

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

②マウスを用いた飼料混入投与による反復経口投与毒性試験

(資料 2-6)

試験機関: Hazleton UK

[GLP 対応]

報告書作成年: 1989 年

検体純度:

供試動物: Cr1:CD-1 (ICR) BR マウス, 1 群雌雄各 12 匹

開始時 6~7 週齢

試験開始時体重範囲 雄; 24.9~33.5 g, 雌; 19.2~26.1 g

投与期間: 13 週間 (1989 年 4 月 28 日~1989 年 8 月 1 日)

投与方法: 検体を 0, 30, 300 および 2000 (第 1 週のみ 3000) * ppm の濃度で飼料に混入し, 13 週間にわたって随時摂食させた。検体を混入した飼料は毎週調製した。

用量設定根拠;

観察・検査項目及び結果:

一般状態及び死亡率; 一般状態及び生死を毎日観察した。また, 週 1 回, 詳細な症状観察を実施した。

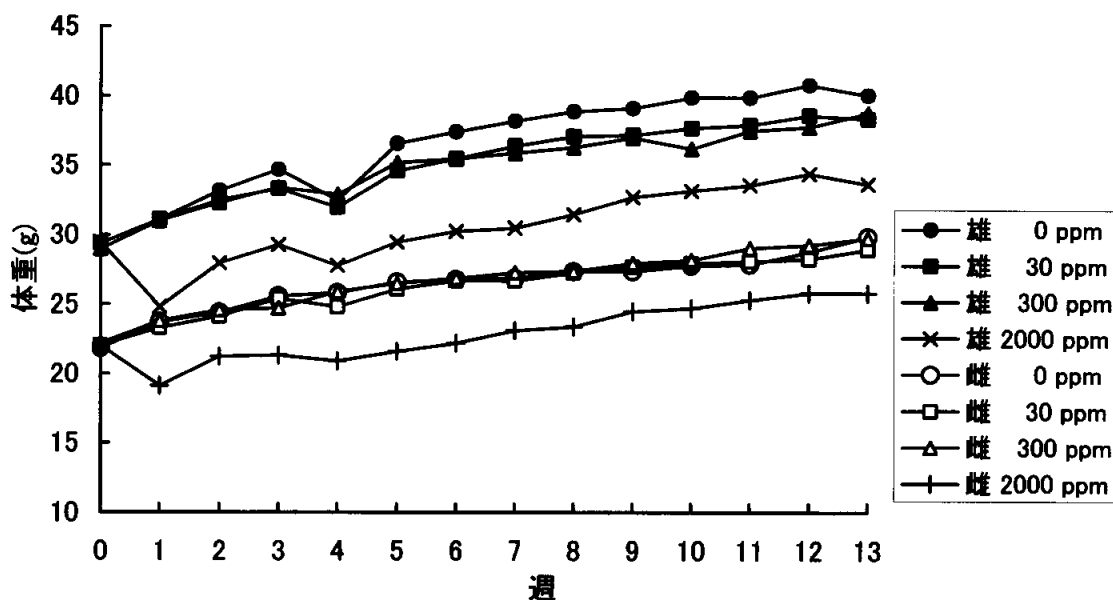
検体投与に関連するような臨床症状は観察されなかった。また, 死亡率に検体投与の影響は認められなかった。

投与第 11 週に 300ppm 投与群の雄 1 例が消瘦および皮膚の腫脹やただれのため切迫殺された。投与第 13 週に 300ppm 投与群の雄 1 例が急性尿道閉塞で死亡した。また, 対照群の雄 3 例, 雌 1 例, 300ppm 群の雄 2 例が投与第 13 週の採血中に採血量過多のために死亡した。

体重変化; 投与開始日および投与期間中毎週全生存動物の体重を測定した。

体重変化を下図に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。



期間ごとの群平均体重増加量を下表に示す。

群平均体重増加量 (g)									
性別		雄				雌			
投与量(ppm)		0	30	300	2000	0	30	300	2000
投 与 週	0 - 1	1.6	1.8	2.1	↓ -4.7	1.9	1.3	1.6	↓ -2.9
	1 - 6	6.3	↓ 4.4	↓ 4.4	5.6	3.1	3.3	3.2	3.2
	6 - 13	3.1	2.9	3.3	3.3	2.7	2.4	2.9	3.6
	0 - 13	10.7	9.1	10.0	↓ 4.2	7.8	7.0	7.6	↓ 3.9

t 検定 (両側) ↓, p<0.01 ; ↓, p<0.001

3000ppm の用量で雌雄に投与した結果、第1週に体重が減少した（群平均体重で開始時より雄で16%、雌で13%減少）ため、用量を3000ppmから2000ppmへ引き下げた。その結果、投与第2週では急激に体重が増加したものの、その後も体重は対照群より低く推移し、投与終了時の体重は対照群より雄で16%、雌で14%低下していた。30ppm群および300ppm群では雄において投与第1～6週に統計学的に有意な減少が認められたが、総体重増加量は対照群と同程度であった。雌では対照群と同程度に体重が増加した。投与第4週に雄の全群において体重が減少したが、これは飲料水が欠乏したことが原因であった。

摂餌量； 全動物の摂餌量を毎週測定した。
期間ごとの群平均摂餌量を下表に示す。

群平均摂餌量 (g/動物)									
性別		雄				雌			
投与量(ppm)		0	30	300	2000	0	30	300	2000
投 与 週	1 - 6	231.1	227.4	243.2	↓ 204.6	228.8	229.3	219.5	↓ 191.0
	7 - 13	266.4	266.2	293.1	249.4	276.5	284.5	271.0	245.1
	1 - 13	497.5	493.6	536.2	453.9	505.2	513.7	490.5	↓ 436.1

t 検定 (両側) あるいは Wilcoxon の順位和検定 ↓, p<0.05 ; ↓, p<0.001

3000ppm の用量で雌雄に投与した結果、第1週に摂餌量が減少した（群平均値で対照群より雄で22%、雌で8%減少）。投与第2週に用量を2000ppmに引き下げたところ、雄では摂餌量がいったん対照群と同程度まで増加したが、それ以降の週では対照群より低く推移した。雌では摂餌量に對

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

する用量軽減の影響はなかった。雌雄とも投与第1～6週の、また雌では投与第1～13週の群平均摂取量が対照群と比較し統計学的に有意に減少した。

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)		30	300	2000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	4.6	50.5	341.1
	雌	6.5	60.7	438.5

血液学的検査；投与後13週に全生存動物から血液を採取し、以下の項目を測定した。

赤血球数、血色素量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、血小板数、白血球数、白血球のディファレンシャルカウント
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	投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	30	300	300 ¹⁾	2000	30	300	2000	2000 ²⁾
血色素量							↓ 94	
ヘマトクリット値							↓ 91	↓ 94
MCV				↓ 91			↓ 91	↓ 91
MCH				↓ 93			↓ 94	↓ 93
MCHC					↑ 103	↑ 103	↑ 103	↑ 103
白血球数		↑ 165	↓ 54					↑ 111
好中球								↑ 235
リンパ球		↑ 150						↓ 88

↑ 検定 (両側) あるいは Wilcoxon の順位和検定 ↑↓, $p < 0.05$; ↑↓, $p < 0.01$; ↑↓, $p < 0.001$

表中の数字は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

1): 300ppm 群の雄 1 例 (動物番号 34) の値が平均より大きく外れていたためこの動物を除いた。

2): 2000ppm 群の雌 1 例 (動物番号 92) の値が平均より大きく外れていたためこの動物を除いた。

以下の評価は動物番号 34 および 92 を除いた結果について行った。

2000ppm 群では、雌において血色素量及びヘマトクリット値が有意に減少し、白血球数と好中球が有意に増加、リンパ球が有意に減少した。また、雌雄において MCV および MCH が有意に減少した。さらに、雌では全投与群において MCHC が有意に増加した。

(申請者注) 上記の変化のうち、MCH の増加については用量に関連したものではなかったため、投与とは無関係と考えられた。その他 300ppm 群の雄に白血球数の有意な減少が認められたが、高用量群では有意な減少がないことから投与の影響とは考えられなかった。

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

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリホスファターゼ (ALP)、ナトリウム、カリウム、塩素、無機リン、カルシウム、尿素、クレアチニン、血糖、総ビリルビン、総蛋白、アルブミン、アルブミン/グロブリン比 (A/G 比)、総コレステロール

次表に統計学的有意差の認められた項目を示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

検査項目	投与量 (ppm)					
	雄			雌		
	30	300	2000	30	300	2000
AST	↑ 132	↑ 161	↑ 272			↑ 246
ALT		↑ 161	↑ 555			↑ 608
ALP			↑ 345			↑ 432
ナトリウム						(103)
カリウム						↑ 121
塩素			↑ 103			(103)
カルシウム						↓ 94
無機リン			↑ 118	↓ 82		
総ビリルビン		↓ 72	↓ 54			↓ 72
クレアチニン		↑ 123	↑ 126			
総蛋白		↓ 96	↓ 96		↓ 93	↓ 91
アルブミン				↑ 112		
A/G 比				↑ 122	↑ 122	
総コレステロール		↓ 65	↓ 35		↓ 50	↓ 40

↑ 検定 (両側) あるいは Wilcoxon の順位和検定 ↑↓, $p < 0.05$; ↑↓, $p < 0.01$; ↑↓, $p < 0.001$
() は統計学的に有意ではないが、参考値として表示。

表中の数字は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

全投与群の雄および 2000ppm 群の雌においてアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 活性が対照群に比して有意に増加した。アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 活性は 2000, 300ppm 群の雄および 2000ppm 群の雌において有意に増加し、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性は 2000ppm 群の雌において有意に増加した。総ビリルビンが 2000, 300ppm 群の雄および 2000ppm 群の雌において有意に減少した。また、総コレステロールは 2000 および 300ppm 群の雌において有意に減少した。これらの変動は検体投与の肝臓に対する影響を示すものと考えられた。

2000 および 300ppm 群の雌において総蛋白が有意に減少し、雄においてクレアチニンが有意に増加した。2000ppm 群において雄では塩素および無機リンが有意に増加し、雌ではカリウムが有意に増加、ナトリウムおよび塩素が増加傾向を示し、カルシウムが有意に減少した。

(申請者注) その他、雌において無機リン、アルブミンおよび A/G 比に統計学的有意差がみられたが高用量群ではみられなかったことから投与の影響とは考えられなかった。

(申請者注) AST が雄の 30ppm 群でも有意に増加した。本試験では後述する病理組織学的検査において 300ppm 以上の投与群の肝臓にびまん性肝細胞肥大／空胞化が観察され、2000ppm 群では肝細胞の単細胞壊死、食細胞色素沈着を伴っていた。これらの組織学的変化は肝細胞に深刻な障害が加わったことを示しており明らかに毒性影響であると判断できる。しかし、30ppm 群ではびまん性肝細胞肥大／空胞化は観察されなかった。このため、同群における検体投与の影響は生体の生理学的適応範囲にあった、すなわち肝細胞に組織学的変化をもたらすほど重度ではなく、毒性影響の範疇に入らない程度であった、と判断できる。したがって、30ppm は無毒性量 (NOEL) と考えた。

臓器重量； 投与期間終了時の全生存動物を対象として以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

肝臓、腎臓、精巣、卵巣、脾臓、脳、副腎、心臓

次表に統計学的有意差の認められた項目を示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

検査項目		投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		30	300	2000	30	300	2000
最終体重			↓ 91	↓ 83			↓ 88
副腎 (左)	対体重比			↑ 217			
副腎 (右)	対体重比			↑ 168			
腎臓 (左)	絶対重量			↓ 85			
腎臓 (右)	絶対重量			↓ 85			
脾臓	絶対重量					↑ 132	↑ 129
	対体重比			↑ 123		↑ 130	↑ 148
肝臓	絶対重量			↑ 178		↑ 127	↑ 195
	対体重比		↑ 122	↑ 213		↑ 124	↑ 221
精巣 (左)	対体重比			↑ 123			
精巣 (右)	対体重比			↑ 126			
卵巢 (左)	絶対重量						↓ 82
	対体重比				↑ 131		
卵巢 (右)	絶対重量						↓ 64
	対体重比				↑ 135		
心臓	絶対重量						↓ 80
	対体重比		↑ 125				
脳	絶対重量	↓ 96	↑ 104				
	対体重比		↑ 114	↑ 118			

↑ 検定 (両側) ↑↓, $p<0.05$; ↑↓, $p<0.01$; ↑↓, $p<0.001$

表中の数字は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

2000ppm 群の雌雄及び 300ppm 群の雌において肝臓の絶対重量および対体重比が増加し、300ppm 群の雄においても肝臓の対体重比が増加した。2000ppm 群の雄においては脾臓重量の対体重比が有意に増加し、雌では 2000 および 300ppm 群において脾臓の絶対重量および対体重比が有意に増加した。これらの臓器重量の変動は検体投与の影響と考えられ、病理組織学的検査において関連する所見が認められた。

2000ppm 群の雄において副腎の対体重比が増加した。

その他、雄における心臓、脳、精巣重量の対体重比ならびに雌における心臓、卵巢の絶対重量に有意差が認められたが、これらは 2000ppm 群の雌雄および 300ppm 群の雄にみられた体重減少の影響と考えられた。

(申請者注) 報告書には記載されていないが、2000 ppm 群の雄の腎臓の絶対重量の減少も体重減少の影響と考えられる。上記以外にも 30 あるいは 300 ppm 群の雌雄で一部の臓器重量に有意な変動がみられたが高用量群ではみられなかったことから投与の影響とは考えられなかった。

肉眼病理検査；全ての動物について剖検を行った。

最終計画殺動物において発生頻度に統計学的有意差の認められた肉眼病理検査所見を下表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

性 別		雄				雌			
投与量 (ppm)		0	30	300	2000	0	30	300	2000
臓器	所見/検査例数	9	12	8	12	11	12	12	12
肝臓	腫大	0	0	0	↑ 6	0	0	0	↑ 8
脾臓	腫大	0	0	1	↑ 5	0	0	0	↑ 5

Fisher の直接確率計算法 ↑↓, $p<0.05$; ↑↓, $p<0.01$ (申請者実施)

2000ppm 群の雌雄において肝臓の腫大および脾臓の腫大の発生頻度が統計学的に有意に増加した。

病理組織学的検査；肉眼的病理検査を実施した 0 および 2000ppm 群の雌雄動物およびその他の群の途中死亡切迫殺動物を対象として、以下の組織について病理標本を作製し、検鏡した。

全ての肉眼的異常部位、脳、下垂体、甲状腺および上皮小体、胸腺、気管、肺（主要気管支を含む）、心臓、大動脈、肝臓、胆嚢、脾臓、腎臓、副腎、膵臓、精巣/卵巣、子宮、精巣上体、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、リンパ節（下顎および腸間膜）、坐骨神経、胸骨（骨髄を含む）、眼（視神経を含む）

また、30 および 300ppm 群の雌雄動物を対象として、以下の組織について病理標本を作製し、検鏡した。

全ての肉眼的異常部位、肺、肝臓、腎臓、脾臓

最終計画殺動物において発生頻度に統計学的有意差の認められた病理組織学的所見とその程度を下表に示す。

性 別		雄				雌			
投与量 (ppm)		0	30	300	2000	0	30	300	2000
臓器	所見/検査例数	9	12	8	12	11	12	12	12
肝臓	白血球集簇	9	8	↓ 3	9	6	↑ 12	10	11
	程度 0	0	4	5	3	5	0	2	1
	1	8	8	3	1	6	12	10	0
	2	1	0	0	8	0	0	0	10
	3	0	0	0	0	0	0	0	1
	びまん性肝細胞肥大/空胞化	0	0	↑ 8	↑ 12	0	0	↑ 12	↑ 12
	程度 0	9	12	0	0	11	12	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	1	0
	2	0	0	1	0	0	0	3	0
	3	0	0	7	0	0	0	8	0
	4	0	0	0	7	0	0	0	7
	5	0	0	0	5	0	0	0	5
脾臓	白脾髄リンパ球過形成	0	0	1	↑ 9	0	0	0	↑ 8
	程度 0	9	12	7	3	11	12	12	4
	1	0	0	0	8	0	0	0	5
	2	0	0	1	1	0	0	0	3

Fisher の直接確率計算法 ↑↓, $p<0.05$; ↑↓, $p<0.01$ (申請者実施)

程度 0 = 検出せず, 程度 1 = 軽微, 程度 2 = 軽度, 程度 3 = 中等度, 程度 4 = 重度, 程度 5 = 極度

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

2000ppm および 300 ppm 群の雌雄において肝臓の肝細胞肥大および空胞化が有意に増加したが、その程度は 2000ppm 群においてより強く、白血球集簇の程度の増加、単一細胞性肝細胞壊死及び食細胞色素沈着を伴っていた（このうち、単一細胞性肝細胞壊死及び食細胞色素沈着は報告書中では 2000 ppm 群における肝臓の組織像の説明として文章で記載されているもので、個々の動物についてはとられていない）。オイルレッド O 染色により肝細胞の空胞は中性脂肪であることが判明した。この肝臓の所見は臓器重量、血液生化学的検査結果とも関連するものであった。

2000ppm 群の雌雄において脾臓の白脾髄リンパ球過形成が増加した。これに関連した臓器重量の増加も認められた。

（申請者注）肝細胞肥大／空胞化の肝小葉内の部位に関し、肝臓癌誘発のメカニズム試験において、1000ppm を 14 日間雄マウスに投与したところ肝細胞は小葉内でびまん性に肥大していた（資料 2-23）。また、組織写真を撮影したところ、肝細胞の肥大は小葉中心部でやや顕著の印象を受けたが、小葉全体に認められた。したがって、本試験における肝細胞肥大／空胞化もびまん性に生じていたと推察される。本変化が重度となった 2000ppm 群雌雄には単一細胞性肝細胞壊死を伴っていたが、これは資料 2-32 で示すように肝において薬物代謝酵素活性亢進と脂質過酸化 (LPO, malone dialdehyde 法) の上昇がみられ、肝細胞への酸化ストレスが増加したことと一致していた。

以上の結果、300ppm 以上の用量において肝臓の酵素活性の増加、臓器重量の増加、肝細胞肥大／空胞化が認められ、本検体の標的臓器は肝臓であると判断される。また、無毒性量 (NOAEL) は 30ppm (雄 4.6 mg/kg/日、雌 6.5 mg/kg/日) と判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

③イヌを用いた飼料混入投与による反復経口投与毒性試験

(資料 2-7)

試験機関：Hazleton UK

[GLP 対応]

報告書作成年：1991 年

検体純度：

供試動物： ビーグル犬 (1 群雌雄各 5 匹)

試験開始時 4～6 カ月齢，体重範囲 雄，5.50～8.15 kg；雌，5.20～8.25 kg

投与期間： 13 週間 (1989 年 9 月 18 日～1989 年 12 月 21 日)

投与方法： 検体を 0，60，600 または 6000ppm の濃度で粉末飼料に混入し，各動物に 1 日 1 回 400 g を 13 週間摂食させた。飼料調製は毎週行なった。

用量設定根拠：

観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡率；

試験期間中，動物の一般状態と生死について毎日，さらに週 1 回は詳細な観察を行ない，異常の有無を記録した。

投与群では消瘦と被毛の汚れが観察された。被毛の汚れは高用量群の雌 2 例では第 7 週から試験終了時まで認められた。

(申請者注) 消瘦については原文に用量群，性別等の記載なし。

体重； 各動物の体重を，試験期間中毎週 1 回測定した。
以下に体重推移を図示し体重増加量を表 1 に示す。

体重変化

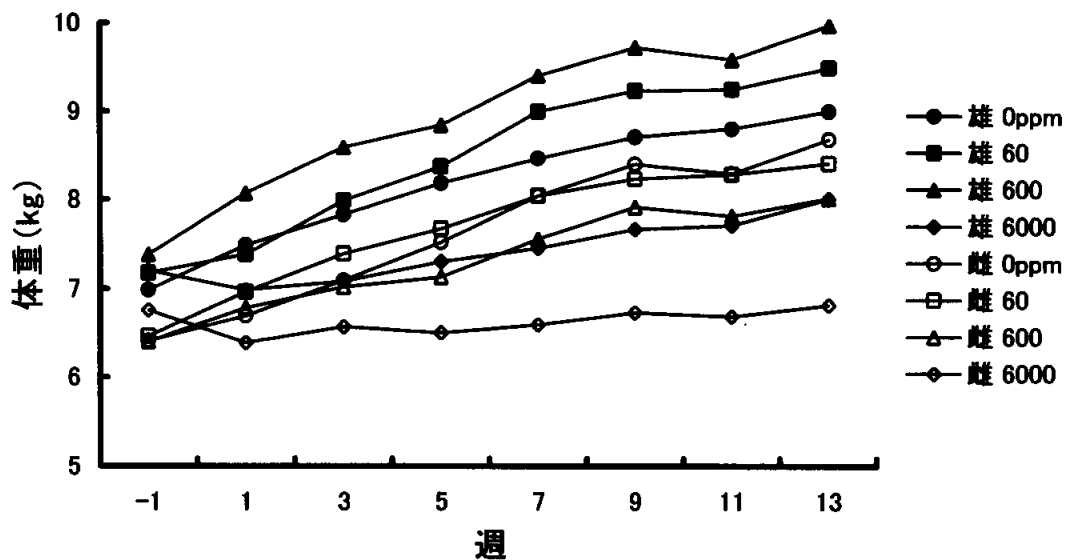


表1. イヌの体重増加量

用量群 (ppm) と性	体重増加量 (kg) (期間, 週) :				
	-1-4	-1-8	-1-13	4-8	8-13
0 雄	0.93	1.64	2.01	0.71	0.37
60 雄	1.10	1.95	2.31	0.85	0.36
600 雄	1.41↑	2.24	2.58	0.83	0.34
6000 雄	-0.08↓	0.36↓	0.80↓	0.44	0.44
0 雌	1.05	1.80	2.26	0.75	0.46
60 雌	1.11	1.68	1.94	0.57	0.26
600 雌	0.65	1.40	1.61	0.75	0.21
6000 雌	-0.35↓	-0.08↓	0.05↓	0.27↓	0.13

分散分析及びDunnett検定：↑↓, $p < 0.05$; ↑↓, $p < 0.01$; ↑↓, $p < 0.001$

6000ppm 群の雌雄の投与期間中における体重増加量は対照群に比し有意に少なかった（13週間の体重増加量は雄で 800 g, 雌で 50 g）。

600ppm 群の雌でも体重増加量がわずかに減少したが、対照群との間で統計学的有意差は認められなかった。60ppm 群では、体重増加量は対照群と比較して同程度ないし多かった。

摂餌量； 各動物の摂餌量を毎日測定し、週ごとの摂餌量を算出した。給餌量は1日 400 gであった。各期間の摂餌量の変化を表2に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表 2. イヌの摂餌量

用 量 群 (ppm)と性	摂餌量 (期間, 週) :				
	1 - 4	1 - 8	1 - 13	5 - 8	9 - 13
60 雄	102	103	103	103	103
600 雄	106	106	106	105	106
6000 雄	77↓	81↓	86↓	85↓	94
60 雌	98	96	95	94	93
600 雌	81↓	84	86↓	87	88
6000 雌	63↓	66↓	69↓	69↓	74↓

分散分析およびDunnett検定：↑↓, $p < 0.05$; ↑↓, $p < 0.01$; ↑↓, $p < 0.001$
 表中の数値は対照群の値に対する変動率(%)

6000ppm 群の雌雄の摂餌量は統計学的に有意に少なかった。

600ppm 群の雌でもわずかに少なく、統計学的有意差が認められた期間もあったが、この群では投与開始前でも対照群より少なかった。

検体摂取量；(申請者計算)

申請者が計算した平均検体摂取量を表 3 に示す。

表 3. 平均検体摂取量

用量群 (ppm)	平均検体摂取量(mg/kg/日)	
	雄	雌
60	2.38	2.47
600	23.1	23.4
6000	229	212

眼検査； 投与開始前と第 13 週に、各動物の眼を直像または倒像検眼鏡を用いて検査した。

第 13 週に、6000ppm 群のすべての動物に水晶体の変性（白内障）が認められ、検体の影響と考えられた。

血液学的検査；投与開始前、第 6 週及び第 13 週に、約 18 時間絶食させた各動物の頸静脈から血液を採取して、以下の項目について検査した。

血色素量、メトヘモグロビン、ヘマトクリット値、赤血球数、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、平均赤血球容積、白血球数、白血球ディファレンシャルカウント、血小板数、網赤血球数(赤血球に対する%)、網赤血球数(絶対値)、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間

対照群と比べて統計学的有意差がみられた変化を表 4 に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表 4. 血液学的検査成績

検査項目と性	第 6 週			第 13 週		
	用量群 (ppm)			用量群 (ppm)		
	60	600	6000	60	600	6000
血色素量 雄	93	101	103	93	104	88↓
雌	101	103	102	98	98	86↓
赤血球数 雄	95	104	105	90↓	104	89↓
雌	102	103	105	98	97	88↓
ヘマトクリット値 雄	95	101	104	93	103	90↓
雌	101	102	103	98	97	88↓
網赤血球数 雄	78	133	89	100	142	133↑DR
(%) 雌	80	80	80	115	100	131
血小板数 雄	96	123	164↑	103	121	172↑
雌	107	94	120	97	96	99
PT 雄	101	99	105	103	99	108↑
雌	100	101	120	101	103	124↑
APTT 雄	93	92	98	97	92	93
雌	104	99	81↓DR	106	99	84↓
白血球数 雄	113	118	161↑	94	100	151↑
雌	81	85	107	99	98	121
好中球数 雄	123	100	180↑DR	93	93	153
雌	76	79↓	109	109	95	124

分散分析及び Dunnett 検定, または Wilcoxon 検定: ↑↓, $p < 0.05$, ↑↓, $p < 0.01$

DR: 回帰分析または Terpstra-Jonckheere の傾向検定, ↑↓, $p < 0.05$

PT: プロトロンビン時間; APTT: 活性化部分トロンボプラスチン時間

表中の数値は対照群の値に対する変動率(%)

6000ppm 群の雌雄で, 第 13 週に血色素量, 赤血球数及びヘマトクリット値が有意に減少した。6000ppm 群と 600ppm 群の雄の網赤血球数の比率が第 13 週に増加した (有意な用量との関連性あり)。同時期, 6000 ppm 群の雌でも, 統計学的有意差はないものの, 網赤血球数の増加傾向がみられた。また, 6000 ppm 群の雄で, 第 6 及び 13 週に血小板数と白血球数が有意に増加した。両検査時期には好中球数も有意に (あるいは有意な用量との関連性を示して) 増加したが, 好中球の比率には変化はみられなかった。さらに, 6000 ppm 群の雌で, 第 6 及び 13 週に活性化部分トロンボプラスチン時間が有意に (あるいは有意な用量との関連性を示して) 短縮した。第 13 週には, 同群の雄でも, 統計学的有意差はないものの, 活性化部分トロンボプラスチン時間の短縮傾向がみられた。600 ppm 群の雄でも同様の傾向がみられたが, この差は投与開始前から認められていた。

(申請者注) 網赤血球数の増加傾向のうち, 600ppm 群の雄の変化については, 他の赤血球関連値の変化を伴っていなかったことから偶発的な変化と考えた。血小板数と白血球数の増加については, 骨髓像検査並びに病理組織学的検査に対応する異常が観察されず, また, 雌に異常を認めなかったところから, 毒性学的意義はないと判断した。活性化部分トロンボプラスチン時間の延長は毒性とみなされるものの, 短縮については明らかな毒性とは考えなかった。

(申請者注) 上記以外に, 6000 ppm 群の雌雄で第 13 週にプロトロンビン時間が有意に延長したが, 雄の変動は軽微であり, 雌では投与開始前から同様の傾向がみられていた (対照群の 125%) ため, 毒性学的に意義のある変化とは考えなかった。雌雄の投与群でみられたその他の有意な変動は用量との関連性がないことから, 検体投与の影響とは判断しなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。
 骨髓像検査；剖検時に骨髓の塗抹標本を作製して骨髓像を検査した。
 投与に関連する変化は認められなかった。

血液生化学的検査；投与開始前，第6週及び第13週に，血液学的検査で使用した血液から得られた血漿を用いて，以下の項目について検査した。

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ)，アラニンアミノトランスフェラーゼ(グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ)，アルカリホスファターゼ，クレアチンホスホキナーゼ， γ -グルタミルトランスフェラーゼ，ナトリウム，カリウム，塩素，カルシウム，無機リン，ブドウ糖，尿素，総ビリルビン，クレアチニン，総蛋白，アルブミン，アルブミン/グロブリン比，総コレステロール

対照群と比べて統計学的有意差がみられたか，統計学的には有意でないものの明らかな変化がみられたものを表5に示す。

表5. 血液生化学的検査成績

検査項目と性		第6週			第13週		
		用量群 (ppm)			用量群 (ppm)		
		60	600	6000	60	600	6000
アスパラギン酸 アミノトランスフェラーゼ	雄	100	105	130	106	109	176 $\uparrow$
	雌	98	88	119	113	90	146 $\uparrow$
アルカリホスファターゼ	雄	93	107	1526 $\uparrow$	641	129	2584 $\uparrow$
	雌	119	113	2040 $\uparrow$	115	107	3158 $\uparrow$
クレアチン ホスホキナーゼ	雄	89	96	110	123	121	158 $\uparrow$ DR
	雌	83	49	84	114	75	106
γ -グルタミル トランスフェラーゼ	雄	67	100	200 $\uparrow$	120	100	220 $\uparrow$
	雌	83	83	133 $\uparrow$ DR	80	60	160
カリウム	雄	105	105	110 $\uparrow$	102	102	105
	雌	98	100	102	98	102	107
無機リン	雄	105	111	100	100	105	105
	雌	95	100	89	89	79 $\downarrow$	100
ブドウ糖	雄	100	102	93	100	110	94
	雌	96	98	93	98	96	87 $\downarrow$
尿素	雄	100	104	81	92	113	85
	雌	123	113	85	114	109	84
総ビリルビン	雄	85	80	80 $\downarrow$ DR	100	95	125
	雌	75	79	75	119	95	133
総蛋白	雄	102	100	104	100	105	107 $\uparrow$ DR
	雌	93	93	98	93	95	97
アルブミン	雄	100	100	87 $\downarrow$	100	103	86 $\downarrow$
	雌	100	97	81 $\downarrow$	94	94	75 $\downarrow$
アルブミン /グロブリン比	雄	93	100	71 $\downarrow$	100	100	64 $\downarrow$
	雌	114	107	64 $\downarrow$	100	100	58 $\downarrow$

分散分析及びDunnett検定，またはWilcoxon検定： $\uparrow\downarrow$ ， $p < 0.05$ ；

$\uparrow\downarrow$ ， $p < 0.01$ ， $\uparrow\downarrow$ ； $p < 0.001$

DR：回帰分析またはTerpstra-Jonckheereの傾向検定， $\uparrow\downarrow$ ， $p < 0.05$

表中の数値は対照群の値に対する変動率(%)

6000ppm群の雌雄で，第6週及び13週ともアルカリホスファターゼと γ -グルタミルトランスフェラーゼが著しく増加し，多くは統計学的にも有意であった。また，雌雄で第13週にアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼも有意に増加した。雌雄では第6週及び13週に尿素，アル

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

ブミン及びアルブミン/グロブリン比が減少し、アルブミン及びアルブミン/グロブリン比には有意差がみられた。雌で第13週にブドウ糖が有意に減少した。

(申請者注) アルカリホスファターゼの増加について、後述する病理組織学的検査で肝細胞肥大が観察されたが、その部位は主として小葉周辺性であった。したがって、アルカリホスファターゼの増加は小葉周辺性肝細胞への検体投与の影響と判断される。

6000ppm群の雄で第6週にカリウムが有意に増加したが、第13週には対照群との差はみられず、また、雌では両検査時とも異常がなかったところから毒性学的意義はないと判断した。6000ppm群の雄で第13週にクレアチンホスホキナーゼおよび総蛋白が(有意な用量との関連性を示して)増加したが、これらの項目の無処置動物における変動幅を考慮すると今回みとめられた増加は顕著であるとはいえず、また、第6週あるいは雌では異常がなかったことからいずれも偶発的变化と判断した。6000および600ppm群の雄では第6週に総ビリルビンが(有意な用量との関連性を示して)減少したが、この傾向は投与開始前から認められていた。600ppm群の雌では第13週に無機リンが低下したが、高用量群ではみられなかったところから検体投与の影響とは判断しなかった。

尿検査： 投与開始前、第6週及び第13週に、各動物の膀胱へ直接カテーテルを挿入して尿を採取し、以下の項目について検査した。

外観(濁度および色調)、比重、pH、蛋白、ブドウ糖、ケトン体、総ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン、還元物質(reducing substance)、沈渣

6000ppm群の雄3匹で第13週にビリルビンが検出された。

臓器重量： 試験終了時に、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(相対重量)を算出した。さらに、体重を共変量とした共分散分析の手法により、臓器重量を補正した(補正重量、g)。

副腎(両側)、脳、心臓、腎臓(両側)、肝臓、卵巣(両側)、脾臓、精巣および

精巣上体(両側)、甲状腺及び上皮小体(両側)

対照群と比べて統計学的有意差がみられたか、統計学的には有意でないものの明らかな変化がみられたものを表6に示す。

表6. 臓器重量

	絶対重量			相対重量			補正重量		
	用量群(ppm)			用量群(ppm)			用量群(ppm)		
臓器と性	60	600	6000	60	600	6000	60	600	6000
副腎 雄	101	111	112	94	100	127	99	108	115
	105	95	116	108	101	148	106	96	121
腎臓 雄	115	108	116	107	99	137	115	109	116
	85	81	100	88	89	127	86	85↓	111
脾臓 雄	83	70	99	75	61	113	85	73	96
	89	92	175	92	100	219	93	101	206△
肝臓 雄	105	110	113	98	100	127	96	97	126△
	91	87	99	95	94	125	94	92	114
甲状腺 雄	102	145	109	93	131	125	91	128	125
	104	113	120	105	122	150	109	123	146△
精巣 雄	111	121	112	105	111	127	101	107	126

共分散分析及びDunnett検定(補正重量についてのみ実施)；△↓、 $p < 0.05$ ；△↑、 $p < 0.001$
表中の数値は対照群の値に対する変動率(%)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

6000ppm 群では、雌雄で肝臓の相対重量が増加し、雄では補正重量の差が統計学的に有意であった。雌で脾臓の絶対及び相対重量が増加し、補正重量の差は統計学的に有意であった。雌では甲状腺の相対重量も増加し、補正重量の差は統計学的に有意であった。その他、雌雄の副腎および腎臓と雄の精巣の絶対あるいは相対重量に増加がみられたが、補正重量には有意差はみられなかった。

(申請者注) 6000ppm 群で有意に重量が変化した臓器のうち、甲状腺については病理組織学的変化を伴わず、また、雄に異常を認めなかったところから、検体投与による影響とは考えなかった。600ppm 群の雌で腎臓の補正重量が有意に減少したが、高用量群ではみられなかったところから検体投与の影響とは判断しなかった。

肉眼病理学的検査；試験終了時に、全動物を剖検して所見を記録した。

6000ppm 群で、投与に関連する変化として眼の退色部位（雄 1 例、雌 2 例）と肝臓の退色および斑紋（共に雄 2 例、雌 2 例）が認められた。

病理組織学的検査；試験終了時に剖検した各動物の以下の臓器および組織について、病理組織学的に検査して所見を記録した。

副腎(両側)、大動脈(弓及び前腹部)、脳(脳幹を含む)、盲腸、結腸、十二指腸、眼(両側、視神経を含む)、心臓、回腸、空腸、腎臓(両側)、肝臓、肺(主要気管支を含む)、リンパ節(下顎及び腸間膜)、食道、卵巣(両側)、脾臓、下垂体、直腸、唾液腺(下顎及び舌下)、坐骨神経、脾臓、胸骨(骨髄を含む)、胃(噴門部、胃底部、幽門部)、精巣(両側)、甲状腺および上皮小体(両側)、胸腺、膀胱、子宮(体部及び頸部)、すべての肉眼的異常部位
主な病変発生頻度を表 7 に示す。

表 7. 病理組織学的所見

性	雄				雌			
所見/用量群 (ppm)	0	60	600	6000	0	60	600	6000
検査例数	5	5	5	5	5	5	5	5
肝臓								
肝細胞肥大 (小葉周辺性)	0	0	0	↑5	0	0	0	↑5
脾臓								
残留血液	2	3	3	5	3	3	4	5
髄外造血亢進	0	0	0	↑5	0	0	0	↑5
腎臓								
色素沈着	0	0	0	2	0	0	0	↑4
尿細管上皮空胞化	0	0	0	0	1	2	2	4
胸腺								
退縮	0	1	1	3	0	0	0	0
眼								
水晶体変性	0	0	0	↑5	0	0	0	↑5

統計学的有意差：↑, $p < 0.05$, ↑ $p < 0.01$ (Fisher の直接確率計算法, 申請者実施)

6000ppm 群で、投与に関連した変化として眼の水晶体の変性(水晶体線維の腫脹及び膨化)、肝臓の肝細胞肥大(小葉周辺性)及び脾臓の髄外造血亢進が雌雄の全動物に認められた。

この他、6000 ppm 群の雌雄で脾臓に放血不十分に起因する残留血液の増加傾向がみられた。腎臓の色素沈着が雌雄ともに増加(雌では有意差あり)し、雌では腎臓の尿細管上皮空胞化にも

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

増加傾向が認められたが、これらはいずれも軽微あるいは軽度であり腎臓に対する直接的な毒性を示すものではないと考えた。雄では胸腺の退縮に増加傾向がみられたが、ストレスに関連した非特異的所見と考えられた。

(申請者注) 眼の水晶体変性(白内障)の原因は明らかでないが、イヌはヒトに比し眼の GSH reductase が 3%¹⁾、ビタミン C 含量が 16%²⁾しかないところから種々の原因による酸化ストレスに極めて脆弱であると推察される。このことが、本検体の種々の試験でイヌのみに白内障が生じた原因と考えられる。一方、カニクイサルで試験したところ、摂餌量低下のない最大量を投与しても白内障は認められず、ヒトへの白内障発症のリスクは極めて低いと判断できる(資料 2-19 参照)。脾臓の残留血液は放血不十分の際にしばしば観察される変化で本試験では対照群を含め多く発生したが、イヌの慢性毒性試験では対照群、30, 300, 3000ppm 群において、雄; 1, 0, 0, 0, 雌; 1, 1, 1, 0 の頻度で、特に投与群に好発することはなく、本変化が偶発的であることを示していた(資料 2-10 参照)。また、髄外造血亢進はこれらの動物で見られた軽度の貧血に対応する変化と推察する。

参考文献

- 1) Rathbun, W.B., Bovis, M.G., and Holleschau, A.M.: Species survey of glutathione peroxidase and glutathione reductase: Search for an animal model of the human lens. *Ophthalmic Res.*, 18; 282-287, 1986.
- 2) Varma, S.D. and Richards, R.D.: Ascorbic acid and the eye lens. *Ophthalmic Res.*, 20; 164-173, 1988.

以上、本検体をイヌに13週間飼料混入投与した場合、6000ppmの用量で体重増加量及び摂餌量の顕著な減少、軽度の貧血と脾臓の重量増加及び髄外造血亢進、肝機能関連血液生化学的検査項目の変化と肝臓の重量増加、退色・斑紋及び肝細胞肥大、さらに眼の水晶体の変性が認められた。その他の変化は、いずれも投与によって二次的に引き起こされたものと考えられた。60 及び 600ppm の用量では、検体投与に関連する生物学的に意義のある変化は認められなかった。

したがって、本試験条件下における無毒性量 (NOAEL) は雌雄とも 600ppm (雄 23.1 mg/kg/日, 雌 23.4 mg/kg/日) であると判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

VIII.1.6. 反復経口投与神経毒性

①ラットを用いた 28 日間反復経口投与神経毒性試験

(資料 2-8)

試験機関：Huntingdon Life Sciences Ltd. (英国)

[GLP 対応]

報告書作成年：2002 年

検体純度：

供試動物： Crl: CD(SD)系 IGS BR ラット, 1 群雌雄各 10 匹, 投与開始時 42 日齢以上,
投与開始時の体重範囲 雄 ; 198~248 g, 雌 ; 147~188 g

投与期間：28 日間 (2002 年 1 月 14 日~2002 年 2 月 14 日)

投与方法：検体を 0, 50, 170 及び 500ppm の用量で飼料に混合し, 28 日間にわたって随時摂食させた。検体を
混入した飼料は毎週調製した。

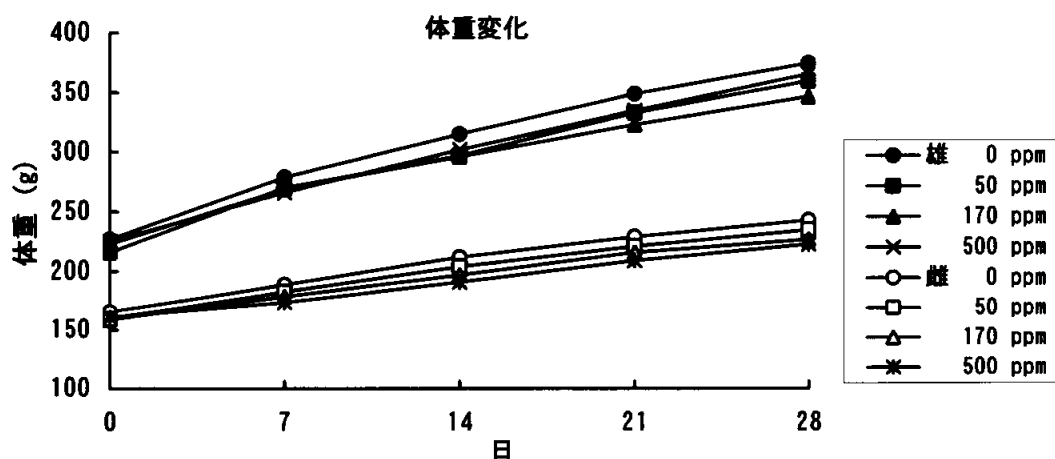
用量設定根拠：

観察・検査項目及び結果：

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

検体投与に関連した異常は認められず, 途中死亡もなかった。

体重変化；投与 1 日前及び投与後は週 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,
体重増加量を次表に示す。



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

群平均体重増加量 (g)									
性 別		雄				雌			
投与量 (ppm)		0	50	170	500	0	50	170	500
投 与 週	0 - 1	51	53	46	↓ 41	22	22	20	↓ 13
	1 - 4	96	90	↓ 78	100	54	53	48	49
	0 - 4	147	144	124	141	77	75	68	62

Dunnett 検定 (両側) ↓, $p < 0.05$

体重に投与に関連した影響は認められなかった。

500ppm 群の雌雄において投与第 1 週, 170ppm 群の雄において投与第 1~4 週の体重増加量が対照群と比較して統計学的に有意に低下した。170ppm 群の雌および 50ppm 群の雌雄では検体投与の影響はみられなかった。

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。

170ppm 及び 500ppm 群において投与第 1 週の摂餌量がわずかに減少したが, 統計学的有意差は認められなかった (Dunnett 検定, 申請者実施)。50ppm 群では雌雄とも検体投与の影響は認められなかった。

食餌効率は 500ppm 群及び 170ppm 群の雄または雌でわずかな減少がみられた。

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)		50	170	500
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	4.84	15.69	47.08
	雌	5.10	17.62	49.82

詳細な状態の観察; 投与開始前及び投与期間中は毎週, 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。

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

観察台 (3 分間) (覚醒, 歩行, 身づくろい, 活動数, 立ち上がり回数, 姿勢, 振戦, 筋攣縮, 痙攣, 眼瞼閉鎖, 糞, 尿)

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。

いずれの項目においても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期間中は毎週, 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(驚愕反応), 痛覚反応(テイルピンチ), 正向反射, 体温, 接地開脚幅, 握力 (前肢及び後肢), 瞳孔径)

投与開始前及び投与第 4 週に, 全動物を対象として運動量 (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。

いずれの項目についても検体投与の影響は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。
脳重量；投与終了時に全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；投与終了時に全動物の脳半球の大きさ（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；投与終了時に全動物を対象として肉眼的病理検査を行った。

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（500ppm）群の各性5匹の動物を対象として、以下の病理標本を作製し、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ヵ所、中脳、橋、小脳、延髄)
- ・脊髓(頸部膨大部、腰部膨大部)
- ・末梢神経系(背側根神経節(頸部及び腰部)、背側根神経(頸部及び腰部)、腹部根神経(頸部及び腰部)、坐骨神経(坐骨ノッチ部及び腿中部)、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、ヘマトキシリンエオジン染色した。

検体投与に関連する所見は観察されなかった。

以上のとおり、本剤のラットに対する28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、500ppm群では体重増加量の低下、摂餌量および食餌効率の低下が認められ、170ppm群の雌雄に摂餌量の低下が、雄では体重増加量の減少が認められた。神経病理学的所見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、本剤の神経毒性に関する無毒性量は500ppm（雄：47.08 mg/kg/日、雌：49.82 mg/kg/日）であり、全身毒性の無毒性量は50ppm（雄：4.84 mg/kg/日、雌：5.10 mg/kg/日）であると判断される。

(申請者注)：Fischer 344 ラットの90日反復経口投与毒性試験(0, 30, 100, 300, 1000, 3000ppm；資料2-5)では、体重への影響は雌雄の3000ppmおよび雄の1000ppm群にみられたが、雌の1000ppm群並びに300ppm以下の雌雄には認められなかった。しかし、雄の肝臓に肝細胞脂肪化が観察されたところから、無毒性量は100ppm（雄：6.40 mg/kg/日、雌：7.19 mg/kg/日）と判定された。一方、本試験のCD系ラットでは170ppm群においても雄で試験期間初期に体重増加量が低下したため、上記のごとく無毒性量は前述のFischer 344ラットより低い50ppm（雄：4.84 mg/kg/日、雌：5.10 mg/kg/日）と判断された。また、本試験と同様のCD系ラット、Crj:CD(SD) [IGS]ラットを用いた繁殖試験では、1000ppm群において雌親動物の育成期間中に摂餌量低下を伴う有意な体重増加抑制が観察された(資料2-13)。これらの成績から判断すると、本検体に対する感受性はCD系ラットがFischer 344ラットに比しやや高いと推察される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

②反復経口神経毒性試験省略理由書

1. ラットの28日間反復投与経口神経毒性試験における詳細な状態の観察、機能検査、病理組織学的検査等について（資料2-8、抄録Ⅷ-48～50）

毎日2回の観察の他に、詳細な観察を神経行動学的スクリーニング検査の一部として週1回行った。ハンドリング観察として、ケージからの取り出しやすさ、流涎、流涙、眼球突出、立毛、被毛、発声およびハンドリングに対する反応を評価した。また、観察台での観察として、覚醒、歩行、みづくろい、活動数、立ち上がり回数、姿勢、振戦、筋攣縮、痙攣、眼瞼閉鎖、排糞数及び尿量を評価した。感覚反応として、接近反応、触覚反応、聴覚反応、痛覚反応、正向反射、体温、接地開脚幅、握力および瞳孔径を測定し、さらに運動量も測定した。

病理組織学的検査として、各臓器を詳細観察するとともに、脳重量及び大きさの測定及び神経に関連する組織を固定観察した。

いずれの試験結果からも、神経毒性を示唆する影響は認められなかった。

2. その他の試験で致死量以下の用量で特異的な神経毒性を示唆する所見について（資料2-5、2-9及び2-11、抄録Ⅷ-22、52及び81）

ラットの90日間反復経口投与毒性試験、2年間慢性毒性試験および発がん性試験における一般症状観察で、神経毒性を示唆する影響は認められなかった。

3. 既知神経毒性物質との化学構造の相関

現在の科学的知見において、本農薬メトコナゾールは既知神経毒性物質との化学構造相関はない。

以上の結果から、メトコナゾールの反復経口神経毒性試験は省略可能と判断致します。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

VIII.1.7. 反復経口投与毒性及び発がん性

1) 2年間反復経口投与毒性試験

①ラットを用いた飼料混入投与による2年間慢性毒性試験

(資料 2-9)

試験機関：Sittingbourne Research Centre

[GLP 対応]

報告書作成年：1992 年

検体の純度：

供試動物： Fischer 系ラット、投与開始時約 6～8 週齢
主群（2 年間投与群）；1 群雌雄各 20 匹（ただし対照群は雌雄各 40 匹）
衛星群（1 年間投与群）；1 群雌雄各 10 匹（ただし対照群は雌雄各 20 匹）

投与期間： 1989 年 5 月 30 日－1991 年 6 月 21 日

投与方法： 検体をアセトンにて溶解し、0、10、100、300、1000ppm の濃度で飼料に混入し、2 年間にわたって摂食させた。

投与用量設定根拠；

試験項目及び結果：

一般状態及び死亡率；主群及び衛星群の全動物について、一般状態および死亡・瀕死動物の有無を毎日観察した。

検体投与に関連した臨床症状は認められなかった。

主群の最終剖検時（107－108 週）の死亡率を表 1 に示す。

表 1. 死亡率

投与量 (ppm)		0	10	100	300	1000
死亡率 (%)	雄	63	55	55	50	↓ 30
	雌	35	45	40	45	25

Fisher の直接確率計算法 ↓, $p < 0.05$ 。

検体投与による死亡率の増加は認められなかった。

体重変化； 投与開始後 13 週間は毎週 1 回、以降は 4 週間に 1 回の頻度で体重を測定した。
1000ppm 群の雄において投与開始後 13 週までの体重増加量が 16%減少し、試験期間を通じた体重増加量では約 10%減少した。雌では試験初期には明らかな体重増加量の減少は認められず、試験期間を通じては 6%程度の体重増加量の減少が認められた。
300ppm 以下の投与群に異常はなかった。
以下に体重推移を図示し、体重増加量を表 2. に示す。

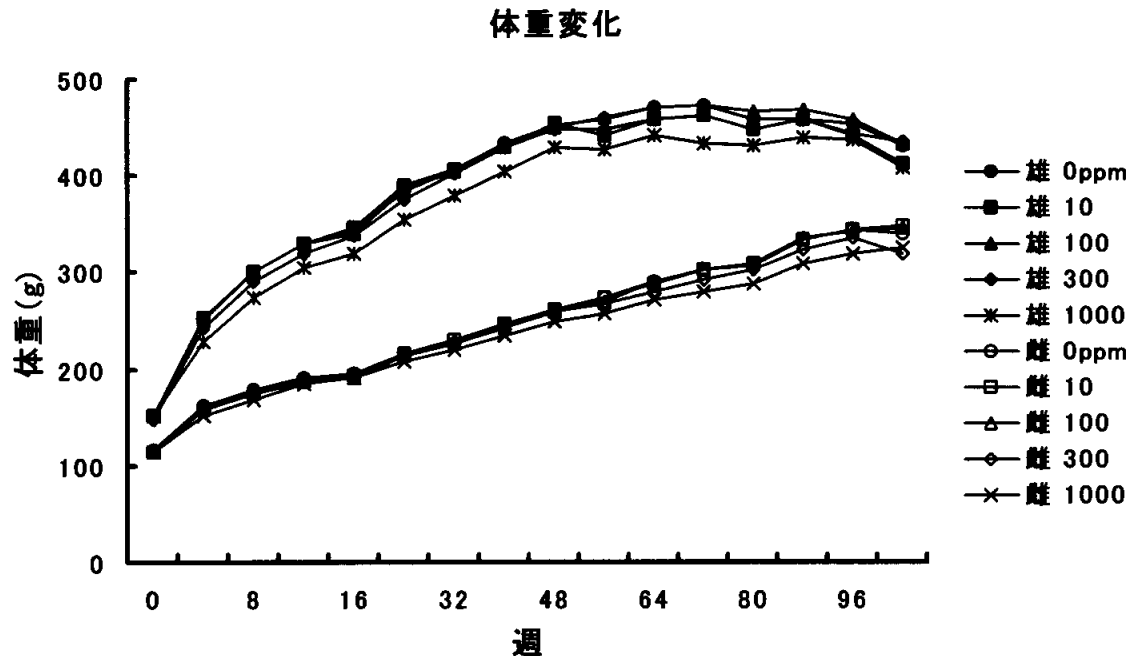


表 2. 体重増加量

投与量 (ppm)	雄				雌			
	10	100	300	1000	10	100	300	1000
0-13 週の増加	101	100	97	84	97	101	99	96
13-104 週の増加	81	101	113	102	108	106	88	94
0-80 週の増加	97	102	98	90	101	102	97	91
0-104 週の増加	94	100	103	91	104	104	91	94

表中の数字は対照群に対する百分率。

摂餌量； 投与開始から 13 週間は週 1 回、その後は 4 週間に 1 回、全動物の摂餌量を測定した。平均摂餌量を表 3 に示す。

表 3. 平均摂餌量

投与量 (ppm)	雄				雌			
	10	100	300	1000	10	100	300	1000
0-13 週	100	99	97	91	99	99	100	95
16-104 週	98	99	98	95	99	99	99	97
1-104 週	102	102	98	93	99	100	100	97

表中の数字は対照群に対する百分率。

1000ppm 群の雌雄で特に投与開始後 13 週間の摂餌量がわずかに減少し、検体投与の影響と判断した。300ppm 以下の投与群に異常はなかった。

検体摂取量； 投与期間中の平均検体摂取量を表 4 に示す。

表 4. 検体摂取量

投与量 (ppm)		10	100	300	1000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	0.44	4.29	13.08	43.95
	雌	0.52	5.27	15.98	53.84

眼検査； 眼窩静脈叢からの採血の繰り返しにより眼検査成績の正確性が損なわれる可能性があったため、眼検査は補完的に行った 2 年間発癌性試験において実施した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。
血液学的検査；投与 13, 26, 51, 77, 104 週時に主群の全ての生存動物を一晚絶食させた後、0₂/CO₂ 麻酔下で眼窩静脈叢より採血した。ただし 104 週時には絶食、麻酔後、剖検時に心臓穿刺により採血した。以下の項目を検査した。

赤血球数、血色素量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、血小板数、プレートレットクリット、平均血小板容積、赤血球容積分布幅、血小板容積分布幅、平均赤血球径、白血球数、ディファレンシャルカウント

また、衛星群の剖検時(52 週時)に心臓血を用いて血液凝固試験を実施した。

統計学的に有意差の認められた項目を表 5. に示す。

表 5. 血液学的検査成績

検査項目	検査週	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		10	100	300	1000	10	100	300	1000
白血球数	26				↓ 93				↑112
血色素量	13								↓ 98
	26								↓ 98
	51								↓ 99
平均赤血球容積	13				↑101		↑101	↑101	↑101
	26						↑101	↑101	↑101
	51						↑101	↑101	↑101
	77				↓ 97				
	104				↓ 95				
平均赤血球血色素量	13						↑101 ^d		
	26				↓ 99				↓ 99
	51	↑102 ^d			↓ 98 ^d		↑102 ^d		
	77				↓ 96				↓ 98
	104				↓ 94				
平均赤血球血色素濃度	13								↓ 98
	26	↓ 99 ^d							↓ 98
	51				↓ 99				
	104				↓ 98				↓ 99
赤血球容積分布幅	13				↓ 96				
	26								↓ 98
	77				↓ 95				
血小板数	13		↑102 ^w	↓ 97 ^w	↓ 91 ^w				↓ 86
血小板容積分布幅	26							↓ 96 ^d	
	104								↑105
平均血小板容積	13							↓ 99	↓ 98
	26								↓ 99
プレートレットクリット	13		↑101 ^w	↓ 96 ^w	↓ 90 ^w				↓ 85
	26				↓ 90 ^d				
多形核白血球 (実数)	26								↑144
	77								↑127 ^w
非分葉多形核白血球 (百分率) ^a	13	(↑0.1 ^w)	(↑0.1 ^w)	(0.0)	(↑0.1 ^w)				
	26					(↑0.2 ^w)	(0.1)	(0.2)	(0.1)
非分葉多形核白血球 (実数) ^a	13	(↑0.0 ^w)	(↑0.0 ^w)	(0.0)	(↑0.0 ^w)				
	26					(↑0.0 ^w)	(0.0)	(0.0)	(0.0)

表中の数字は対照群に対する百分率。ただし^aを添付した項目の()内数値は対照群の値が 0.0 だったため実測値を記載、単位は% (百分率) と 10⁹/L (実数)。

Williams 多重比較法, ↑↓, p<0.05; ↑↓, p<0.01。

^dは Dunnett の多重比較法, ↑↓, p<0.05; ↑↓, p<0.01。

^wは Wilcoxon 検定法, ↑↓, p<0.05; ↑↓, p<0.01。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表 5. 血液学的検査成績 (続き)

検査項目	検査週	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		10	100	300	1000	10	100	300	1000
好酸球 (百分率)	51								↓ 36
	104								↓ 37 ^{*)}
好酸球 (実数)	51								↓ 0
	104								↓ 0 ^{*)}
単球 (百分率)	77								↑129
	104								↑141 ^{*)}
単球 (実数)	77								↑167
	104								↑150 ^{*)}
平均赤血球径	13								↓ 98
	51				↓ 98				↓ 98
	77								↓ 98
赤血球径標準偏差	13								↑100
	26								↑120
	51				↑100				
	104								↑120
プロトポリン時間	52 ^{s)}				↑102				
活性化部分トロンボプラスチン時間	52 ^{s)}				↓ 91				

^{s)} は衛星群のデータ。

Williams 多重比較法, ↑↓, $p < 0.05$; ↑↓, $p < 0.01$ 。

^{*)} は Wilcoxon 検定法, ↑↓, $p < 0.05$; ↑↓, $p < 0.01$ 。

1000ppm 群雌で血色素量が有意に減少したが、その程度はわずかであるため毒性学的意義のないものと判断した。赤血球関連計算値のいくつか (平均赤血球容積, 平均赤血球血色素量, 平均赤血球血色素濃度, 赤血球容積分布幅) にわずかではあるが有意な差が観察されたが、1000ppm 群に認められた血色素量の軽度の減少を除き、これらは実測検査項目の変動を反映するものではなく、毒性学的意義のないものと判断した。1000ppm 群の雌雄で見られた 13 週時の血小板数のわずかな減少 (報告書では増加と記載されているが減少の誤り) と 1000ppm 群雌での試験後半の単球および好酸球のわずかな増減もまた生物学的意義は疑わしいと考えられた。血液塗抹標本で白血球像の形態異常は観察されず、検体投与に関連した白血病も認められなかった。

上記以外にも種々の項目が投与群で対照群に比し有意に変動したが、毒性学的に意義のある変化はなかった。

(申請者注) 他の変化について毒性学的に意義がないと判断した理由としては、投与期間あるいは用量との関連性を欠くことや生物学的に意味があるとは考え難い軽微な変化であることなどが挙げられる。

血液生化学的検査; 投与 13 週時を除く各検査時に、血液学的検査で使用した血液から得られた血漿を用い、以下の項目を測定した。

総蛋白, アルブミン, 尿素窒素, ビリルビン, カルシウム, 無機リン, 血糖, クレアチニン, アルカリホスファターゼ, アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ), アラニンアミノトランスフェラーゼ (グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ), γ -グルタミルトランスペプチダーゼ, コレステロール, トリグリセライド, ナトリウム, カリウム, 塩素

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

統計学的に有意差の認められた項目を表 6. に示す。

表 6. 血液生化学的検査成績

検査項目	検査週	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		10	100	300	1000	10	100	300	1000
アルカリホスファターゼ	26				↓ 77	↓ 111			
	51	↓ 91	↓ 97	↓ 90	↓ 73				
	77				↓ 83		↓ 88		
血糖	51				↓ 86				
コレステロール	26				↓ 69			↓ 89	↓ 92
	51				↓ 75				
	77				↓ 65				
	104								↑ 119*
トリグリセライド	26	↑ 121			↓ 39				↓ 70
	51				↓ 46				↓ 56
	77				↓ 57				↓ 70
ビリルビン	26				↓ 91		↓ 93	↓ 89	↓ 89
	51								↓ 90
	77				↓ 85				
蛋白	26							↓ 97	↓ 98
	51							↓ 97	↓ 97
	104				↑ 103*				
アルブミン	26							↓ 97	↓ 96
	51							↓ 97	↓ 97
	104				↑ 104				
アルブミン/グロブリン比	26	↓ 97 ^d							
	51				↑ 104				
	77			↑ 105	↑ 104				
カルシウム	26								↓ 97
	51								↓ 97
	77			↓ 97	↓ 98				
カリウム	77								↓ 91
アラニンアミノトランスフェラーゼ	26	↓ 86	↓ 86	↓ 86	↓ 89			↓ 74	↓ 73
	51							↓ 83	↓ 70
	77				↑ 124				↓ 82
γ-グルタミルトランスペプチダーゼ ^a	26	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(↑ 1.6)*				↑ 800*
	51			↓ 25*					↑ 280*
	77								↑ 450*
塩素	51						↑ 103 ^d		
クレアチニン	77				↓ 94	↓ 91 ^d			
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	77				↑ 113				↓ 85

表中の数字は対照群に対する百分率。ただし*を添付した項目の()内数値は対照群の値が 0.0 だったため実測値を記載、単位は I.U./L。

Williams 多重比較法, ↑↓, $p < 0.05$; ↑↓, $p < 0.01$ 。

^dは Dunnett の多重比較法, ↓, $p < 0.05$ 。

*は Wilcoxon 検定法, ↑↓, $p < 0.05$; ↑↓, $p < 0.01$ 。

300ppm 群雌と 1000ppm 群雌雄で、検体投与に関連した血液生化学的变化が観察された。1000ppm 群で、血漿コレステロール(雄)とトリグリセライド(雌雄)が 26~77 週時に減少した。1000ppm 群雌では 26 週時にコレステロールが低かったがその後は対照群と同じか対照群より高値を示

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

した。1000ppm 群雌のγ-グルタミルトランスぺプチダーゼが26～77 週時に上昇したが、同群雄では26 週時のみ上昇した。さらに、血漿蛋白とアルブミン値が、300 と1000ppm 群雌で26 と51 週時にごくわずかに低い値となったが、それ以降差はみられなかった。

1000ppm 群雌雄でビリルビンの減少、1000ppm 群雄でアルカリホスファターゼの減少、300ppm 群雌と1000ppm 群の雌雄でアラニンアミノトランスフェラーゼの減少がみられた。しかし、診断学的意味は明らかでないところから毒性ではないと判断した。

上記以外にも種々の項目が投与群で対照群に比し有意に変動したが、投与期間あるいは用量との関連性を欠くところから検体投与の影響とはしなかった。

尿検査： 血液学的検査と同時期に主群の各群雌雄 10 匹ずつから採取した尿について以下の項目を検査した。

pH, 尿量, 色, 濁度, 浸透圧, 蛋白質, ブドウ糖, ケトン体, ビリルビン及びウロビリノーゲン, また尿沈渣について顕微鏡による検査を行った。

検査結果は測定値（半定量的項目を含む）あるいはスコアで表した。

統計学的に有意差の認められた項目を表 7. に示す。

表 7. 尿検査成績

検査項目	検査週	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		10	100	300	1000	10	100	300	1000
尿細管上皮細胞 (A)	25						↑178 *		
	102								↓61 *
白血球 (A)	102								↓42 *
赤血球 (A)	25	↑271 *			↑314 *				
	102						↑450 *		
精子 (A)	12				↓41 *				
尿円柱 (A)	102					↓53 *			↓53 *
細菌 (B)	25		↓78 *				↑128 *		↑128 *
	102					↓ 50 *			
三リン酸塩 (A)	50			↓69 *					
浸透圧 (mOsm/kg)	12				↑119	↑121			
	50				↑125				
	76				↑132				
尿量 (mL)	25							↑142	↑125
	50	↓70	↓73	↓80	↓61				
	76				↓73				
pH	50				↓95 *				
ビリルビン (μM/L)	12								↓0 *
	25			↓ 33 *	↓0 *				↓33 *
	50				↓0 *				↓0 *
ブドウ糖 (mM/L)	12		↑119 *		↑124 *				
	50				↑128 *				
	76				↑146 *		↑125 *		

表中の数字は測定値もしくはスコアの平均の対照群に対する百分率。

Williams 多重比較法, ↑↓, p<0.05; ↑↓, p<0.01。

*は Wilcoxon 検定法, ↑↓, p<0.05; ↑↓, p<0.01。

1000ppm 群の雄のブドウ糖は投与期間中高値で推移し、加齢とともに減少することはなかったが、対照群の値にも検査時期でのばらつきが見られた。これらの動物の尿は対照群と比較して

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

浸透圧が高めで尿量が低い傾向が見られ、腎での濃縮作用が対照群より効果的に行われていることが示された。雌には検体投与に関連する尿検査項目の変動はなかった。

(申請者注) 尿検査の変化について、申請者は、腎の尿濃縮に最も影響すると考えられる腎の加齢性慢性腎症の頻度と程度に対照群と 1000ppm 群で差がないこと、ラットの 90 日間反復経口投与毒性試験の 3000ppm にも検体投与による尿検査の特異的变化がなかったことから、いずれも偶発的变化との判断が妥当と考える。また 1000ppm 群雌雄ではビリルビンが複数の検査時に減少したが、同変化には診断的意義がなかった。投与群でみられたその他の変化はいずれも投与期間あるいは用量との関連性を欠くことから、検体投与の影響とはしなかった。

臓器重量； 投与 52 週（衛星群）及び投与 104 週（主群）の計画殺時の全生存動物及び試験期間中の切迫殺動物について以下の臓器重量（絶対重量）を測定した。計画殺動物の臓器重量は最終体重について補正した（補正重量，g，体重を共変量とした共分散分析の手法による）。

副腎，脳，心臓，腎臓，肝臓，卵巣，脾臓，精巣
統計学的有意差の認められた項目を表 8. に示す。

表 8. 臓器重量（補正重量）

臓器	検査週	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		10	100	300	1000	10	100	300	1000
脾臓	52								↑109
	104				↑156				↑121
精巣	52	↓ 91 ^d				-	-	-	-
脳	104								↓ 98
肝臓	52			↑105	↑120				
	104								↑112
腎臓	52				↑104				

表中の数字は対照群に対する百分率。

Williams 多重比較法，↑， $p<0.05$ ；↑↓， $p<0.01$ 。

^dは Dunnett の多重比較法，↓， $p<0.01$ 。

300 及び 1000ppm 群の雄で、52 週時に肝臓重量が増加したが、104 週時には対照群と差がなかった。1000ppm 群の雌では 104 週時に肝臓重量が増加した。1000ppm 群雌雄で脾臓重量が 104 週時に増加したが、52 週時では雌においてのみ増加が見られた。1000ppm 群雌の脳重量が投与 104 週時に減少したが、病理組織学的変化がみられなかったこと、及び同時に実施した発がん性試験では重量の変化がなかったことより、偶発的变化と判断した。

1000 ppm 群雄の腎臓重量が投与 52 週時に増加したが、病理組織学的検査において関連付けられる変化は認められなかったことから偶発性変化であると判断した。300ppm 群の雌及び 100ppm 以下の雌雄の投与群は用量に関連した異常はなかった。

肉眼病理学的検査；途中死亡・切迫殺，中間屠殺及び最終週屠殺動物を対象として剖検した。

発生頻度に統計学的有意差の認められた肉眼的病理所見を表 9 に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表 9. 肉眼病理学的検査成績

衛星群（1年間投与群）

性別		雄					雌				
投与量 (ppm)		0	10	100	300	1000	0	10	100	300	1000
肝臓	所見／検査動物数	20	10	10	10	10	20	10	10	10	10
	退色	2	2	0	3	↑ 8	0	0	1	0	1
	腫大	0	0	0	0	↑ 3	0	0	0	0	0
	斑紋	0	0	0	↑ 3	↑ 5	0	0	0	0	0

主群（2年間投与群）

性別		雄					雌				
投与量 (ppm)		0	10	100	300	1000	0	10	100	300	1000
脾臓	所見／検査動物数	40	20	20	20	20	40	20	20	20	20
	結節/腫瘍	1	2	↑ 4	↑ 5	↑ 6	3	0	1	1	0

Fisher の直接確率計算法 ↑, $p < 0.001$; ↑, $p < 0.01$; ↑, $p < 0.05$ (申請者実施)

1 年間投与後の中間屠殺動物では、1000 及び 300 ppm 群の雄で肝臓の斑紋がみられ、さらに 1000ppm 群の雄に肝臓の退色ないし腫大が観察され、これらの所見は検体投与の影響と考えた。全投与群の雌及び 100 ppm 以下の投与の雄に異常はなかった。

2 年間投与後最終屠殺動物では、1000, 300 及び 100 ppm 群の雄において脾臓の結節/腫瘍の発生頻度が有意に増加したが、病理組織学的検査において対応する所見には特定の腫瘍性あるいは非腫瘍性病変の増加は認められなかったこと及び同時に実施した発がん性試験ではこのような変化はなかったことから、検体投与との関連性はない偶発性変化と判断された。

病理組織学的検査；中間（衛星群）及び最終屠殺群（主群）について、0ppm 及び 1000ppm 群の全動物、ならびに死亡・切迫殺動物を対象として、以下の組織の病理標本を作製し、鏡検した。

副腎、大動脈、骨（膝関節、大腿骨、胸骨、椎骨（報告書では腰椎と記載されているが椎骨の誤り）3カ所）、脳、子宮頸部、精巣上体、眼球、ハーダー腺、心臓、腸管（十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸）、腎臓、喉頭、肝臓、肺、リンパ節（腸間膜及び下顎）、乳腺、坐骨神経、食道、卵巣、脾臓、下垂体、前立腺、唾液腺（顎下腺）、精のう、骨格筋（大腿筋）、皮膚、脊髄（頸部、胸部、腰部）、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺／上皮小体、舌、気管、膀胱、子宮（角）、肉眼的異常部位

また、10, 100 及び 300ppm 群では中間及び最終屠殺動物の肝臓、肺、腎臓及び肉眼的病変部について、さらに、最終屠殺動物の脾臓、副腎及び胃について病理標本を作製し、鏡検した。

[非腫瘍性病変]

発生頻度に統計学的有意差が認められた非腫瘍性病変を中間屠殺動物と最終屠殺動物に分けて表 10. に示す。

肝臓において、中間屠殺動物では、1000 ppm 群の雌雄ならびに 300 ppm 群の雄において肝臓の肝細胞脂肪化(大型脂肪滴)が、雄では小葉中間帯、雌では小葉中心性に観察され、さらに小葉中心性肝細胞肥大も認められた。最終屠殺動物では、小葉中心性肝細胞肥大および肝細胞小増殖巣(明細胞)の有意な増加が 1000 ppm 群の雄においてみられた。さらに雄の色素沈着(ク

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

ツパー細胞)及び雌の小葉中心性肝細胞脂肪化が1000 ppm群において観察された。これらの肝臓における所見については検体投与との関連性が認められた。

脾臓の組織球集簇の発生頻度の増加が最終屠殺動物の1000 ppm群の雌雄に認められた。

ラットの発がん性試験(資料2-11)では雄において副腎の皮質空胞化(cortical vacuolation)が増加した。今回の慢性毒性試験では1000ppm群の雌の最終屠殺動物で副腎の限局性皮質空胞化(cortical vacuolated focus)が増加したが、同病変は限局性(focus)であり、ラット発がん性試験ではびまん性であったこと、及び雄では増加がみられなかったことから検体投与の影響とは考えなかった。1000ppm群の雌雄ではその他にも一部病変の発生頻度が有意に増加したが、ラットの90日間反復経口投与毒性試験や発がん性試験ではそのような変化はみられなかったことから、偶発的变化と判断した。投与群で認められたその他の有意な変化は用量との関連がないかあるいは病変の減少であり、毒性学的意義はないと考えた。

(申請者注) 肝臓の色素沈着については、報告書ではPigment depositionのみの記載であり、沈着部位の記載がなかった。よって、申請者が組織を鏡検し、クッパー細胞内の沈着であることを確認した。なお、同時に実施した特殊染色においてこの色素はベルリン青陽性及びシュモール反応陽性で、血鉄素(ヘモジデリン)と消耗性色素(リポフスチン)の複合体であることが判明し、血鉄素の沈着がより顕著であった。

また報告書に使用されている「Fatty vacuolated foci/areas」は肝細胞小増殖巣(Cellular alteration)の細胞が脂肪変性を示した像であるため、本抄録では肝細胞小増殖巣(空胞細胞)と記載した。

[腫瘍性病変]

主群および衛星群において観察された腫瘍性病変の発生頻度に分けて表11.に示す。
統計学的有意な腫瘍性病変の発生頻度の変化は認められなかった。

以上のように、本剤のラットに対する2年間飼料混餌投与による慢性毒性試験において、1000ppm群では体重及び摂餌量がわずかに減少した。また血漿コレステロール、トリグリセライド及びアルブミンが減少し、 γ -グルタミルトランスペプチターゼが増加した。さらに肝臓及び脾臓において重量増加を伴う種々の病変の増加が認められた。300ppm群ではアルブミンの減少(雌)及び肝臓重量・肝臓病変の増加(雄)がみられた。従って、無毒性量(NOEL)は100ppm(雄4.29 mg/kg/日、雌5.27 mg/kg/日)であると結論した。