-	-	-	0	0	-	-	1
		髓外造血亢進	0	-	-	-	0	0	-	-	0
	脾臓	髓外造血亢進	0	-	-	-	0	0	-	-	0
		ヘモジデリン沈着の増加	0	-	-	-	1	0	-	-	↑ 5

Fisher の直接確率法により統計解析を実施 ↑↓ : P<0.05 ↑↓↓ : P<0.01 ↑↓↓↓ : P<0.001

投与 13 週間後、肝臓と脾臓に検体投与に起因すると考えられる病理組織学的所見が観察された。10000 及び 20000 ppm 群の雌において肝臓の髓外造血亢進及びクッパー細胞の色素沈着が観察された。4 週間の回復期間後これらの所見は回復したと考え

られる。10000 及び 20000 ppm 群の雌雄において脾臓の髄外造血亢進が有意に高頻度で観察された。50 及び 100 ppm 群においても統計学的な有意差はなかったものの、同様の変化が認められた。ヘモジデリン沈着の増加が 13 週間投与後の 10000 及び 20000 ppm 群の雄ならびに全投与群の雌において認められた。4 週間の回復期間後に髄外造血亢進は観察されなかつたが、20000 ppm 群の雄 1 例及び雌全例にヘモジデリン沈着の増加が認められた。

以上のとおり、本検体のラットに対する 13 週間混餌投与における影響として、雄では 10000 ppm 以上、雌では主に 100 ppm 以上の投与群で赤血球の変化がみられ、肝臓や脾臓に二次的な変化をもたらした。50 ppm 群(雄: 4.2 mg/kg/日、雌: 4.7 mg/kg/日相当)においてもわずかな所見が認められ、本試験における無毒性量(NOAEL)は 50 ppm 未満であると考えられた。

(資料 4-2)

マウスを用いた混餌投与による 90 日間反復経口投与毒性試験(含 8 週間回復試験)

試験機関: ハンティンドン ライフ サイエンス社
英国 [GLP 対応]
報告書作成年: 1998 年

検体の純度:

試験動物 : ICR 系マウス、開始時 33~40 日齢、主群一群雌雄各 12 匹、回復群一群雌雄各 6 匹
体重; 雄 25.8~35.7 g 雌 21.3~28.8 g

試験期間 : 投与期間 13 週間(1997 年 2 月 3 日~1997 年 5 月 5 日)
回復期間 8 週間(1997 年 4 月 5 日~1997 年 7 月 1 日)

投与方法 : 検体を 0、30、100、1000 及び 10000 ppm の濃度で飼料に混入し、13 週間にわたって隨時摂食させた。回復群は対照群、30 及び 10000 ppm 群に設定し、期間は 8 週間とした。検体を混入した飼料は 2 週間間隔で調製した。

投与量設定根拠:

試験項目及び結果:

一般状態及び死亡率; 一般状態及び死亡率を毎日観察し、触診を含むより詳細な観察を毎週実施した。

統計学的に有意差の認められた所見を下表に示す。

性別 所見	雄					雌				
	0	30	100	1000	10000	0	30	100	1000	10000
(評価数)	(18)	(18)	(12)	(12)	(18)	(18)	(18)	(12)	(12)	(18)
立毛	1	1	1	1	↑ 9	0	1	0	0	0
被毛粗剛	2	1	3	5	↑ 9	0	0	0	0	0

Fisher の直接確率計算法で統計解析を実施 ↑: P<0.05 ↑: p<0.01 (申請者実施)

10000 ppm 群の雄において立毛及び被毛粗剛が対照群と比べて統計学的に有意に増加した。

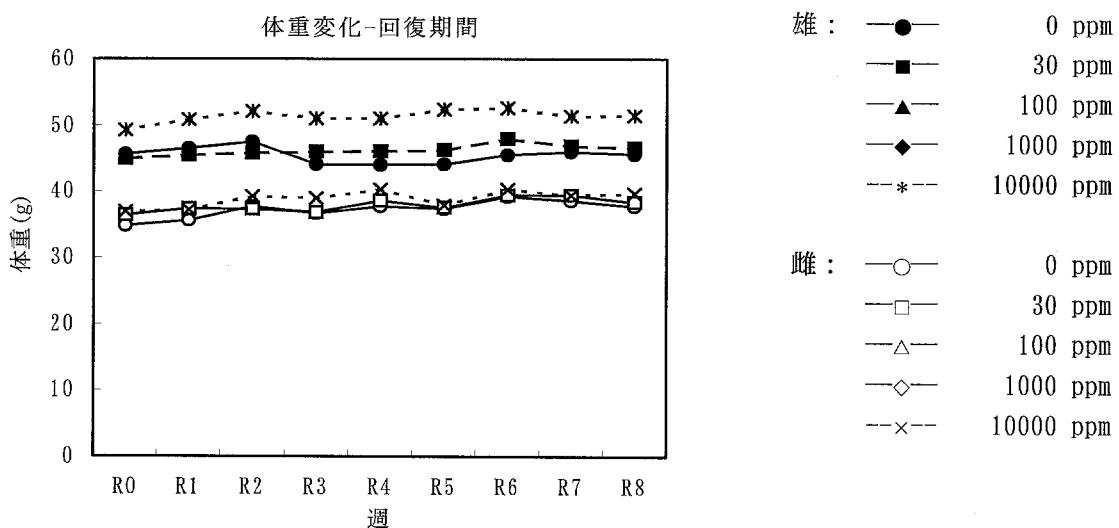
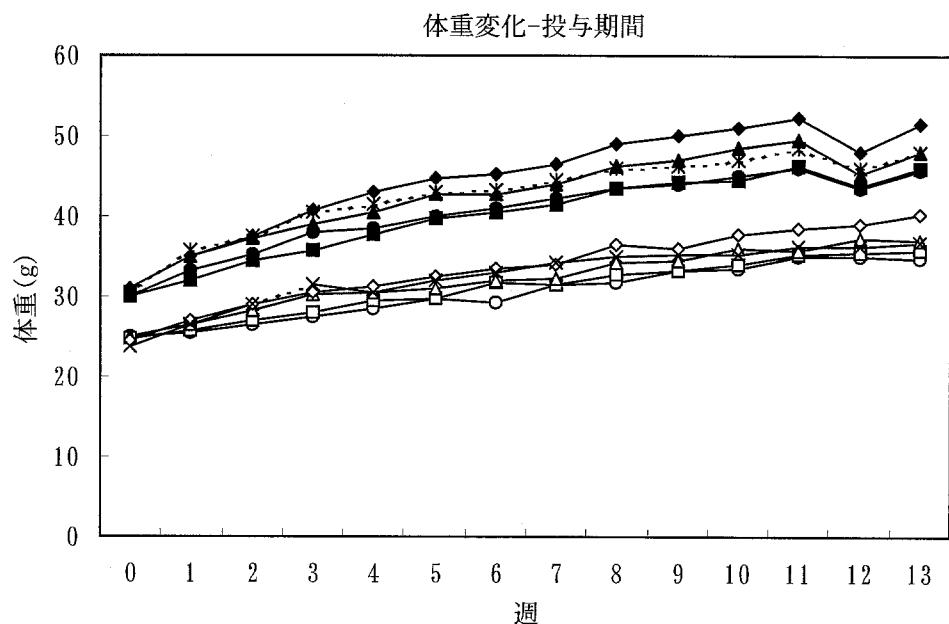
試験終了時の死亡率を下表に示す。

性別 投与量(ppm)	雄					雌				
	0	30	100	1000	10000	0	30	100	1000	10000
死亡数	0/18	1/18	0/12	0/12	0/18	0/18	0/18	0/12	0/12	1/18

検体による死亡は認められなかった。

体重変化； 投与期間中全動物の体重を週1回測定した。

体重変化を次図に示す。



体重増加量は 1000 及び 10000 ppm 群の雄及び全投与群の雌において投与期間を通して対照群と比較して高く推移した。雌雄とも 1000 ppm 群の体重が一番増加した。回復期間においても 30 及び 1000 ppm 群の雄において対照群と比べて高い体重増加量を示したが、雌では対照群より低い体重増加を示した。

摂餌量及び食餌効率； 全動物の摂餌量を毎週測定し、食餌効率も算出した。

摂餌量に投与による影響は認められなかった。

投与群の雌雄における食餌効率は対照群と比較してわずかに高かった。

検体摂取量； 投与期間中の平均検体摂取量は以下の通りであった。

投与量(ppm)		30	100	1000	10000
検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	4.2	12.8	135.9	1391.9
	雌	4.7	15.2	135.6	1493.1

眼科学的検査； 投与 12 週時に対照群及び 10000 ppm 群の全動物について眼科学的検査を実施した。

投与に起因するような変化は認められなかった。

尿検査； 投与 12 週時に全動物から採取した尿について以下の項目を検査した。

外観、尿量、pH、尿比重、蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、ビリルビン、潜血

検体投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

血液学的検査； 投与 13 週時、回復期間 4 週及び 8 週時に全生存動物を対象として、後眼窓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、白血球数、血小板数、平均赤血球血色素濃度(MCHC)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球容積(MCV)、メトヘモグロビン(METHB)、スルフヘモグロビン、網赤血球数、白血球百分率、網赤血球数

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

項目 検 査 週		投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		30	100	1000	10000	30	100	1000	10000
ヘマトクリット値	13			↓ 95	↓ 95		↓ 93	↓ 95	↓ 90
	R4								↓ 93
血色素量	13								↓ 96
	R4								↓ 92
	R8					↓ 94			
赤血球数	13			↓ 94	↓ 94		↓ 92		↓ 89
	R4								↓ 90
MCH	13				↑ 105				↑ 108
MCHC	13				↑ 104				↑ 105
好中球	R4					↓ 50			
好酸球	13				↑ 150				
リンパ球	R4				↑ 174				
単球	13			↑ 150	↑ 200			↑ 300	↑ 400
	R8				↑ 300				
大型不染色細胞	R8				↑ -				
メトヘモグロビン	13		↓ 35	↓ 34	a)				a)
	R4				↓ 42				

血液学的検査(続き)

項目 検 査 週		投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		30	100	1000	10000	30	100	1000	10000
網赤血球数	13							↑150	↑208
	R4	↑189				↑200			↑327
	R8	↑229							

Wilcoxon の順位和検定あるいは Dunnett 法により統計解析を実施

↑↓ : P<0.05 ↑↓ : p<0.01 ↑↓ : P<0.001

表中の数値は変動の目安として群平均値の対照群に対する変動率(%)を表したもの、ただし、R8 雄の大型不染性細胞は対照群が 0 で算出できないため “-” とした。

R4 あるいは R8 : 回復期間 4 あるいは 8 週

a) : 試料混濁のため評価から除外した。

投与 13 週時の検査の結果、雌では 100 ppm 以上、雄では 1000 及び 10000 ppm 群においてヘマトクリット値の低下が認められた。また、赤血球数の低下が 100、1000、10000 ppm 群の雌雄に認められた。回復期間 4 週時には 10000 ppm 群の雌においてヘマトクリット値及び赤血球数の低下が認められた。投与 13 週時に平均赤血球血色素濃度及び平均赤血球血色素量が 10000 ppm 群の雌雄において対照群に比べて増加したが、回復期間 4 及び 8 週間後には回復していた。投与 13 週時にメトヘモグロビン濃度が 100 及び 1000 ppm の群の雄において対照群に比べて有意に低下した。回復期間 4 週後においても 10000 ppm 群の雄にメトヘモグロビンの低値が認められた。雌においては対照群と同程度であった。1000 及び 10000 ppm 投与群の雌において投与 13 週時に網赤血球数の増加が認められ、回復期間 4 週時においても増加が認められた。投与 13 週時にスルフヘモグロビンの高値が 100 ppm 以上の雄及び 1000 ppm 群の雌において認められた。スルフヘモグロビンの結果を次表に示す。

性別		雄					雌				
投与量 (ppm)		0	30	100	1000	10000	0	30	100	1000	10000
スルフヘモ グロビン	高	0	0	6	7	11	0	0	0	2	2
	低	18	17	6	5	7	18	18	12	10	16
供試動物数		18	17	12	12	18	18	18	12	12	18

投与 13 週時に赤血球内に血液封入体が観察され、回復期間 4 週時にも 10000 ppm 群において観察された(次表)。

回復期間 4 週時までに回復しなかった検体投与に関する変化は回復期間 8 週時までに回復した。その他、対照群と比較して統計学的に有意差の認められた項目がいくつかあったが、いずれも検体投与の影響とは考えられなかった。

項目	検査週	程度	投与量 (ppm)							
			雄				雌			
			30	100	1000	10000	30	100	1000	10000
封入体	13	軽度	1	10	6	0	0	2	12	12
		中等度	0	2	5	7	0	0	0	0
		重度	0	0	1	5	0	0	0	0
		合計	1	12	12	12	0	2	12	12
	R4	軽度	0	—	—	0	0	—	—	0
		中等度	0	—	—	6	0	—	—	5
		重度	0	—	—	0	0	—	—	0
		合計	0	—	—	6	0	—	—	5
	R8	軽度	0	—	—	0	0	—	—	2
		中等度	0	—	—	0	0	—	—	0
		重度	0	—	—	0	0	—	—	0
		合計	0	—	—	0	0	—	—	2

R4 あるいは R8 : 回復期間 4 あるいは 8 週

血液生化学的検査； 投与 13 週時(投与期間終了時)に主群の全生存動物について、回復期間 8 週時(回復期間終了時)に回復群の全生存動物について採血を行い、以下の項目の測定を行った。

アルカリホスファターゼ(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)、クレアチニンホスホキナーゼ(CPK)、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)、血糖、総ビリルビン、総コレステロール、クレアチニン、尿素、総蛋白、アルブミン、ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン、アルブミン/グロブリン比(A/G)

統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

項目	検査週	程度	投与量 (ppm)							
			雄				雌			
			30	100	1000	10000	30	100	1000	10000
総ビリルビン	13		↑200	↑200	↑200			↑150	↑200	↑150
ALT	R8					↑169				
CPK	13							↓19	↓26	
	R8						↓38			
アルブミン	13				↑107				↑109	
尿素	R8					↓78	↑117			
クレアチニン	R8						↑113			
総蛋白	R8									↑106
A/G	13								↑119	
ナトリウム	13			↑102						
	R8						↑102			
塩素	13			↑103			↑102		↑102	
	R8						↑102			

Wilcoxon の順位和検定あるいは Dunnett 法により統計解析を実施

↑↓ : P < 0.05 ⇧ : p < 0.01 ↑↓ : P < 0.001

表中の数値は変動の目安として群平均値の対照群に対する変動率(%)を表したもの

R8 : 回復期間 8 週

投与 13 週時の検査では 100、1000、10000 ppm 群の雌雄において総ビリルビン濃度が対照群と比較して有意に高かったが、その差は小さいものであった。回復期間 8 週間後には対照群と投与群の間に差はみられなかった。

その他、対照群と比べて群間に有意差の認められたものがいくつかみられたが、正常な生物学的変動に起因したものであった。

臓器重量； 投与期間終了時に主群の全生存動物を対象として、また回復期間終了時に回復群の全生存動物を対象として以下の臓器重量を測定(絶対重量)し、対体重比も算出した。

副腎(両側)、脳、精巣上体(両側)、心臓、腎臓(両側)、肝臓、卵巢(両側)、脾臓、精巣(両側)、胸腺、甲状腺及び上皮小体、子宮及び子宮頸部

統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

項目 検 査 週		投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		30	100	1000	10000	30	100	1000	10000
体重	13			↑112				↑115	
脳	対体重比	13			↓ 86			↓ 86	
心臓	絶対重量	13							↑114
腎臓	対体重比	13						↓ 86	
肝臓	絶対重量	13			↑112				
脾臓	絶対重量	13			↓ 146	↑ 156	↓ 83	↓ 154	↑ 172
	対体重比	13			↑ 129	↑ 150	↓ 82	↓ 132	↑ 163
精巣上体	対体重比	R8				↓ 85			
精巣	対体重比	R8				↓ 81			

Behrrens-Fisher 検定あるいは Dunnett 法により統計解析を実施 ↑↓ : P < 0.05 ↑↓ : p < 0.01

表中の数値は変動の目安として群平均値の対照群に対する変動率(%)を表したもの

R8 : 回復期間 8 週

1000 及び 10000 ppm の動物において対照群と比べて脾臓の絶対重量及び対体重比が有意に増加した。回復期間 8 週間後には脾臓重量に対照群と比較して有意な差は認められなかった。その他臓器重量のわずかな変動が散見されたが、これらの変動は単発的であり検体投与の影響ではないと考えられた。

肉眼的病理検査； 全ての動物について剖検を行った。

対照群と比較して統計学的に有意差の認められた所見を次表に示す。

性別	投与量 (ppm)	雄					雌				
		0	30	100	1000	10000	0	30	100	1000	10000
主 群	臓器	所見/検査例数	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	脾臓	腫脹	6	6	7	↑11	↑11	6	2	4	↑11
回 復 群	臓器	所見/検査例数	6	6	0	0	6	6	6	0	5
	脾臓	腫脹	0	1	0	0	2	0	1	0	2

Fisher の直接確率法により統計解析を実施 ↑ : P < 0.05 (申請者実施)

1000 及び 10000 ppm 群の雌雄において脾臓の腫脹が対照群と比較して有意に増加した。回復群においても 10000 ppm 群の雌雄各 2 例の脾臓に腫脹が認められた。

病理組織学的検査： 肉眼的病理検査を実施した対照群及び最高用量群の主群の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(両側)、大動脈(頸部)、脳、盲腸、結腸、十二指腸、精巣上体(両側)、眼(両側)、大腿骨、心臓、胆嚢、回腸、空腸、腎臓(両側)、外涙腺(両側)、肝臓、肺及び主要気管支、リンパ節(下頸及び腸間膜)、乳腺(尾側部)、食道、卵巣(両側)、脾臓、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺(顎下腺、両側)、坐骨神経(片側)、精のう、骨格筋(大腿部、片側)、皮膚、脊髄、脾臓、胸骨、胃、精巣(両側)、胸腺、甲状腺及び上皮小体、気管、膀胱、子宮及び子宮頸部、肉眼的異常部位

また、30、100 及び 1000 ppm 群の主群の全動物を対象として、腎臓、肝臓、肺、脾臓及び肉眼的異常部位について、また、回復群においては、肉眼的異常部位について病理標本を作製し、検鏡した。

統計学的有意差の認められた所見を次表に示す。

性別			雄					雌				
投与量 (ppm)			0	30	100	1000	10000	0	30	100	1000	10000
主群	臓器	所見/検査例数	12	11	12	12	12	12	12	12	12	12
	肝臓	小房周囲肝細胞肥大	3	2	3	8	↑9	0	0	0	0	0

Fisher の直接確率法により統計解析を実施 ↑: P<0.05

投与 13 週間後、10000 ppm 群の雄において肝臓の小房周囲肝細胞肥大が対照群に比べて有意に高頻度で観察されたが、本所見はマウスの本系統のこの週齢で通常観察される所見であり投与された生体異物への適応反応であり、毒性学的な意義はないものと考えられた。

以上、本検体のマウスに対する 13 週間混餌投与による反復経口毒性試験及び 8 週間の回復試験の結果、100 ppm 以上の雌雄において赤血球に対する影響が認められ、また、その二次的変化として、1000 ppm 以上の雌雄で脾臓の絶対重量及び対体重比の増加、及び、1000 ppm 以上の雄及び 1000 ppm の雌で脾臓の腫脹が認められた。したがって、無毒性量は 30 ppm(雄: 4.2 mg/kg/日、雌: 4.7 mg/kg/日相当) であると判断される。

(資料 4-3)

イヌにおける 90 日間反復経口カプセル投与毒性試験(含 4 週間回復試験)

試験機関: ハンティンドン ライフ サイエンス社
英国 [GLP 対応]
報告書作成年: 1998 年

検体の純度:

試験動物 : ビーグル犬、毒性試験群(0、100、300、1000 mg/kg/日群) ; 1 群雌雄各 4 匹、
回復試験群(0、100、1000 mg/kg/日群) ; 1 群雌雄各 2 匹
投与開始時週齢; 約 20~24 週齢
投与開始時体重範囲; 雄 10.4~13.2 kg、雌 10.1~11.7 kg

試験期間 : 投与期間 13 週間(1997 年 2 月 18 日~1997 年 5 月 22 日)
回復期間 4 週間(1997 年 5 月 20 日~1997 年 6 月 17 日)

投与方法 : 検体を 100、300、1000 mg/kg/日の用量でゼラチンカプセルに封入し、13 週間にわたり連続して経口投与した。毎日投与する検体量は最も近い時期に測定した体重をもとに算出した。検体は直接ゼラチンカプセルに秤量し、給餌前に投与した。対照群には 1000 mg/kg/日群の動物と同じサイズの空のカプセルを投与した。対照群、100 及び 1000 mg/kg/日投与群の回復試験群については 13 週間投与後 4 週間の休薬期間をおいた。

投与量設定根拠:

試験項目及び結果:

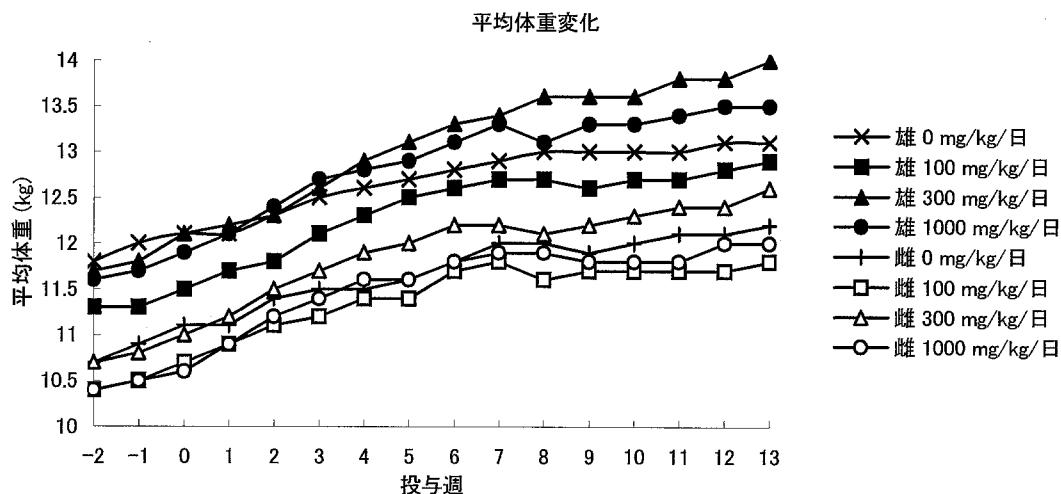
一般状態及び死亡率; 毎日症状を観察した。さらに各ケージについて一般状態の悪化を示す跡、例えば吐物、血液あるいは軟便の有無を毎日観察した。

全試験期間を通じて死亡及び検体投与に関連すると考えられる症状は認められなかった。

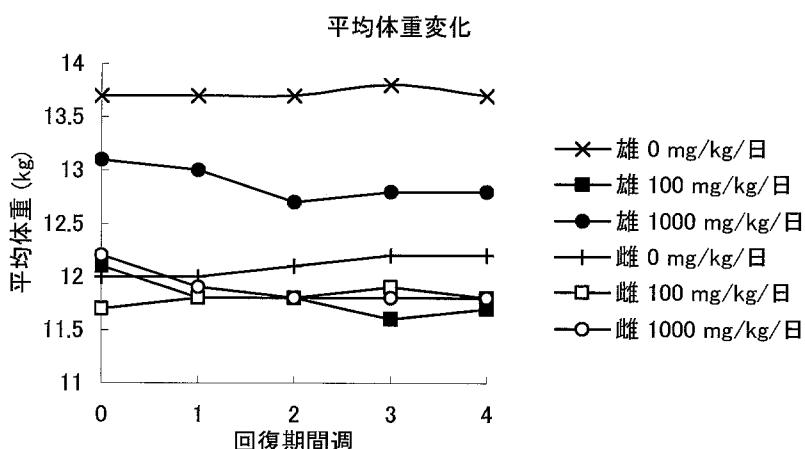
体重変化; 飼化期間中毎週 1 回、投与開始日、投与期間中毎週 1 回及び回復期間中毎週 1 回、及び剖検前に体重を測定した。

300 及び 1000 mg/kg/日投与群の雄ならびに 300 mg/kg/日投与群の雌における総体重増加量は対照群と比較してわずかに高かった(統計学的有意差なし)が、はっきりした用量相関性は認められず、群間の差はおそらく個体差によるものと考えられた。100 mg/kg/日投与群の動物の体重は対照群と同様であった。また、回復期間中の検体投与群の体重増加量は雌雄ともに対照群と概ね同様であった。

投与期間中の体重変化を下図に示す。



回復期間中の体重変化を下図に示す。



次表に投与期間(第1-13週)及び回復期間中の総体重増加量を示す。

用量群 (mg/kg/日)	雄				雌			
	0	100	300	1000	0	100	300	1000
投与第1-13週 総体重増加量(kg)	1.0	1.4	1.9	1.6	1.1	1.1	1.6	1.4
回復期間1-4週 総体重増加量(kg)	0.0	-0.4			-0.3	0.2	0.1	-0.4

摂餌量： 飼育、投与及び回復期間中各2匹ずつペアの動物に与えた給餌量と食べ残し量及びこぼした餌の推定量を毎日記録した。これらの値から飼育期間の終わりの2週間、試験期間中及び回復期間中の各週の1匹あたりの平均摂餌量を計算した。

検体投与群の動物の総摂餌量は毒性試験期間ならびに回復期間を通じて対照群と同様であった。

次表に総摂餌量を示す。

用量群 (mg/kg/日)	雄				雌			
	0	100	300	1000	0	100	300	1000
投与第 1-13 週 (kg/匹)	36.4	36.4	36.4	36.4	36.4	36.4	36.3	36.4
回復期間 1-4 週 (kg/匹)	11.2	11.2	11.2	11.2	11.2	11.2	11.2	11.2

獣医学的検査； 投与開始前、投与第 4、8、12 週及び回復期第 4 週に全動物について精密な獣医学的検査を実施した。

投与に関連すると考えられる所見は認められなかった。

眼科学的検査； 投与開始前、投与第 12 週及び回復期第 4 週に全動物について、1.0 % tropicamide を点眼後、間接検眼鏡で眼科学的検査を実施した。

投与に関連すると考えられる所見は認められなかった。

血液学的検査； 投与開始前、投与第 6、13 週及び回復期第 4 週に、全ての動物について一晩絶食後頸静脈より採血し、以下の項目について測定した。

ヘマトクリット、血色素量、赤血球数、白血球数及び白血球百分率、血小板数、平均赤血球血色素濃度、平均赤血球血色素量、平均赤血球容積、血液塗抹(Romanowsky 染色し正赤芽球及びハウエル ジョリーカーテンを含む異常の有無を検査)、網赤血球数(ブリリアントクレシルブルー染色し、網赤血球及びハイインツ小体を含む異常について検査)、メトヘモグロビン、スルフヘモグロビン、プロトロンビン時間

さらに、剖検数日前に、局所麻酔(塩酸リドカイン)下でバイオプシーにより腸骨稜から骨髄試料を採取し、骨髄塗抹を作製した。骨髄芽球系／赤芽球系比を求めた。

次表に投与期間中の検査において統計学的有意差の認められた項目を示す。

項目		用量群 (mg/kg/日)					
		雄			雌		
		100	300	1000	100	300	1000
ヘマトクリット	13 週					↓84	
血色素量	6 週			↓86	↓93	↓85	↓87
	13 週			↓90		↓79	↓89
赤血球数	6 週	↓87		↓84	↓92	↓82	↓83
	13 週			↓88		↓78	↓89
平均赤血球血色素量	6 週						↑105
平均赤血球血色素濃度	6 週	↓97	↓94	↓93	↓95	↓92	↓93
	13 週	↓97	↓95	↓94	↓95	↓93	↓92
平均赤血球容積	6 週	↑108	↑111	↑111	↑105	↑113	↑113
	13 週		↑107	↑109	↑104	↑109	↑110
白血球数	6 週					↑147	

血液学的検査成績(つづき)

項目		用量群 (mg/kg/日)					
		雄			雌		
		100	300	1000	100	300	1000
メトヘモグロビン	6週			↑900		↑2267	↑2933
	13週		↑一	↑一		↑1214	↑1400
網赤血球数	6週		↑494	↑448		↑327	↑427
	13週	↑216	↑231	↑299			↑297
骨髄芽球系	13週	↓90	↓90	↓87			
赤芽球系	13週	↑123	↑123	↑129			
骨髄芽球系／赤芽球系比	13週	↓70	↓74	↓70			
ハイインツ小体#	6週	2/6	3/4*	5/6**	0/6	1/4	6/6**
	13週	6/6**	4/4**	6/6**	6/6**	4/4**	6/6**
スルフヘモグロビン#	13週	1/6	0/4	2/6	0/6	0/4	1/6
ハウエルジョリー小体#	13週	1/6	3/4*	5/6**	0/6	0/4	3/6

表中の数値(除ハイインツ小体)は変動の目安として群平均値の対照群に対する変動率(%)を表したもの、ただし、13週雄のメトヘモグロビンは対照群が0で算出できないため“-”とした。

骨髄芽球系／赤芽球系比は Behrens-Fisher 法あるいは Dunnett 法で、その他は Wilcoxon 順位和検定あるいは Dunnett 法で統計解析を実施 ↑↓:p<0.05 ↑↓:p<0.01 ↑↓:p<0.001

ハイインツ小体は Fisher の直接確率計算法で統計解析を実施(申請者実施) *:p<0.05 **:p<0.01

: 観察された動物数/検査動物数(対照群は 6 週、13 週の雌雄共に 0/6)。

投与第 6 及び 13 週の血液学的検査において、投与に相関した変化が赤血球に関する項目に認められた。これらの変化は 1000 mg/kg/日投与群で最も顕著であり、100 mg/kg/日投与群ではわずかであった。

300 及び 1000 mg/kg/日投与群においては投与第 6 週、第 13 週の雌雄とも概ね同様の変化が認められ、メトヘモグロビン濃度の上昇、ヘマトクリットの低下(雌の 13 週でのみ有意差)、血色素量の低下、赤血球数の減少、平均赤血球容積の上昇、平均赤血球血色素濃度の減少、網赤血球数の増加が認められた。また、網赤血球標本において多数のハイインツ小体が認められた。この他、統計学的な有意差はなかったが、血小板数の軽度な上昇が認められた。第 13 週の検査において 1000 mg/kg/日投与群の雄 2 例及び雌 1 例でスルフヘモグロビンが高かった。100 mg/kg/日投与群においては雌雄ともに軽度な赤血球数の減少(第 6 週)、平均赤血球容積の上昇、平均赤血球血色素濃度の減少、メトヘモグロビン濃度のわずかな上昇(統計学的有意差なし)が認められた。また、網赤血球標本においてハイインツ小体が認められた。第 13 週の検査において雄 1 例でスルフヘモグロビンが高かった。骨髄のバイオプシー標本の鏡検の結果、骨髄芽球系／赤芽球系比は雄において有意差が認められるものの、予想された範囲内であった。その他に有意差が認められた項目は、用量相関性が認められないか、あるいは中間検査のみで変動していることから、偶発的なものと考えられた。

投与第 6 週及び第 13 週の血液学的検査において投与による影響が認められていた項目は 4 週間の回復期間後には回復した。

血液生化学的検査： 投与開始前、投与第 6、13 週及び回復期第 4 週の血液学的検査と同時に、全ての動物から採血し、以下の項目について測定した。

アルカリホスファターゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、 γ -グルタミルトランスペチターゼ、グルコース、総ビリルビン、総コレステロール、クレアチニン、尿素、総蛋白、アルブミン、アル

ブミン/グロブリン比(A/G 比)、ナトリウム、カリウム、塩素、無機リン、カルシウム

次表に投与期間中の検査において統計学的有意差の認められた項目を示す。

項目		用量群 (mg/kg/日)					
		雄			雌		
		100	300	1000	100	300	1000
総ビリルビン	6週	↑-	↑-	↑-	↑300	↑400	↑400
	13週		↑300	↑300	↑300	↑400	↑600
総コレステロール	6週		↑141				
総蛋白	6週		↑108				
	13週	↑106	↑108				
アルブミン	6週	↑110	↑116				
	13週		↑113				
A/G 比	6週	↑120	↑120	↑120			
ナトリウム	6週		↑101				
カルシウム	6週		↑104				
無機リン	13週						↓85

表中の数値は変動の目安として群平均値の対照群に対する変動率(%)を表したもの、ただし、6週雄の総ビリルビンは対照群が0で算出できないため“-”とした。

Wilcoxon順位和検定あるいはDunnett法で統計解析を実施 ↑↓:p<0.05 ↓↓:p<0.01 ↑↓:p<0.001

第6週及び第13週の全投与群では対照群に比し総ビリルビン濃度が高かったが、4週間の回復期間後には回復した。その他に有意差が認められた項目は、用量相関性が認められないか、変動が軽微であるか、あるいは中間検査のみで変動していることから、偶発的なものと考えられた。

尿検査； 投与開始前、投与第5週、第12週及び回復期第4週に全ての動物から採尿した。各動物を代謝ケージに移し飼料及び水を取り除き一晩採尿した。採取した尿試料について以下の項目を検査した。

外観、尿量、pH、尿比重、尿蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、血液、尿沈渣の顯微鏡的検査

尿検査において検体投与に関連した変化は認められなかった。

臓器重量； 剖検時に全動物について以下の臓器重量(絶対重量)を測定し、対体重比を計算した。

脳、甲状腺及び上皮小体、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、精巣、卵巢、前列腺、精巣上体、子宮及び子宮頸部

次表に13週間投与終了後剖検した動物において統計学的有意差の認められた項目を示す。

項目	用量群 (mg/kg/日)					
	雄			雌		
	100	300	1000	100	300	1000
最終体重		↑112	↑110			
絶対重量	肝臓	↑119				
	脾臓		↑171			↑201
体重比	脾臓					↑220

次表に 13 週間投与終了後 4 週間回復期間経過後に剖検した動物において統計学的有意差の認められた項目を示す。

項目	用量群 (mg/kg/日)			
	雄		雌	
	100	1000	100	1000
体重比	副腎			↑122
	精巣上体	↑133		

上 2 表とも表中の数値は変動の目安として群平均値の対照群に対する変動率(%)を表したもの
Dunnett 法で統計解析を実施 ↑:p<0.05 ↑↑:p<0.01

第 13 週投与後に投与群で脾臓重量が雌雄ともに対照群に比しやや増加したが、統計学的な有意差は 1000 mg/kg/日投与群においてのみ認められた。4 週間の回復期間後の脾臓重量は対照群と同様であった。臓器重量においてこの他にも軽度な変化が認められたが、これらの変化は用量相関性を欠いていたりあるいは片性に限られていたことから、これらの変化は群間の体重差に関連しており、投与による影響とは考えられなかった。

肉眼的病理検査； 全ての動物を詳細に剖検した。

投与 13 週後及び回復期間 4 週後の肉眼的病理検査において投与に関連した所見は認められなかった。

病理組織学的検査； 全ての動物について以下の組織を検鏡した。また、全群の全ての動物に認められた肉眼的異常部位についても検鏡した。

副腎、卵巣、大動脈(胸部)、肺臓、脳、下垂体、盲腸、前立腺、結腸、直腸、十二指腸、唾液腺(顎下)、精巣上体、坐骨神経、眼、骨格筋(腿)、大腿骨、皮膚、胆嚢、脊髄、心臓、脾臓、回腸、胸骨及び骨髓、空腸、胃、腎臓、精巣、肝臓、胸腺、肺、甲状腺及び上皮小体、リンパ節(顎下及び腸間膜)、気管、膀胱、乳腺(尾側部)、子宮及び子宮頸部、食道、臍、肉眼的異常部位

次表に 13 週投与後に剖検した動物において統計学的に有意差の認められた所見を示す。

検査 時期	組織	性別 所見	投与量 (mg/kg)	雄				雌			
				0	100	300	1000	0	100	300	1000
最終 解剖	肝臓	(評価数)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)
		クッパー細胞色素沈着	0	3	↑4	↑4	0	3	↑4	↑4	↑4

Fisher の直接確率計算法で統計解析を実施 ↑:p<0.05

また、脾臓で認められた所見を次表に示す。

検査 時期	組織	性別 所見	投与量 (mg/kg)	雄				雌			
				0	100	300	1000	0	100	300	1000
最終 解剖	脾臓	(評価数)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)
		ヘモジデリン沈着	2	3	4	4	3	3	4	4	3

Fisher の直接確率計算法で統計解析を実施

投与 13 週後の検査において、投与に関連した顕微鏡的変化が肝臓に認められた。

また、脾臓において、全投与群のほとんどの動物でヘモジデリン沈着の発生頻度及び程度が軽度に上昇したが、対照群でもこの変化が認められたことから投与によるものとするには不十分であった。この他に観察された病理組織学的所見は本研究所において同年齢のイヌにみられる病変と同様の種類と頻度であった。

4 週間の回復期間後には肝臓のクッパー細胞における色素沈着は認められず、検体投与に関連するその他の所見も認められなかった。

以上のように、検体をビーグル犬に 100、300 及び 1000 mg/kg/日の用量で 13 週間経口カプセル投与したが、死亡は認められなかった。赤血球が毒性の第一次の標的であり、二次的な変化が肝臓及び脾臓に認められた。即ち、300、1000 mg/kg/日 群の雌雄において赤血球に関する多くの検査項目で投与に関連した変化が認められ、100 mg/kg/日 群の雌雄ではこれらの変化は弱くなってしまっており、いくつかの項目で有意差を示さなかった。1000 mg/kg/日 群の雌雄で脾臓の絶対重量が、雌では体重比についても、増加していた。加えて、300、1000 mg/kg/日 群の雌雄の肝臓では、クッパー細胞色素沈着が認められた。本試験からは明らかな無影響量(NOEL)は得られなかったが、100 mg/kg/日は無毒性量(NOAEL)に近い用量であると考えられた。100 及び 1000 mg/kg/日の用量で 13 週間投与後 4 週間の休薬期間経過後には影響を受けたすべての検査項目は回復していた。

本試験結果より、1000 mg/kg/日の用量は本動物種の 52 週間試験における高用量として適当であると考えられた。

(資料 4-4)

イヌにおける 90 日間反復経口カプセル投与毒性試験

試験機関：ハンティンドン ライフ サイエンス社
英国 [GLP 対応]
報告書作成年：1998 年

検体の純度：

試験動物：ビーグル犬、雌雄各 4 匹
投与開始時週齢；約 23～25 週齢
投与開始時体重範囲；雄 7.0～9.9 kg、雌 7.9～10.0 kg

試験期間：投与期間 13 週間(1997 年 10 月 1 日～1998 年 1 月 1 日)

投与方法： 検体を 10 mg/kg/日の用量でゼラチンカプセルに封入し、13 週間にわたって連続して経口投与した。毎日投与する検体量は最も近い時期に測定した体重をもとに算出した。検体は直接ゼラチンカプセルに秤量し、給餌前に投与した。動物飼育期間中の対照群のデータとして同時に同じ動物室で実施したビーグル犬の 52 週間反復経口カプセル投与毒性試験における対照群のデータを用いた(動物室対照)。

投与量設定根拠；

試験項目及び結果：

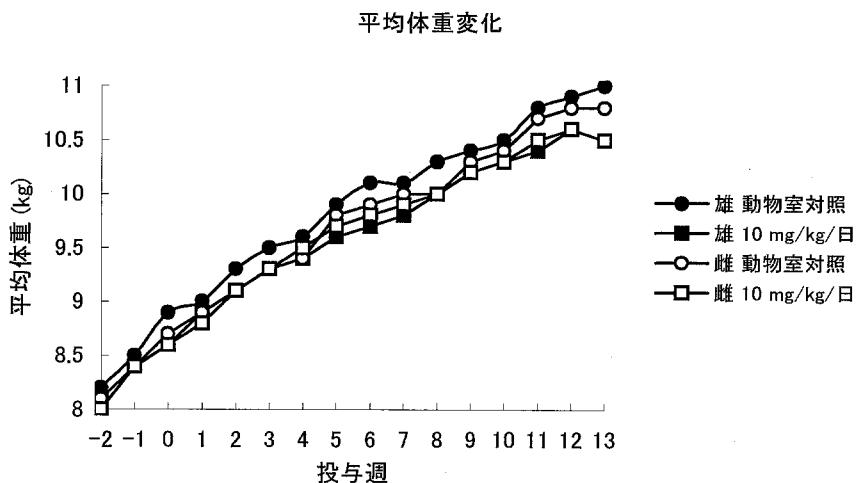
一般状態及び死亡率； 每日症状を観察した。さらに各ケージについて一般状態の悪化を示す跡、例えば吐物、血液あるいは軟便の有無を毎日観察した。

全試験期間を通じて死亡及び検体投与に関連すると考えられる症状は認められなかった。

体重変化； 飼化期間中毎週 1 回、投与開始日、投与期間中毎週 1 回及び剖検前に体重を測定した。

体重増加に検体投与による影響は認められなかった。

投与期間中の体重変化を下図に示す。



次表に投与期間中の総体重増加量を示す。

用量群 (mg/kg/日)	雄		雌	
	動物室対照	10	動物室対照	10
総体重増加量(kg)	2.1	1.9	2.1	1.9

摂餌量； 飼化及び投与期間中各 2 匹ずつペアの動物に与えた給餌量と食べ残し量及びこぼした餌の推定量を毎日記録した。これらの値から飼化期間の終わりの 2 週間及び試験期間中の各週の 1 匹あたりの平均摂餌量を計算した。

検体を投与した動物の摂餌量は動物室対照群と同様であった。

次表に総摂餌量を示す。

用量群 (mg/kg/日)	雄		雌	
	動物室対照	10	動物室対照	10
1-13 週総摂餌量(kg/匹)	36.4	36.4	36.4	36.3

眼科学的検査； 投与開始前及び投与第 12 週に全動物について、1.0 % tropicamide を点眼後、間接検眼鏡で眼科学的検査を実施した。

投与に関連すると考えられる所見は認められなかった。

血液学的検査； 投与開始前、投与第 6 及び第 13 週に一晩絶食させた後、全ての動物について頸静脈から採血し、以下の項目を測定した。

ヘマトクリット、血色素量、赤血球数、白血球数及び白血球百分率、血小板数、平均赤血球血色素濃度、平均赤血球血色素量、平均赤血球容積、血液塗抹(Romanowsky 染色を施し正赤芽球及びハウエルジョリー小体を含む異常の有無を検査)、手動計数網赤血球数(ブリリアントクレシルブルー染色し、網赤血球及びハイインツ小体を含む異常について検査)、メトヘモグロビン、スルフヘモグロビン、プロトロンビン時間、活性部分トロンボプラスチン時間、網赤血球数(第 6 週は手動、第 13 週は自動計数)

次表に投与期間中の検査において統計学的有意差の認められた項目を示す。

項目	用量群 (mg/kg/日)	
	雄	雌
	10	10
白血球数	13週	↑134
網赤血球数	13週	△232

表中の数値は変動の目安として群平均値の動物室対照群に対する変動率(%)を表したもの
Wilcoxon 順位和検定あるいは Dunnett 法で統計解析を実施 ↑:p<0.05 △:p<0.01

投与第 6 及び第 13 週の血液学的検査の結果は、動物室対照群及び投与前の値と同様であった。第 13 週の投与群の雌において動物室対照群に比し網赤血球数の有意な上昇が認められたが、この網赤血球数は正常範囲内(0.1~3.2 %)であり、偶発的なものと考えられた。また、雄の 1 例でスルフヘモグロビンが高かったが、他の血液学的変動は認められず、血液塗抹も正常であったことから、毒性学的な有意性はないものと考えられた。

申請者注：第 13 週の投与群の雄において、白血球数の有意な上昇が認められたが、先に実施した高用量(1000 mg/kg)群で白血球数に異常が認められていないことから、この変動は偶発的なものと判断する。

血液生化学的検査； 投与開始前、投与第 6 及び 13 週の血液学的検査と同時に、全ての動物から採血し、以下の項目について測定した。

アルカリホスファターゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ、総ビリルビン、グルコース、尿素、クレアチニン、総コレステロール、総蛋白、アルブミン、アルブミン/グロブリン比、ナトリウム、カリウム、塩素、無機リン、カルシウム

次表に投与期間中の検査において統計学的有意差の認められた項目を示す。

項目	用量群 (mg/kg/日)	
	雄	雌
	10	10
アラニンアミノトランスフェラーゼ	13週	↑161
グルコース	13週	△114
無機リン	13週	↓87

表中の数値は変動の目安として群平均値の動物室対照群に対する変動率(%)を表したもの
Wilcoxon 順位和検定あるいは Dunnett 法で統計解析を実施 ↓:p<0.05 ↑:p<0.01

有意差が認められた雄のアラニンアミノトランスフェラーゼ及びグルコースの上昇、及び雌の無機リンの低下は、投与前 2 週に測定した値においても同様な傾向を示していることから、投与に関連する変化ではないと考えられた。

尿検査； 投与開始前、投与第 5 週及び第 12 週に全ての動物から採尿した。各動物を代謝ケージに移し飼料及び水を取り除き一晩採尿した。採取した尿試料について以下の項目を検査した。

外観、尿量、pH、尿比重、尿蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、血液、尿沈渣の顕微鏡的検査

尿検査において検体投与に関連した変化は認められなかった。

臓器重量； 剖検時に検体投与群の全動物について以下の臓器重量(絶対重量)を測定し、対体重比を計算した。統計学的解析は行っていない。

脳、甲状腺及び上皮小体、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、精巣、卵巢、前立腺、精巣上体、子宮及び子宮頸部

検体投与群の臓器重量は予想された範囲内であった。

肉眼的病理検査； 全ての動物を詳細に剖検した。

投与に関連した所見は認められなかった。

病理組織学的検査； 検体投与群の全ての動物について以下の組織を検鏡した。また、全群の全ての動物に認められた肉眼的異常部位についても検鏡した。群間差の統計学的解析は行っていない。

副腎、卵巢、大動脈(胸部)、膀胱、脳、下垂体、盲腸、前立腺、結腸、直腸、十二指腸、唾液腺、精巣上体、坐骨神経、眼、骨格筋(腿)、大腿骨、脊髄、胆嚢、脾臓、心臓、胸骨及び骨髄、回腸、胃、空腸、精巣、腎臓、胸腺、肝臓、甲状腺及び上皮小体、肺、気管、リンパ節(頸下及び腸間膜)、膀胱、子宮及び子宮頸部、乳腺(尾部)、膿、食道、肉眼的異常部位

観察されたすべての所見を次表に示す。

検査 時期	組織	性別 投与量(mg/kg)	雄	雌
			10	10
最終 解剖	腎臓	(評価数)	(4)	(4)
		尿細管上皮空胞化	1	0
	肺	(評価数)	(4)	(4)
		間質性肺炎	3	2
		胸膜巢状線維化	1	0
		肉芽腫	1	0
	下垂体	(評価数)	(4)	(4)
		頭蓋咽頭管囊胞	3	4
	脾臓	(評価数)	(4)	(4)
		出血	0	1
	甲状腺	(評価数)	(4)	(4)
		傍濾胞細胞過形成	0	1
	膀胱	(評価数)	(4)	(4)
		慢性炎症	0	1
	胸腺リ ンパ節	(評価数)	(4)	(4)
		洞内赤血球貪食	2	2

観察された病理組織学的所見は本系統イヌの同年齢の動物に通常認められる病変と同様であった。検体投与に関連すると考えられる所見は認められなかった。

以上のように、検体のビーグル犬における 13 週間反復経口カプセル投与毒性試験を実施したところ、投与に関連すると考えられる症状、体重及び摂餌量に対する悪影響は認められず、また、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量及び病理組織学的検査においても検体投与に関連する変化は認められなかったことから、本試験における無影響量(NOEL)は 10 mg/kg/日であると考えられる。

(資料 4-5)

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

試験機関: ハンティンドン ライフ サイエンス社
英國 [GLP 対応]
報告書作成年: 2002 年

検体の純度:

試験動物 : SD 系ラット、開始時 42~46 日齢、一群雌雄各 10 匹
体重; 雄 131~173 g 雌 119~156 g

試験期間 : 投与期間 90 日間(2002 年 2 月 15 日~2002 年 5 月 22 日)

投与方法 : 検体を 0、200、2000 及び 20000 ppm の濃度で飼料に混入し、90 日間にわたって隨時摂食させた。検体を混入した飼料は毎週調製した。

投与量設定根拠:

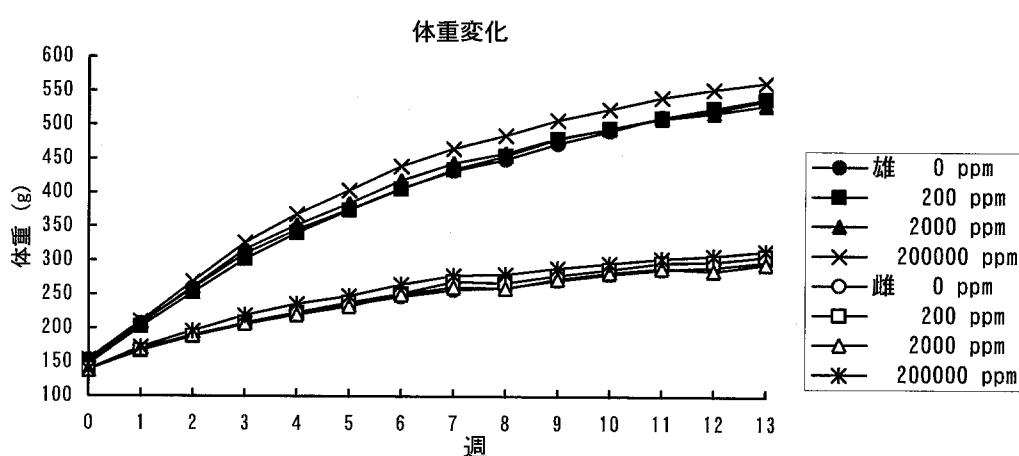
観察・検査項目及び結果:

一般状態及び死亡率; 一般状態及び生死についての観察を 1 日 2 回行った。

投与第 7 週に 200 ppm 群の雌 1 例が一般状態悪化のため切迫屠殺されたが、検体投与に関連したものではないと考えられた。

検体投与に関連した症状は観察されなかった。

体重変化; 投与開始日ならびに投与期間中週 1 回体重を測定した。Dunnett 法で検定した。
平均体重変化を次図に示す。



総体重増加量を次表に示す。

投与量(ppm)	0	200	2000	20000
総体重増加量 (g)	雄 383	391	378	408
	雌 160	166	156	175

体重に投与に関連した影響は認められなかった。

20000 ppm 群の体重増加量が統計学的に有意ではないものの対照群と比較してわずかに増加した。

摂餌量及び食餌効率； 全動物の摂餌量を週1回測定し、食餌効率も算出した。

摂餌量及び食餌効率に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以下のとおりであった。

投与量(ppm)	200	2000	20000
検体摂取量 (mg/kg/day)	雄 17.5	173.9	1752.2
	雌 20.5	206.9	1999.5

詳細な状態の観察； 投与開始前及び投与第1、2、4、8、12週に、全動物を対象として以下の項目について観察し、程度付けした。

ホームケージ内；眼瞼閉鎖、姿勢、振戦、筋攣縮、痙攣、発声

ハンドリング； ケージからの取り出し易さ、流涎、流涙、立毛、眼球突出、被毛、発声、ハンドリングに対する反応

観察台(3分間)；眼瞼閉鎖、姿勢、歩行、覚醒、振戦、筋攣縮、痙攣、活動数(区切られた区画に入った回数)、立ち上がり回数、身づくろい、尿、糞

立ち上がり回数及び活動数について Student の t 検定または Wilcoxon の順位和検定を行った。

ホームケージ内観察及びハンドリング観察では検体投与の影響は認められなかった。観察台での観察では活動数及び立ち上がり回数に対照群と比較して統計学的有意差が認められた。以下に示す。

活動数(区切られた区画に入った回数)

性別		雄				雌			
投与量(ppm)	0	200	2000	20000	0	200	2000	20000	
検査時期 (週)	0	27.8	24.8	26.1	↓20.0	24.4	23.1	24.7	22.9
	1	17.4	11.9	15.2	↓10.6	20.4	13.9	18.3	14.5
	2	13.1	11.2	13.4	11.3	22.6	19.9	24.2	20.1
	4	18.1	12.9	12.5	10.7	22.2	19.2	21.9	21.2
	8	23.8	15.9	16.8	16.7	29.6	19.6	30.3	26.9
	12	20.4	21.5	19.8	12.8	30.4	19.6	32.1	27.5

Student の t 検定または Wilcoxon の順位和検定 ↓↓ : P<0.05 ↓↑ : p<0.01

20000 ppm 群の雄において投与第1週に対照群と比較して活動数が有意に低下した。

投与開始前(投与 0 週)にも有意に低かったこと、特定の動物の低下によるものであったこと、また、対照群の動物にも低値がみられていることから投与に関連した影響ではないと判断した。

立ち上がり回数

性別		雄				雌			
投与量(ppm)		0	200	2000	20000	0	200	2000	20000
検査時期 (週)	0	12.6	10.7	11.3	12.0	12.1	12.0	12.3	12.1
	1	6.6	5.2	6.8	7.0	12.9	8.0	9.3	↓ 5.2
	2	5.4	4.2	5.6	5.3	12.2	11.2	13.0	9.3
	4	9.4	6.7	7.1	5.1	11.4	9.8	13.7	13.2
	8	11.7	6.9	9.9	6.9	14.5	10.8	16.2	13.3
	12	9.9	8.3	9.8	4.8	15.4	10.7	17.6	13.2

Student の t 検定または Wilcoxon の順位和検定 ↑↓ : P<0.05

20000 ppm 群の雌において投与第 1 週に対照群と比較して立ち上がり回数が有意に低下したが、第 2 週以降の検査では有意な低下は認められず、運動量測定検査では一致するようなデータは得られていないことから投与に関連した影響ではないと判断した。

その他の検査項目に検体投与の影響は認められなかった。

機能検査； 投与開始前及び投与第 1、2、4、8、12 週に、全動物を対象として以下の項目について測定し、程度付けした。

感覚運動反応／反射(接近反応、触覚反応、聴覚反応、痛覚反応(ティルピンチ)、正向反射、瞳孔径、接地開脚幅、体温(直腸温)、握力(前肢及び後肢)、運動量(6 分×10 回)の測定を行った。

握力、接地開脚幅、体温及び運動量について Student の t 検定または Wilcoxon の順位和検定を行った。

対照群と比較して統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

体温(℃)

性別		雄				雌			
投与量(ppm)		0	200	2000	20000	0	200	2000	20000
検査時期 (週)	0	37.2	36.9	37.1	37.1	37.3	37.3	37.2	37.1
	1	37.2	37.1	37.2	37.1	37.3	37.4	37.4	37.1
	2	37.1	37.2	37.3	37.2	37.6	37.6	37.6	37.4
	4	37.2	37.3	37.3	37.2	37.4	37.6	↑37.8	37.3
	8	37.6	37.5	37.2	37.3	37.8	37.5	38.1	37.7
	12	37.4	37.2	37.2	37.2	38.0	37.8	38.0	37.8

Dunnett 検定 ↑↓ : P<0.05

申請者注：投与第 4 週に 2000 ppm 群の雌において体温が対照群と比較して有意に高かったが、単発的な発生であることから検体投与の影響とは考えられなかった。

運動量測定^a

検査 時期 (週)	測定 時間 ^b (分)	赤外 線の 位置	投与量(ppm)							
			雄				雌			
			0	200	2000	20000	0	200	2000	20000
0	42-48	高					0.1	↑0.4	↑2.6	↑12.4
		計	高	89.8	84.6	73.2	84.6	86.1	97.5	91.7
		低	551.6	524.9	501.5	448.1	512.1	504.0	596.0	631.0
1	0-6	低	181.6	194.8	180.9	↓146.3				
	12-18	高					11.9	↑28.2	20.5	9.3
		計	高	114.9	120.8	99.4	115.3	110.3	139.0	129.9
		低	650.2	778.3	721.7	601.2	680.3	718.1	779.3	625.5
2	計	高	143.5	164.6	131.3	142.1	149.2	160.9	158.7	130.8
		低	785.5	968.3	713.2	679.5	739.5	643.1	799.1	768.6
4	12-18	低	184.1	↓109.2	↓100.0	103.4				
		高					13.7	6.9	3.5	↓ 2.6
	計	高	279.9	233.2	221.2	248.8	228.1	221.7	227.2	207.9
		低	1028.0	912.6	933.8	971.5	1049.9	894.9	966.7	938.9
8	0-6	低	280.5	254.5	261.6	↓216.4				
	18-24	高					37.1	↓22.0	↓17.0	↓18.0
		低					145.7	↓90.9	↓100.9	↓96.7
	36-42	高					23.4	12.4	↓ 7.6	↓ 8.8
		計	高	476.8	467.7	389.8	411.8	276.4	207.3	268.1
	低	1234.8	1218.3	1110.4	979.9	1341.8	924.1	1122.0	1087.2	
12	18-24	低					130.9	89.3	111.9	↓77.6
	54-60	高	2.4	6.1	8.3	↑12.5				
		計	高	161.4	152.5	155.0	165.3	166.5	133.6	164.0
	低	899.3	931.3	1035.8	910.0	1228.7	914.4	1104.8	987.1	

Student の t 検定または Wilcoxon の順位と検定 ↓↓ : P<0.05 ↑↑ : p<0.01

有意差の認められた測定間隔の時間および 60 分間の合計を示す。

a 赤外線ビームを遮った回数、10 匹の平均値

b 6 分間隔で 10 回測定

各用量群において運動量の変動が散発的にみられた。いずれも軽微な変動であり、60 分間の総運動量には差はなかった。これらは動物の個体差を反映したもので投与の影響とは考えられない。

その他の検査項目に検体投与の影響は認められなかった。

眼科学的検査； 投与開始前に全動物について、投与 13 週間後に対照群および 20000 ppm 群の全動物について眼科学的検査を実施した。

投与 13 週間後、投与に関連した所見は認められなかった。

脳重量； 投与終了時に全生存動物の脳重量を測定した。Dunnett 検定を行った。

検体投与に関連する変動は認められなかった。

解剖学的測定； 投与終了時に全生存動物の大脳半球の大きさ(長さ及び幅)を測定した。

検体投与に関連する変動は認められなかった。

肉眼的病理検査； 全動物(途中切迫殺及び投与終了時の全生存動物)を対象として肉眼的病理検査を行った。Fisher の直接確率計算法による検定を行った。
検体投与に関連する所見は観察されなかった。

病理組織学的検査； 対照群及び最高用量(20000 ppm)群の各性 5 匹の動物を対象として、以下の病理標本を作成し検鏡した。Fisher の直接確率計算法による検定を行った。

- 脳(前脳横断面 3 カ所、中脳、橋、小脳、延髄の横断面)
- 脊髄(頸膨大、腰膨大の横断面及び縦断面)
- 末梢神経系(背根神経節(頸部及び腰部)、背根神経線維(頸部及び腰部)、腹根神経線維(頸部及び腰部)、坐骨神経(切痕部及び腿中部)、脛骨神経(膝部及び腓腹筋分岐部)
- 視神経を含む眼球
- 骨格筋

坐骨神経及び脛骨神経は樹脂包埋し、トルイジンブルー染色した。その他はパラフィン包埋し、ヘマトキシリソエオジン染色した。

神經に影響（神經線維変性）のみられた動物について下表に示した。

群/性	1M	4M	1F	4F
用量 (ppm)	0	20000	0	20000
供試動物数	5	5	5	5
脛骨神経*				
腓部－神經線維変性	1M11	-	1F54	4F71
膝部－神經線維変性	-	4M21	1F55	4F74
坐骨神経*				
切痕部－神經線維変性	1M11	4M25	1F51	4F74
腿部－神經線維変性	-	4M21	1F52	4F71
				4F75
神經線維変性を有する動物数	1/5	2/5	4/5	3/5
神經線維変性を有する組織切片数	2/20	3/20	4/20	4/20

* 特定の変化を示した動物の識別番号

検体投与に関連する所見は観察されなかった。

対照群および 20000 ppm 群とも雌雄において脛骨神経(膝部及び腓腹筋分岐部)、坐骨神経(切痕部及び腿中部)に軸索変性が観察されたが、対照群でも発生していること、変性はいずれも軽微であることから検体投与の影響とは考えられない。

以上のとおり、本剤のラットに対する 90 日間飼料混入投与による神經毒性試験において、神經行動障害や神經病理学的变化はいずれの用量においても認められなかった。したがって、本剤の本試験における無影響量は 20000 ppm(雄：1752.2 mg/kg 体重/日、雌：1999.5 mg/kg 体重/日)であると判断される。