

スピロメシフェンのイヌにおける 90 日間反復経口投与毒性試験

(毒性資料 No. 原体-10)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：2001年5月23日

検体の純度：

試験動物：ビーグル犬(HSD Bor:BEAG)、1群雌雄各4匹

投与開始時；19～23週齢 平均体重；雄 7.5kg 雌 6.9kg

投与期間：13週間(1999年2月～1999年5月)

投与方法：

検体を0(対照群)、20、50、250、2000ppmとなるように均質に飼料に混ぜ13週間投与した。飼料は制限給餌(第1週～第10週；300g/日及び第11週～第14週；350g/日)とし、水は自由に摂取させた。検体を添加した飼料は、1週間に1回調製した。投与直前に検体混合飼料(対照群は飼料のみ)に微温湯の水道水を1:1の割合で添加し家庭用ミキサーで均一なペースト状として動物に毎日与えた。

投与用量設定の根拠；

試験項目及び結果：

1. 臨床症状

全動物の外観と行動を毎日観察した。(原則として、臨床症状及び生死を少なくとも1日2回(週末と休日は1回)観察した。)

試験期間中、投与に起因する臨床所見は認められなかった。

2. 死亡率

13週間の試験期間中、死亡は認められなかった。

3. 体重変化 (図1, 図2)

投与開始前(2週前)から週に1回体重を測定した。

平均体重または体重増加量に関して、最高用量 2000ppm を含む全ての群で雌雄ともに影響は認められなかった。

図1. 体重(雄)

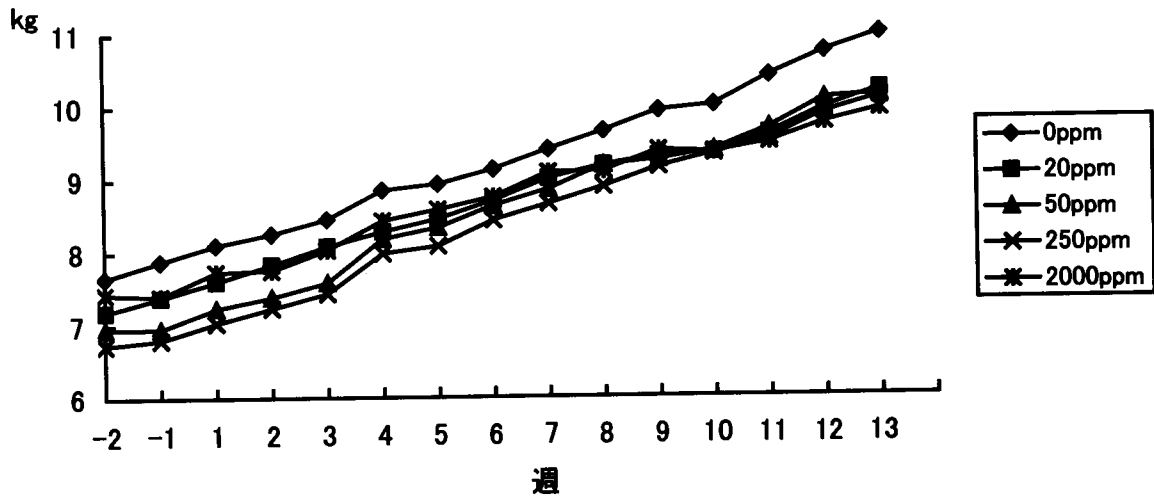
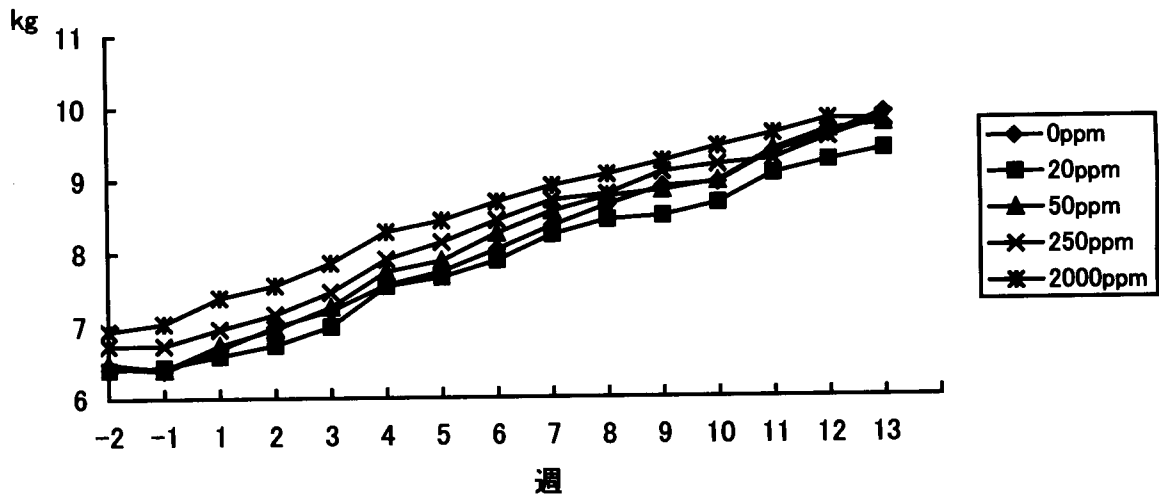


図2. 体重(雌)



4. 摂餌量及び検体摂取量 (表 1)

毎日、給餌後 20~22 時間に残餌量を測定した。

摂餌量については全用量群とも対照群と同等であった。

投与期間中の平均検体摂取量(mg/kg 体重/日)は以下のとおりであった。

表 1 検体摂取量(mg/kg 体重/日)

投与用量(ppm)		20	50	250	2000
検体摂取量	雄	0.71	1.81	9.19	70.92
	雌	0.78	1.88	9.29	71.40

5. 神経学的検査及び体温測定

反射(瞳孔、角膜、膝蓋腱、伸筋、体位及び屈筋)と体温の測定を、試験開始前(2週前)、投与7及び13週時に実施した。

どの検査時点においても、検体に起因する所見は認められなかった。

6. 眼科学的検査

全動物での眼科学的検査は、投与開始前(2週前)、投与7及び13週時に実施した。

どの検査時点においても、検体に起因する所見は認められなかった。

7. 心電図検査

全動物での心電図検査は、投与開始前(2週前)、投与7及び13週時のそれぞれ給餌後2時間に実施した。

どの検査時点においても心電図の波形に薬理学上意味のある変化は認められなかった。従って、検体の心臓に及ぼす影響を示す徴候は認められなかった。

8. 血圧検査

全動物での血圧検査は、投与開始前(2週前)、投与7及び13週時のそれぞれ給餌後2時間に実施した。

どの検査時においても、検体に起因する変化は認められなかった。

9. 血液学的検査(表2)

試験開始前(3週前)、投与4、7及び13週時に血液を頸静脈から採取し、以下の項目について測定を行った。

白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量(Hb)、ヘマトクリット値(HCT)、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)、メト

ヘモグロビン量, 網状赤血球数, 血小板数(THRO), ハイイツ小体, トロンボプラスチン時間(TP), 部分トロンボプラスチン時間(PTT), 赤血球沈降速度, 白血球百分率

認められたパラメーターの変化は全て用量相関性がみられず、経時的な変動もみられないことから、これらの変化が検体に関連する毒性影響を示すとは考えられなかった。

表2 血液学的検査 (有意差の認められた項目)

用量	20ppm				50ppm				250ppm				2000ppm				
	検査週	-3	4	7	13	-3	4	7	13	-3	4	7	13	-3	4	7	13
雄																	
白血球									(112)		↑153						
赤血球					(90)		↓86	↓88	(90)	↓89	↓87	↓83					
Hb	(96)		↓90		(90)		↓87	↓88	(92)		↓87	↓85					
HCT					(93)		↓88	↓89	(95)	↓91	↓90	↓86					
THRO													(124)				↑146
PTT	(105)	↑108	↑105	↑108	(105)	↑110											
雌																	
好中球													(103)				↑152
PTT					(97)			↓92					(101)		↓92		↓91

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの。

↑↓ : p<0.05, ▲▼ : p<0.01 (Bartlett+Dunnetteの多重比較: 申請者により実施)

10. 血液生化学的検査 (表3)

試験開始前(3週前)、投与4、7及び13週時に血液を頸静脈から採取し、以下の項目について測定を行った。

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT), アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALAT), アルカリホスファターゼ(ALP), グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GLDH), γ-グルタミルトランスフェラーゼ, 乳酸脱水素酵素(LDH), クレアチンキナーゼ(CK), 血糖(GLUC), コレステロール(CHOL), トリグリセリド(TRIGL), クレアチニン(CREA), 尿素(UREA), ビリルビン, 蛋白(PROT), アルブミン(ALB), Na, K, Ca, CL, P, Fe 及び Mg 並びにトリヨードチロニン(T3), チロキシン(T4), 甲状腺刺激ホルモン(TSH), チロキシン結合能(TBC)

臨床生化学的検査では、2000ppm 群の雌雄に明瞭に用量と時間に関連したALPの上昇が認められた。ALPの変化に性差は認められなかった。その他の酵素および基質ならびに電解質の項目に、いくつかの統計学的な有意差が認められたが、用量関連性がみられないことから、検体投与による影響ではないものと考えられた。電解質の値に投与による臨床学的に明らかな影響は認められなかった。

Confidential

甲状腺関連項目では2000ppmでT4値が雌雄ともに有意な減少を示した。また、同群雄では4週にTBCの増加が、雌では7週にT3の減少がみられた。これらの字変動は、同群でみられたUDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ活性値の増加と関連しているものと考えられた。

表3 血液生化学的検査（有意差の認められた項目）

用量	20ppm				50ppm				250ppm				2000ppm				
	検査週	-3	4	7	13	-3	4	7	13	-3	4	7	13	-3	4	7	13
雄																	
ASAT					↓75				(82)			↓71					
ALAT									↓68					↓73			
ALP														(107)	↑*181	↑*295	↑*334
LDH					↓56												
GLUC									(92)			↑122					
P														(95)			↓82
Fe					(127)			↓76		(115)		↑132		(132)			↓60
Mg	(97)			↓89										(98)	↓88		↓86
T4														(92)	↓37	↓30	↓32
TBC					(104)			↓90	(101)	↑107				(103)	↑108		
TSH					(100)			↑183									
雌																	
ALAT					(104)	↓*68											
ALP														(94)	↓*195	↑*374	↑*444
CHOL					(122)			↑152									
CREA	(91)				↓83												
K	(100)	↓*88															
Fe					(111)			↓74						(105)			↓73
T3														(101)			↓79
T4														(100)	↓45		↓*18

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの。

↑↓: p<0.05, ⬆⬇: p<0.01 (Bartlett+Dunnettの多重比較: 申請者により実施)

↑↓*: p<0.05, ⬆⬇*: p<0.01 (Bartlett+non-parametric Dunnettの多重比較: 申請者により実施)

11. 尿検査(表4)

試験開始前(2週前)、投与4週、7週及び13週時に、全動物で尿量(Vol)、比重、pH、クレアチニン(CREA)、Na、P、蛋白、潜血、糖、ビリルビン、ケトン体、ウロビリノーゲン、尿沈渣について検査を実施した。尚、クレアチニン、Na、Pについては尿量中の量を算出した。

その結果、用量並びに経時的な関連性が認められないことから、検体の影響はみられなかった。

表 4 尿検査 (有意差の認められた項目)

用量	20ppm				50ppm				250ppm				2000ppm			
検査週	-3	4	7	13	-3	4	7	13	-3	4	7	13	-3	4	7	13
雄																
比重	(100)	↑325														
Na									(100)	↓100			(100)	↓100		
Crea× Vol	(90)			↓60	(90)			↓62								

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

↑↓ : p<0.05, ▲▼ : p<0.01 (Bartlett+Dunnette の多重比較 : 申請者により実施)

12. 肝臓組織の酵素及びトリグリセリドの測定 (表 5)

投与終了後に全動物の肝臓組織について、以下の酵素およびトリグリセリドを測定した。

N-デメチラーゼ (N-DEM) *, O-デメチラーゼ (O-DEM) **, チトクロム P450 (P450)、チトクロム P450 依存性モノオキシゲナーゼ (7-エトキシマリンデエチラーゼ/ECOD, 7-エトキシレゾルフィンデエチラーゼ/EROD, アルドリンエポキシダーゼ/ALD), エポキシドヒドロラーゼ (EH) 及び抱合酵素 (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ/GS-T, UDP-グルクノシルトランスフェラーゼ/UDP-GT)

* : 基質/アミノピリン ** : 基質/4-ニトロアニソール

肝臓組織のホモジネートの検査では、2000ppm 群の雌雄ともに、EROD、GS-T には明らかな誘導がみられなかったが、N-DEM、O-DEM、P450、ECOD、ALD、EH、UDP-GT に明らかな誘導がみられた。特に UDP-GT の誘導は前述の甲状腺ホルモンにみられた変動と密接に関連しているものと考えられた。250ppm 群では ECOD の誘導が雌雄ともに認められ、更に雄では N-DEM および O-DEM の誘導がみられ、雌では ALD、EH の誘導が認められた。尚、250ppm 群の雌雄でみられた肝薬物代謝酵素の変化は有害作用とは考えず、適応反応と考えた。これは肝重量の増加が認められていないこと、また 1 年間反復投与試験 (毒性資料 No. 17) の 400ppm 群では肝重量に影響はみられず、また病理組織学的検査においても肝に関連所見がみられていないことに基づいた。

トリグリセリドの増加は 2000ppm 群の雌雄共に認められ、わずかに背景データを上回った。雌では 250ppm 群でも増加がみられた。それら平均値は正常変動範囲内にあった。2000ppm 群を含め、血漿中でのトリグリセリド値に影響は認められていないこと、病理組織学的検査においてもトリグリセリドの蓄積を示唆する所見は認められていないこと、またより高用量で行った別の 90 日間反復経口投与毒性試験 (資料 No. 原体-11) では 3000ppm 群の雌雄ともに統計学的に有意な影響が認められなかったこと、1 年間反復投与試験 (毒性資料 No. 原体-17) で、雄にのみ統

Confidential

計学的に有意な増加が 400ppm 群以上で認められているが、増加の程度に用量依存性が認められなかったことなどから、本試験で認められたトリグリセリドの肝組織中での増加は本検体の作用とはみなさなかつた。

申請者註

	90 日間反復				1 年間反復	
	250	2000	3000	5000	400	4000
雄		▲135		▲114	▲126	↑121
雌	↑134	▲180		▲132		

↑↓ : p<0.05, ▲▼ : p<0.01 (Bartlett+Dunnette の多重比較 : 申請者により実施)

トリグリセリド値(背景データ±3SD)

21-52 週 ; 雄 2.39~5.63µmol/g, 雌 2.18~6.13µmol/g)

53-120 週 ; 雄 2.38~5.92µmol/g, 雌 2.68~6.43µmol/g)

アンダーライン ; 背景データの上限をわずかに超えた。

表 5 肝臓組織の酵素及びトリグリセリドの測定 (有意差の認められた項目)

性別 用量(ppm)	雄				雌			
	20	50	250	2000	20	50	250	2000
N-DEM*			▲210	▲348		▲206		(297) ▲396#
O-DEM**			▲166	▲220		↑148		▲205
P450				↑*213				▲*199
ECOD			▲ ^t 280	▲ ^t 636			▲ ^t 244	▲ ^t 417
EROD		↑*179						
ALD				↑ ^t 205			↑ ^t 174	▲ ^t 276
EH				▲ ^t 221			↑ ^t 186	▲ ^t 248
GS-T				↓ ^t 85				
UDP-GT				↑ ^t 191				↑ ^t 163
TRIG				▲135			↑134	↑180

※ : 基質/アミノピリン ※※ : 基質/4-ニトロアニソール

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

↑↓ : p<0.05, ▲▼ : p<0.01 (Bartlett+Dunnette の多重比較 : 申請者により実施)

↑↓* : p<0.05, ▲▼* : p<0.01 (Bartlett+non-parametric Dunnette の多重比較 : 申請者により実施)

↑↓^t : p<0.05, ▲▼^t : p<0.01 (Student's t-test)

* : 他に比べ明らかに低値を示した 1 例を除外して算出

13. 本検体及びその主要代謝物の血漿中の濃度測定(表 6)

12 週後に本検体及びその主要代謝物の血漿中濃度を測定した。採血は給餌後 22 時間に行った。本検体はいずれの用量においても定量限界(5µmol/L)以下であり検出されなかつた。は全ての群で検出され用量に依存して増加したが、その濃度は用量比より低い比率での増加であつた。またの濃度に雌雄で差は認められなかつた。

表 6. 血漿中の の濃度

用量 (ppm)	(nmol/mL)	
	雄	雌
0	0	0
20	2.1	2.0
50	3.6	2.9
250	12.2	10.4
2000	31.3	40.6

14. 剖検

試験終了時に、全動物を Narcoren®麻酔下で放血致死させ剖検した。
その結果、本検体に関連した異常所見は認められなかった。

15. 臓器重量 (表 7)

全例について、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、卵巣、甲状腺、副腎、胸腺、前立腺、脳、下垂体、膵臓、子宮、精巣上体、胆のう(胆のう内容物を取り除いたもの)の重量測定と対体重比について算出した。

肝の対体重比の増加が認められた 2000ppm 群の雌雄では肝薬物代謝酵素誘導が認められていることから、この肝の対体重比の増加は本検体の影響と考えられた。一方、2000ppm および 50ppm 群の雌の腎臓において、対体重比に統計学的に有意な増加が認められているが、腎臓に異常所見が認められていないこと、またより高用量で行った別の 90 日間反復経口投与毒性試験(毒性資料 No. 11)で腎重量に影響は認められていないことから、偶発的な変動と考えられた。

表 7 臓器重量 (有意差の認められた項目)

性別 用量 (ppm)	雄				雌			
	20	50	250	2000	20	50	250	2000
肝 対体重比				↑130				↑130
腎 対体重比						↑109		▲112

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

↑↓ : p<0.05, ▲▼ : p<0.01 (Bartlett+Dunnette の多重比較 : 申請者により実施)

16. 病理組織学的検査 (表 8)

全動物を対象として、以下の臓器について病理標本を作製した。

副腎、大動脈、骨髄(円柱)、脳(大脳、小脳、橋/延髄)、精巣上体、食道、眼、大腿骨、胆嚢、心臓(乳頭筋)、腸(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(下顎、腸間膜)、鼻、視神経、卵巣、卵管、膵臓、耳下腺、咽頭、下垂体、前立腺、坐骨神経、骨格筋(大腿)、皮膚(乳腺部)、

Confidential

脊髄(頸部、胸部、腰部)、脾臓、胸骨、胃(前胃、腺胃)、顎下腺、精巣、胸腺、上皮小体を伴う甲状腺、舌、扁桃腺、気管、膀胱、子宮頸部を伴う子宮、膈、身体標識(入墨)及び肉眼的変化が認められた全ての臓器

これらは10%中性緩衝ホルマリン及び/又は Davidson の溶液中で固定した。肺1葉については固定前に気管支内経路で10%ホルマリンを注入した。全てのスライドはヘマトキシリン及びエオジン(H&E)で染色した。ホルマリン固定の肝臓標本から作製した凍結切片はOil Red O (ORO)で染色した。

病理組織学的検査の結果、2000ppm および 250ppm 群の数例(雄各3例、雌各2例)の肝臓で、小葉中心性に細胞質変化が認められた。これらの動物の細胞質の構造はより均質で密になっており、正常でみられるような粗く、むしろ密ではない細胞質とは異なっていた。これは肝薬物代謝酵素誘導に関連した変化と考えられた。雄の生殖器系はほとんどの動物で完全には成熟していなかった。

表 8. 明らかな病理組織学的所見

所見/用量(ppm)	雄					雌				
	0	20	50	250	2000	0	20	50	250	2000
【検査数】	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
肝臓 細胞質の変化#	0	0	0	3	3	0	0	0	2	2
精巣 未成熟	4	3	4	4	4	/	/	/	/	/
精巣上体 細胞残渣	4	4	4	4	3	/	/	/	/	/
前立腺 未成熟	4	4	4	4	4	/	/	/	/	/

*: p<0.05 **: p<0.01 (Fisher 直接確率検定/片側; 申請者により実施)

Cochran-Amitage 傾向検定 (申請者により実施); 有意差なし

#: 細胞質が密になり均質化

以上の結果から、本剤の影響としてみられた所見は、2000ppm 群の雌雄で ALP の増加、T4 の減少、TBC の増加(雄)、T3 の減少(雌)、肝薬物代謝酵素(N-DEM, O-DEM, P450, ECOD, ALD, EH, UDP-GT)の上昇、対体重比の増加(肝臓)、病理組織学的所見で肝臓/細胞質の変化(細胞質が密になり均質化)が認められた。250ppm 群では肝薬物代謝酵素(ECOD(雌雄), N-DEM(雄), O-DEM(雄), ALD(雌), EH(雌))の上昇、また肝細胞質の変化がみられた。この250ppm で認められた肝に関連する所見はきわめて軽度であり、肝重量にも変化がないことから、異物投与による適応変化にとどまるものであると判断され、毒性影響とはみなさなかつた。

これらのことから、本試験における無毒性量は雌雄共に250ppm(雄:9.2mg/kg 体重/日, 雌:9.3mg/kg 体重/日)であると判断した。

スピロメシフェンのイヌにおける 90 日間反復経口投与毒性試験

(毒性資料 No. 原体-11)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：2001年12月6日

検体の純度：

試験動物：ビーグル犬(HSD Bor:BEAG)、1群雌雄各4匹

投与開始時；20～21週齢 平均体重；雄 7.5kg 雌 7.3kg

投与期間：13週間(1999年11月～2000年2月)

投与方法：

検体を0(対照群)、3000、5000ppmとなるように均質に飼料に混ぜ13週間投与した。飼料は制限給餌(第1週～第8週；300g/日、第9週～第14週；330g/日)とし、水は自由に摂取させた。検体を添加した飼料は、1週間に1回調製した。投与直前に検体混合飼料(対照群は飼料のみ)に微温湯の水道水を1:1の割合で添加し家庭用ミキサーで均一なペースト状として動物に毎日与えた。

投与用量設定の根拠；

試験項目及び結果：

1. 臨床症状

全動物の外観と行動を毎日観察した。(原則として、臨床症状及び生死を少なくとも1日2回(週末と休日は1回)観察した。)

試験期間中、5000ppmまでの全ての動物で栄養状態に変化は認められなかった。3000ppm群では有害な影響はみられなかった。5000ppmでは嘔吐が一時的にみられた。

2. 死亡率

13週間の試験期間中、死亡は認められなかった。

3. 体重変化 (図1, 図2)

投与開始前(2週前)から週に1回体重を測定した。

平均体重または体重増加量に関して、最高用量 5000ppm を含む全ての群で雌雄ともに影響は認められなかった。

図1. 体重(雄)

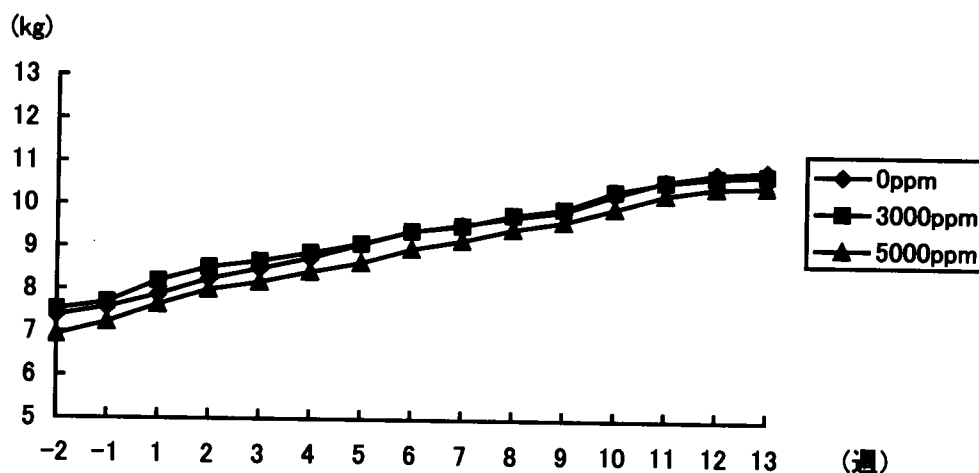
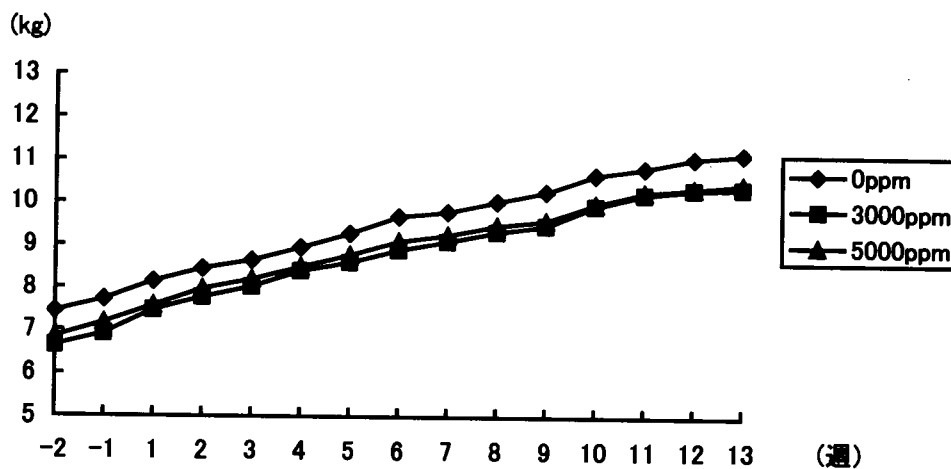


図2. 体重(雌)



群ごとの平均増体重

群	性別	投与前(-1週)	投与後(第13週)	増加量(-1~13週)
対照群	雄	7.58kg	10.85kg	+ 3.27kg
	雌	7.73kg	11.18kg	+ 3.45kg
3000ppm	雄	7.70kg	10.75kg	+ 3.05kg
	雌	6.93kg	10.38kg	+ 3.45kg
5000ppm	雄	7.23kg	10.48kg	+ 3.25kg
	雌	7.18kg	10.43kg	+ 3.25kg

4. 摂餌量及び検体摂取量 (表 1)

毎日、給餌後 20~22 時間に残餌量を測定した。

摂餌量については全用量群とも対照群と同等であった。

投与期間中の平均検体摂取量(mg/kg 体重/日)は以下のとおりであった。

表 1 検体摂取量(mg/kg 体重/日)

投与用量(ppm)		3000	5000
検体摂取量	雄	98.4	172.5
	雌	102.8	170.8

(申請者により算出)

5. 神経学的検査及び体温測定

反射(瞳孔、角膜、膝蓋腱、伸筋、体位及び屈筋)に関する検査は、試験開始前(2週前)、並びに試験 2、4、6、8、10 及び 13 週に実施した。動物の体温は、試験開始前(2週間前)、並びに試験 6 及び 13 週に測定した。

どの検査時点においても、検体に起因する所見は認められなかった。

6. 眼科学的検査

全動物での眼科学的検査は、投与開始前(2週前)、投与 6 及び 13 週時に実施した。

どの検査時点においても、検体に起因する所見は認められなかった。

7. 心電図および血圧検査

全動物での心電図および血圧検査は、投与開始前(2週前)、投与 6 及び 13 週時のそれぞれ給餌後 2 時間に実施した。

どの検査時点においても血圧、心拍数および心電図に検体の影響を示す徴候は認められなかった。

8. 血液学的検査 (表 2)

試験開始前(2週前)、投与 2、6 及び 13 週時に血液を頸静脈から採取し、以下の項目について測定を行った。

白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量(Hb)、ヘマトクリット値(HCT)、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)、メトヘモグロビン量、網状赤血球数(RET1)、血小板数(THRO)、ハインツ小体、トロンボプラスチン時間(TP)、部分トロンボプラスチン時間(PTT)、赤血球沈降速度、

白血球百分率

認められたパラメーターの変化は全て用量相関性がみられず、経時的は変動もみられないことから、これらの変化が検体に関連する毒性影響を示すとは考えられなかった。

表2 血液学的検査 (有意差の認められた項目)

用量	3000ppm				5000ppm			
検査週	-2	2	6	13	-2	2	6	13
雄								
単球					(104)			↑147
赤血球	(99)	↓90			(99)	↓90	↓87	↓86
Hb	(98)	↓89	↓89	↓90	(94)	↓89	↓86	↓85
HCT	(96)	↓87	↓89		(99)	↓90	↓87	↓86
RETI					(123)		↓50	
THRO	(112)		↑138	↑152	(119)		↑138	↑150
雌								
赤血球	(93)	↓90	↓89	↑106				
Hb	(91)	↓89	↓88	↓90				
HCT	(93)	↓90		↓91				
RETI	(100)		↓63		(89)		↓50	↓46
THRO	(113)			↑133				
TP	(103)		↑109					

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したものの。

↑↓ : $p < 0.05$, ↑↓ : $p < 0.01$ (Bartlett+Dunnettの多重比較: 申請者により実施)

申請者註: 有意差の認められた項目の数値は全て背景データ範囲内であった。参考のため5000ppmにおいて影響の認められた項目について、背景データ(-2SD~+2SD)を示す。

単球(10E9/L)雄; 27~39週齢(0.20~1.55)

赤血球数(10E12/L)雄; 21-26週齢(5.03~7.27), 27~39週齢(4.86~7.34)

Hb(g/L)雄; 21-26週齢(111~151), 27~39週齢(110~157)

HCT(L/L)雄; 21-26週齢(0.343~0.472), 27~39週齢(0.329~0.487)

RETI(%)雄; 21-26週齢(4~16), 27~39週齢(4~15), 雌; 21-26, 27~39週齢(4~17)

THRO(10E9/L)雄; 21-26週齢(189~494), 27~39週齢(181~473)

9. 血液生化学的検査 (表3)

試験開始前(2週前)、投与2、6及び13週時に血液を頸静脈から採取し、以下の項目について測定を行った。

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT), アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALAT), アルカリホスファターゼ(ALP), グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GLDH), γ-グルタミルトランスフェラーゼ(GGT), 乳酸脱水素酵素(LDH), クレアチンキナーゼ(CK), 血糖(GLUC), コレステロール(CHOL), トリグリセリド

(TRIGL), クレアチニン(CREA), 尿素(UREA), ビリルビン(BILI), 蛋白(PROT), アルブミン(ALB), Na, K, Ca, CL, P, Fe 及び Mg 並びにトリヨードチロニン(T3), チロキシン(T4), 甲状腺刺激ホルモン(TSH), チロキシン結合能(TBC)

3000ppm 及び 5000ppm 群に投与に関連した ALP 活性の上昇(3000ppm では統計学的な有意差なし)がみられた。さらにこれらの群では T4 の減少(雌 5000ppm では統計学的な有意差なし)が示され、これに対応して雌で TSH の増加が散見された。これら甲状腺に対する影響は別の 90 日間反復経口投与毒性試験(毒性資料 No. 10)の 2000ppm において影響が認められていることから、本検体の影響と考えられた。その他、統計学的な有意差のある項目が散見されたが、用量相関性がない、経時的な関連性がないあるいは、その他の関連所見が認められないことから、投与の影響とはみなさなかつた。

表 3 血液生化学的検査 (有意差の認められた項目)

用量 検査週	3000ppm				5000ppm			
	-2	2	6	13	-2	2	6	13
雄								
ASAT					(86)	↓ 80		
ALAT					(86)	↓ 58	↓ 59	
ALP	(103)	(171)	(332)	(421)	(103)	▲290	▲687	▲1044
GLUC	↓ 93			▲108				
TRIG	(100)		↑ 154					
CREA					(102)	↓ 83		
UREA	(125)	↓ 69			(83)	↓ 50	↓ 68	↓ 69
BILI	(60)	↓ 60	↓ 64	↓ 73	(60)	↓ 50	↓ 43	↓ 53
ALB	(96)			↓ 92	(98)			↓ 88
Ca	(99)	↓ 96						
CL					(100)		↓ 97	
T4	(117)	↓ 45	↓ 47	↓ 35	(103)	↓ 48	↓ 58	↓ 35
雌								
ALP	(106)	(167)	(318)	(409)	(110)	▲286	▲603	▲965
CREA	(97)		↓ 88					
UREA	(91)			↓ 76	(101)			↓ 77
BILI	(89)		↓ 67	↓ 67	(89)	↓ 67	↓ 50	↓ 67
ALB	(99)			↓ 89				
P	(105)		↓ 92					
Fe	(127)		↓ 68	↓ 72	(80)		↓ 67	
T4	(107)	↓ 68	↓ 52	↓ 38	(107)	(93)	(67)	(62)
TSH	(194)			▲318	(56)	▲157		▲218

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

↑ ↓ : p<0.05, ▲ ▼ : p<0.01 (Bartlett+Dunnette の多重比較 : 申請者により実施)

↑ ↓* : p<0.05, ▲ ▼* : p<0.01 (Bartlett+non-parametric Dunnette の多重比較 : 申請者により)

実施)

10. 尿検査

試験開始前(2週前)、投与2週、6週及び13週時に、全動物で尿量(Vol)、比重、pH、クレアチニン(CREA)、Na、P、蛋白、潜血、糖、ビリルビン、ケトン体、ウロビリノーゲン、尿沈渣について検査を実施した。尚、クレアチニン、Na、Pについては尿量中の量を算出した。

その結果、どの検査時点においても統計学的な有意差は認められず、検体に起因すると考えられる所見はなかった。

11. 肝臓組織の酵素及びトリグリセリドの測定(表4)

投与終了後に全動物の肝臓組織のN-デメチラーゼ(N-DEM)*、O-デメチラーゼ(O-DEM)**、チトクロームP450(P450)及びトリグリセリド(TRIGL)について測定した。さらに、チトクロームP450依存性モノオキシゲナーゼ(7-エトキシクマリンデエチラーゼ/ECOD, 7-エトキシレゾルフィンデエチラーゼ/EROD, アルドリンエポキシダーゼ/ALD), エポキシドヒドロラーゼ(EH)及び抱合酵素(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ/GS-T, UDP-グルクノシルトランスフェラーゼ/UDP-GT)を測定した。*: 基質/アミノピリン **: 基質/4-ニトロアニソール

N-DEM及びO-DEM、P450値ECOD、ALD、EHの明らかな増加が3000ppm群以上の雌雄でみられた。ERODの活性は雌雄共に低下したが、雌では用量相関性は認められなかった。抱合酵素のひとつであるUDP-GTは雌で3000ppm群および5000ppm群で増加したが、雄では統計学的有意な増加は認められなかった。生化学検査においてT4の低下が雄で両投与群に、雌では3000ppm群で統計学的有意に認められているというように、UDP-GTの変動とT4の変動には必ずしも明らかな負の関連性は認められなかった。しかしながら、別の90日間反復投与毒性試験(毒性資料No.10)においては、2000ppm群においてUDP-GTの増加に伴ってT4の低下が認められていることから、結果的にT4の低下を伴うUDP-GTの増加は本検体の影響と考えられた。GS-Tは雄では影響は認められず、雌では5000ppm群で有意な低下が認められた。

これら肝薬物代謝酵素の誘導は異物を投与されたことによる肝臓の代謝活性が亢進した結果であると考えられた。

トリグリセリドに統計学的に有意な増加が5000ppm群の雌雄で認められたがいずれも背景データ範囲内(雄2.39~5.63 μ mol/g, 雌2.18~6.13 μ mol/g)にあった。

表4 肝臓組織の酵素及びトリグリセリドの測定 (有意差の認められた項目)

性別 用量 (ppm)	雄		雌	
	3000	5000	3000	5000
N-DEM*	↑232	↑308	↑276	↑357
O-DEM**	↑245	↑261	↑249	↑257
P450	↑191	↑204	↑201	↑268
ECOD	↑ ^t 446	↑ ^t 598	↑ ^t 692	↑ ^t 878
EROD	↓ ^t 36	↓ ^t 19	↓ ^t 52	
ALD	↑ ^t 181	↑ ^t 169	↑ ^t 257	↑ ^t 289
EH	↑ ^t 217	↑ ^t 217	↑ ^t 267	↑ ^t 330
GS-T				↓ ^t 70
UDP-GT			↑ ^t 186	↑ ^t 195
TRIG		↑114		↑132

※：基質/アミノピリン ※※：基質/4-ニトロアニソール

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したものを。

↑↓：p<0.05, ↑↓：p<0.01 (Bartlett+Dunnette の多重比較：申請者により実施)

↑↓^t：p<0.05, ↑↓^t：p<0.01 (Student's t-test)

12. 本検体及びその主要代謝物の血漿中の濃度測定

13. 剖検

試験終了時に、全動物を Narcoren®麻酔下で放血致死させ剖検した。

その結果、本検体に関連した異常所見は認められなかった。

14. 臓器重量 (表 7)

全例について、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、卵巣、甲状腺、副腎、胸腺、前立腺、脳、下垂体、膵臓、子宮、精巣上体、胆のう(胆のう内容物を取り除いたもの)の重量測定と対体重比について算出した。

肝重量において 3000ppm 群では軽度、5000ppm 群では統計学的に有意に肝臓の実重量及び体重比重量が増加が認められ、薬物代謝酵素誘導や肝細胞肥大が認められていることから、本検体の影響と考えられた。胸腺では 3000ppm 群以上、膵臓では 5000ppm 群で認められた統計学的有意な増加は、関連する病理組織学的所見が認められていないことから、偶発的な変化と考えられた。胆のうで認められた 5000ppm 群での統計学的に有意な増加についても、病理組織学的検査において胆のう並びに肝内胆管に影響が認められていないこと、また 1 年間反復投与毒性試験(毒性資料 No. 17)でもこれらに影響が認められていないことから、偶発的な変化と考えられた。

表 7 臓器重量 (有意差の認められた項目)

性別 用量 (ppm)	雄		雌	
	3000	5000	3000	5000
肝実重量		▲149		↑125
肝対体重比		▲159	↑128	▲137
胸腺実重量	↑161	↑177		
胸腺対体重比	↑166	↑189		
膵臓対体重比				▲126
胆のう実重量		↑*138		
胆のう対体重比		▲147		

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したものの。

↑: p<0.05, ▲↓: p<0.01 (Bartlett+Dunnette の多重比較: 申請者により実施)

↑*: p<0.05, (Bartlett+non-parametric Dunnette の多重比較: 申請者により実施)

15. 病理組織学的検査 (表 8)

全動物を対象として、以下の臓器について病理標本を作製した。

副腎、大動脈、骨髄(円柱)、脳(大脳、小脳、橋/延髄)、精巣上体、食道、眼、大腿骨、胆嚢、心臓(乳頭筋)、腸(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(下顎、腸間膜)、鼻、視神経、卵巣、卵管、膵臓、耳下腺、咽頭、下垂体、前立腺、坐骨神経、骨格筋(大腿)、皮膚(乳腺部)、脊髄(頸部、胸部、腰部)、脾臓、胸骨、胃(前胃、腺胃)、顎下腺、精巣、胸腺、上皮小体を伴う甲状腺、舌、扁桃腺、気管、膀胱、子宮頸部を伴う子宮、膾、身体標識(入墨)及び肉眼的変化が認められた全ての臓器

これらは10%中性緩衝ホルマリン及び/又はDavidsonの溶液中で固定した。肺1葉については固定前に気管支内経路で10%ホルマリンを注入した。全てのスライドはヘマトキシリン及びエオジン(H&E)で染色した。ホルマリン固定の肝臓標本から作製した凍結切片はOil Red O (ORO)で染色した。

病理組織学的検査の結果、び慢性肝細胞肥大及び細胞質変化(細胞質が密になり均質化)が3000ppm及び5000ppm群の雌雄でみられた。脂質含量が、投与群の雄数匹の動物で軽微あるいは軽度に増加傾向を示した。3000及び5000ppm群のそれぞれ1匹の動物において、一部の肝細胞で肥大及び染色性の変化(淡明化)が観察された。この所見は変性性所見とみなされている。対照群を含む全ての群で、たんぱく質様封入体及び空胞が肝細胞にみられた。この所見はイヌではしばしば認められ、屠殺の方法に原因があると考えられている。副腎では皮質の空胞化の増加が、3000及び5000ppm群のそれぞれ雄1匹の動物に観察された。この所見の程度は軽微から軽度のものであり、用量に依存した増加がみられず、また1年間反復投与毒性試験(毒性資料 No. 17)においても検体投与による増加が認められなかったため、検体投与に関連しているものとは考えなかった。雄の生殖器系はほとんどの動物で完全には成熟していなかった。こうした発達状態に関連した所見として、未成熟な精細管、未成熟な前立腺及び精巣上体に細胞残渣が観察された。後者の所見は若い動物における精子形成の開始と関連しているものと考えた。

表 8. 主な病理組織学的所見

所見/用量 (ppm)	雄			雌		
	0	3000	5000	0	3000	5000
【検査数】	4	4	4	4	4	4
肝臓						
細胞質の変化 [#]	0 ⁺⁺	4 [*]	4 [*]	0 ⁺⁺	4 [*]	4 [*]
び慢性肝細胞肥大	0 ⁺⁺	4 [*]	4 [*]	0 ⁺⁺	4 [*]	4 [*]
肥大した細胞の染色性変化 (淡明化)	0	1	0	0	0	1
封入体/空胞	1	2	3	1	4	3
クッパー細胞巢	0	0	0	0	2	0
限局性壊死	0	0	1	0	1	0
脂肪含量の増加	0	2	2	0	0	0
副腎皮質						
空胞化	0	1	1	0	0	0
精巣						
未成熟	2	1	4	/	/	/
精巣上体						
細胞残渣	1	1	3	/	/	/
前立腺						
未成熟	3	4	2	/	/	/

++ : p<0.01 (Cochran-Amitage 傾向検定, 申請者により実施)

* : p<0.05 (Fisher 直接確率検定/片側, 申請者により実施)

: 細胞質が密になり均質化

以上の結果から、本剤の影響としてみられた所見は、3000ppm 群以上で ALP の増加、T4 の減少、TSH の増加(散見)、肝薬物代謝酵素 (N-DEM, O-DEM, P450, ECOD, ALD, EH, UDP-GT) の上昇、肝重量の増加、病理組織学的所見で肝臓/細胞質の変化(細胞質が密になり均質化)、び慢性肝細胞肥大の増加などが認められた。さらに、上記に加え 5000ppm では一時的な嘔吐もみられた。

(7) 21 日間反復経皮投与毒性

スピロメシフェンの 21 日間反復経皮投与毒性試験

(毒性資料 No. 原体-12)

試験成績の提出除外

本薬についての 21 日間反復経皮投与毒性試験成績は、「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成 12 年 11 月 24 日付け 12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知)の運用についての「第 4 試験成績の提出の除外について」(2) ⑩イの規定により提出除外にあてはまる。

[除外根拠]

本農薬原体の急性経皮毒性試験の結果から、限界最高用量である 2000mg/kg で、何ら本原体の影響は認められなかった。このように経皮毒性が低く、したがって、他の暴露経路による急性毒性に比べ著しく強い経皮毒性は認められていない。

このようなことから、21 日間反復経皮投与毒性試験の提出は不要であると判断した。

(8)90日間反復吸入毒性

スピロメシフェンの90日間反復吸入毒性試験

(毒性資料 No. 原体-13)

試験成績の提出除外

本薬についての90日間反復吸入毒性試験成績は、「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成12年11月24日付け12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知)の運用についての「第4 試験成績の提出の除外について」(2) ⑪イの規定により提出除外にあてはまる。

[除外根拠]

本農薬原体の急性吸入毒性試験の結果から、他の暴露経路による急性毒性に比べ著しく強い吸入毒性は認められていない。

このようなことから、90日間反復吸入毒性試験の提出は不要であると判断した。

(9) 反復経口投与神経毒性

スピロメシフェンのラットにおける反復経口投与神経毒性試験

(13 週間混餌投与)

(毒性資料No.原体-14)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 2002 年 1 月 15 日

検体の純度：

試験動物：ウイスター(Cr1:WI(Han)BR)系ラット、1 群雌雄各 12 匹
試験開始時；雌雄 8 週齢(平均体重 雄 241g, 雌 167g)

投与期間：13 週間(2000 年 8 月～11 月)

投与方法：

検体を 0(対照群)、100、500 及び 2000ppm の濃度で飼料に混入し、13 週間にわたって摂食させた。検体を混入した飼料は 2 週間に 1 回調製した。

用量設定の根拠；

観察・検査項目及び結果：

1. 臨床観察及び死亡

ケージサイド観察は少なくとも1日2回（休日及び週末は1日1回）行い、死亡又は瀕死の臨床症状について観察を行った。詳細な身体的観察は1週間に1回行った。

試験期間を通じて死亡例は認められなかった。

2000ppm群の雌1例で最終観察日に実験者に対する攻撃行動が認められた。この所見は偶発的なものとも考えることもできるが、以下の理由から検体の影響とみなした。1) 最高用量でみられたこと。2) 90日間反復経口投与毒性試験（毒性資料No. 8）の3000ppm群で同様な所見が認められていること。

その他の動物では検体に起因すると考えられる所見は認められなかった。

2. 体重

毎週、個体毎に体重の測定を行った。灌流固定する動物については屠殺日にも体重を測定した。

対照群と比較すると、2000ppm群で雌雄共に増体重が抑制されたが、その他の用量群では雌雄共に影響はみられなかった。対照群との最大差は雄で7%、雌で9%であった。

体重変化を図1、図2に示す。

図1. 雄の体重

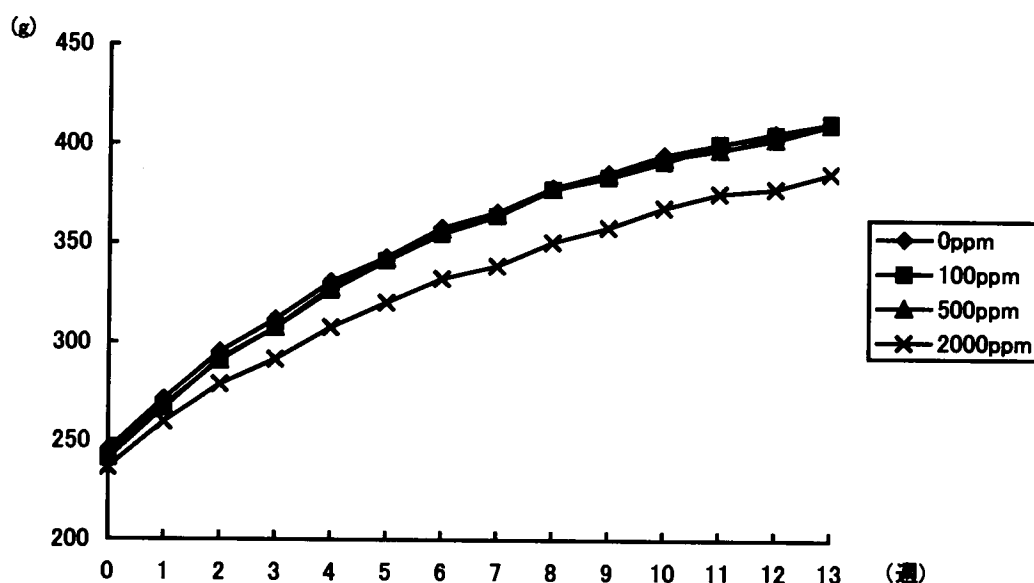
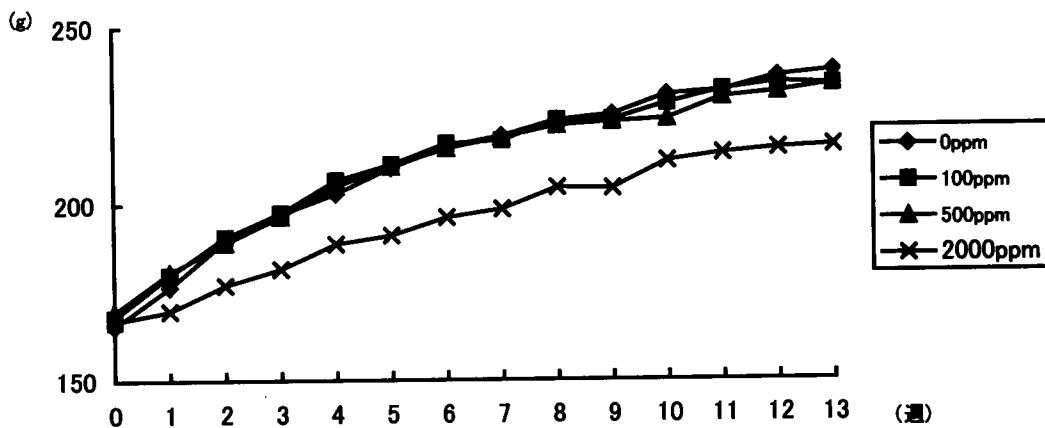


図 2. 雌の体重



3. 摂餌量及び検体摂取量(表 1)

毎週個体毎に摂餌量を測定した。

摂餌量は、対照群と比較して、2000ppm群の雌雄共に統計学的に有意に減少したが、その他の用量群では雌雄共に影響はみられなかった。対照群との最大差は雄で7%、雌で15%であった。

試験期間中1日当たりの体重1kgを基にした平均摂餌量において、いずれの用量群でも影響は見られなかった。最高用量群で差がみられなかったのは、摂餌量の減少に伴って体重増加も抑制されたことに基づいているものと考えられた。

摂取量を表1に示した。

表 1. 検体摂取量(mg/kg体重/日)

用量	100ppm	500ppm	2000ppm
雄	6.4	31.8	122.7
雌	7.9	38.3	149.3

4. 機能観察検査(FOB)

投与前1週、投与4、8及び13週の4回、全動物について行った。

全動物についてFOBを行った。

このFOBは、Moser¹⁾により記述された一連の試験方に準拠した。なお、着地開脚幅及び握力の測定には、確立されている方法²⁾を用いた。

1) : Moser, V. C., "Screening Approaches to Neurotoxicity : A Functional Observational Battery", J. Am. Coll. Toxicol., 1989, 8, pp. 85-93.

2) : Edwards, P. M., and V. H. Parker. "A Simple, Sensitive, and Objective Method for Early Assessment of Acrylamide Neuropathy in Rats," Toxicol. Appl. Pharmacol., 1977, 40, pp. 589-591

Meyer, D. A., H. A. Tilson, W. C. Byrd, M. T. Riley, "A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice," Neurobehav. Toxicol., 1979, 1, pp. 233-236

2000ppm 群の雄では第 8 週、雌では第 4, 8 及び 13 週(雌)に着地開脚幅の軽度な(15~23%)減少があった。これらの変化は対照群との間に統計的な有意差はなく、また 4 週間あるいは 8 週間の曝露で程度が重症となることもなく、他の所見(例えば神経-筋肉系の障害を示唆するもの)と随伴していることもなかった。その他の所見として、2000ppm 群の雌ラットの 1 匹が第 13 週のみで聴覚刺激及びテイルピンチに対する反応亢進並びにハンドリング中の身体緊張増加を示した。

着地開脚幅の結果を表 2 に示す。

表2. 着地開脚幅

用量 (ppm)	雄				雌			
	投与前	第 4 週	第 8 週	第 13 週	投与前	第 4 週	第 8 週	第 13 週
100	105	101	97	107	98	98	109	108
500	113	99	95	99	95	98	99	101
2000	97	94	82	96	102	77	79	85

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの
ANOVA 検定(対照群に比し、いずれの検査時期及び用量群においても有意差なし)

5. 運動能及び移動運動能試験

投与前 1 週、投与 4, 8 及び 13 週の 4 回、全動物について行った。

運動能及び移動運動能は、8 の字型迷路法を用い、60 分間のセッション及び各々 10 分間のインターバルで自動化運動能測定装置によって評価した。60 分間のセッション間中の経時的な活動性の減少を順応性として評価した。

60 分のセッションでは、総じていずれの用量群においても雌雄ともに運動能あるいは移動運動能に統計学的に有意な差は認められなかった。

運動能及び移動運動能のデータを 10 分間のインターバルでさらに解析した。投与群の運動能及び移動運動能は、各性、何れの検査時期においても、統計学的な有意差は認められなかった。

順応性も、どの用量においても雌雄共に検体投与による影響は認められなかった。

6. 眼科学的検査

投与前及び投与終了前(第 11 週)に供試動物の眼科的検査を半暗室内で行った。瞳孔反射試験ではペンライトあるいは透光器を用いて行い、更に散瞳剤を各々の眼に点眼し瞳孔を散大させた後、眼瞼、結膜、角膜、眼房水及び水晶体をスリットランプ検眼鏡を用い検査し、ガラス体液、網膜、脈絡膜及び視神経円板は間接検眼鏡及び集光レンズを用い検査した。

観察された眼科学的所見は、全て偶発的なものと考えられ、検体の投与に関連するものではなかった。

7. 脳重量の測定

灌流固定を行った動物 6 例について、最終体重及び脳重量を測定した。最終体重は麻酔後、灌流固定前に測定した。脳については、灌流固定後、後固定前に重量を測定した。また体重比重量も求めた。

最終体重は対照群に比べ、2000ppm 群の雄では減少傾向、雌では統計学的に有意に減少した(対照群の 91%; $p < 0.05$ (Anova + Dunnett の検定))。脳では雌雄共に、実重量及び対体重比にいずれの群でも変化は認められなかった。

8. 剖検

全動物について投与終了後に剖検(全臓器、体腔、剖面、開口部及び体表)を行った。組織採取用の動物(各群番号の最初の 6 匹)はペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与して麻酔し、アルデヒド固定液の血液灌流(左心室より)によって安楽死させた。灌流固定は 0.7%の亜硝酸ナトリウム・リン酸緩衝液を短時間注入後、0.5% (w/v) グルタルアルデヒドと 4% (w/v) の EM 用ホルムアルデヒドのリン酸緩衝液からなる汎用固定液を用いておこなった。脳、脊髄(後根神経節と脊髄神経根を含む)、両眼球と視神経、腓腹筋、両前肢、神経系組織や骨格筋の肉眼病変部位および個体標識部位を採取し、10%リン酸緩衝ホルマリンで後固定した。

低中間用量群では灌流固定した脊髄、後根神経節及び脊髄神経根は剖検時に採取したが、鏡検に供しない限り脊柱より切り出さずに肉眼的に観察した。

また残りの動物は炭酸ガスにより窒息死させ、組織を採取することなく剖検した。

剖検時において、検体投与に起因すると考えられる剖検所見は認められなかった。

9. 病理組織学的検査

灌流固定した対照群と最高投与群の雌雄より採取した神経系組織について、鏡検検索を実施した。中間用量群については、最高投与群に検体投与に起因した病変が見られなかったことから評価しなかった。

以下の組織を検査した: 脳(8 部位)、脊髄(4 部位/頸部、胸部、腰部及び馬尾)、ガッセル神経節、後根神経節、脊髄神経根、坐骨神経、脛骨神経、腓腹神経、視神経、眼球および腓腹筋

脳および脊髄組織はパラフィンで包埋し、約5 μ で薄切し、Hematoxylin and eosin (H&E)、luxol fast blue/cresyl violet (LFB/CV)、Sevier-Munger 銀染色法で染色した。さらに腓腹筋、視神経、眼球はパラフィンで包埋し、H&E 染色した。末梢神経(坐骨神経、脛骨神経、腓腹神経)、ガッセル神経節、後根神経節、脊髄神経根についてはグリコール メタアクリレート(GMA)で包埋し、2~3 μ m で薄切し、Lee の変法で染色した。

病理組織学的検査の結果、検体に関連した所見は2000ppm群の雌雄共に認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下、2000ppm 群の雌雄でみられた摂餌量の低下に伴った増体重抑制、着地開脚幅の減少、さらに、雌1例でみられた攻撃性から、総体的な NOAEL は、雌雄共に 500ppm (雄 : 31.8mg/kg 体重/日、雌 : 38.3mg/kg 体重/日) であると判断した。

「申請者註：神経毒性に関連すると考えられる所見として、90 日間反復経口投与毒性試験(毒性資料 No. 原体-9)で、最大耐量を越えた量において、けいれんなど、神経行動学的影響が認められているが、回復性が確認された。一方で、1 年間反復経口投与毒性試験(毒性資料 No. 原体-16)で実施した機能検査においては何ら影響は認められなかった。本試験においては攻撃性を示す例(1 例)や着地開脚幅の減少が認められているが、この減少には統計学的有意差も認められず経時的関連性もなかった。また病理組織学的検査の結果、神経および筋組織に 2000ppm まで何ら異常は認められていないことから、本検体が不可逆性の神経毒性誘発物質である可能性はないものと考えられた。」

(10) 28 日間反復投与遅発性神経毒性

スピロメシフェンの 28 日間反復投与遅発性神経毒性試験

(毒性資料 No. 原体-15)

試験成績の提出除外

本薬についての 28 日間反復投与遅発性神経毒性試験成績は、「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成 12 年 11 月 24 日付け 12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知)の運用についての「第 4 試験成績の提出の除外について」(2) ⑬の規定により提出除外にあてはまる。

[除外根拠]

本農薬原体は、リン酸エステル系で、かつ、コリンエステラーゼ阻害性を有する農薬以外の農薬である。したがって、本農薬原体は遅発性神経毒性を有する既知の化学物質との化学構造上の相関等からみて、遅発性神経毒性を有するおそれがないと認められるため、28 日間反復投与遅発性神経毒性試験の提出は不要であると判断した。

(11) 1年間反復経口投与毒性及び発がん性

スピロメシフェンのラットを用いた混餌投与による1年間反復経口投与毒性試験
(毒性資料 No. 原体-16)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 2001年12月17日

検体の純度：

試験動物： ウィスター(Hsd Cpb:WU)系ラット

[試験開始時5~6週齢、体重 雄154~186g, 雌108~145g]

1群雌雄各25匹

投与期間： 54週(1999年3月~2000年3月)

試験方法：

検体を0(対照群)、50、125、300及び800ppmとなるように粉末飼料(1%のピーナツ油添加)に混ぜ、54週間ラットに投与した。検体を混入した飼料は週毎に調製した。給餌回数は週2回とした。

用量設定の根拠；

観察・検査項目及び結果：

1. 臨床症状

動物を少なくとも1日2回（週末と休日は1回）観察し、臨床症状と異常を記録した。各個体の詳細な検査は週1回実施した。

その結果、全ての用量群において検体投与に関連した所見は認められなかった。

2. 死亡(表1)

死亡数に、本検体の投与による影響は認められなかった。

表1 死亡数(25匹中)

投与量(ppm)	0	50	125	300	800
雄	0	0	1	0	0
雌	1	2	0	2	1

3. 体重(図1a, 図1b)

投与開始時から13週までは毎週、その後は4週間毎に生存動物の体重を測定した。更に、臓器の対体重比の計算のため、計画屠殺直前に体重を測定した。

体重増加は、雄ではすべての投与群、雌では300ppmまで投与による有意な影響を受けなかった。雌の800ppm群では投与期間終了時に対照群との差は6~7%(統計学的な有意差なし)となった。対照群の体重より統計学的に有意に低かったのは1測定時のみであった。

図1a. 体重(雄)

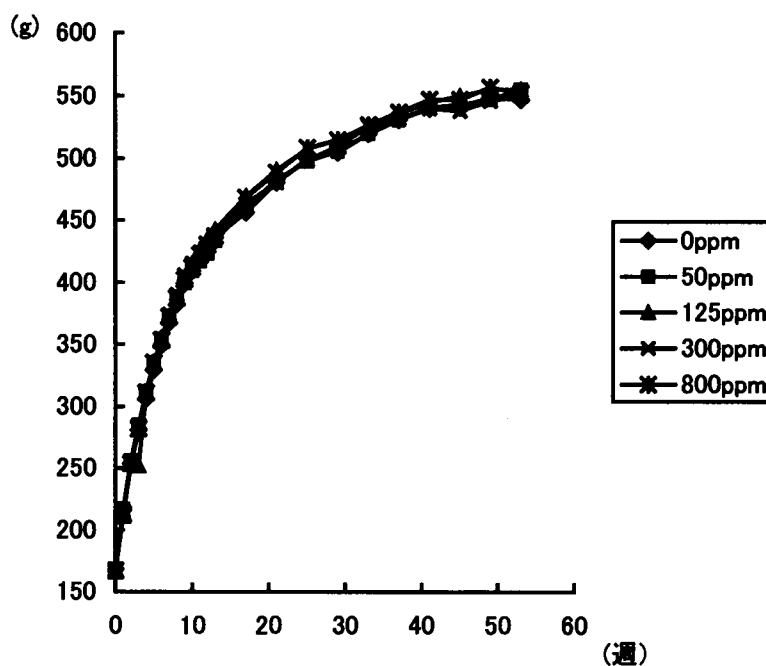
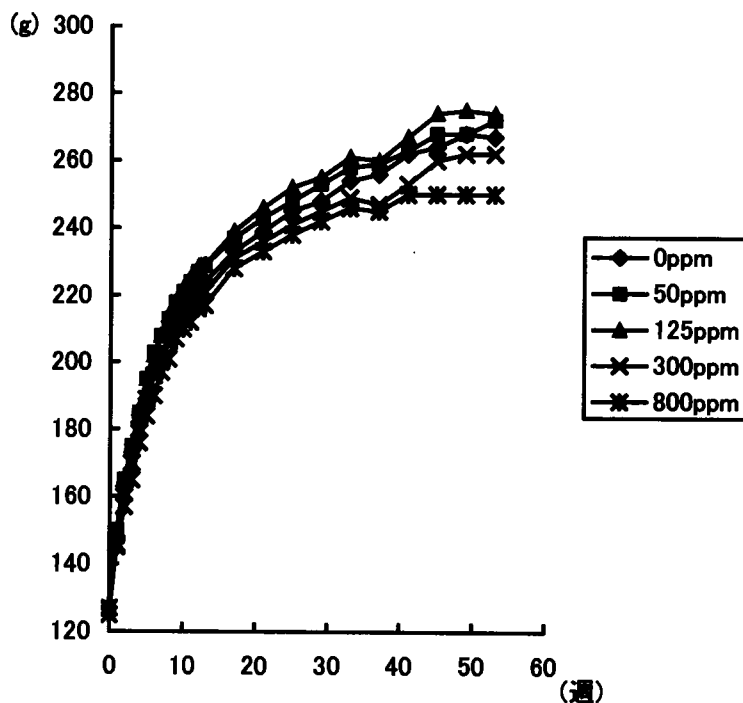


図 1b. 体重(雌)



4. 摂餌量及び検体摂取量(表 2)

摂餌量を全例について13週まで毎週1回の間隔で、その後は4週毎に1回の間隔で測定しこれを基に検体摂取量を算定した。

投与群の雌雄の平均摂餌量は対照群と比較して顕著な差がなかった。

各用量の検体摂取量比は、用量の比率にほぼ一致していた。

表 2 検体摂取量(mg/kg 体重/日)

投与量(ppm)		50	125	300	800
検体摂取量	雄	2.6	6.5	15.9	42.4
	雌	3.0	7.6	19.3	51.7

5. 飲水量

飲水量を4週間に1回の間隔で測定した。

飲水量には検体投与による影響は認められなかった。

6. 眼科学的検査 (表 3)

投与開始前に眼科学的検査をすべてのラットで行った。投与期間終了時に眼科学的検査を、全ての対照動物、300ppm 群のすべての雄及び 800ppm 群のすべての生存動物について行った。両眼の瞳孔反射の検査を最初に暗室で行った。Mydriaticum-Stulin®点眼剤で瞳孔を散大させた後に、間接検眼鏡によって眼球及び眼底の屈折組織を検査した。細隙灯を用いた眼の検査も行った。

投与期間終了時の眼科学的検査では、雄で 300ppm まで、雌では 800ppm まで眼に対する異常所見の著明な発現率の上昇は認められなかった。800ppm 群の雄では、変性性水晶体 (水晶体後囊混濁) および皮質水性裂を示した眼の割合がわずかに高かったが、これらの所見の発現頻度の増加が本検体の投与によるものとはみなさなかった。この結論は、本試験と同じ用量計画に従って更に多数の雄 (50 例) に本検体を投与した発がん性試験 (毒性資料 No. 原体-18) で、1 年後にこれらの所見の発現率が増加しなかったことに基づいた。

[申請者注:1996 年 3 月~2002 年 3 月の同施設における背景データは、水晶体後囊混濁/雄;0.0~2.1, 雌;0.0~1.0, 皮質水性裂:0.0~13.1, 雌;0.0~5.0 であった。雄 800ppm 群の水晶体後囊混濁の発現頻度はこの背景データを超えていたが、同施設で同時期に行われた発がん性試験の 12 ヶ月後のデータ (下表参照) は背景データ範囲内であった。従って、水晶体後囊混濁の発生には個体差が大きく、雄 800ppm におけるこの病変の発生頻度は偶発的に増加したものと考えられた。皮質水性裂に関しては、雌雄ともに背景データ範囲内に入っていた。]

表 3 顕著な眼科学的検査所見

性	発生頻度 (%) / 試験した眼									
	雄					雌				
用量 (ppm)	0	50	125	300	800	0	50	125	300	800
水晶体後囊混濁	0	-	-	0	7.5	0	-	-	-	0
皮質水性裂	5.0	-	-	7.5	10.0	0	-	-	-	0

- ; 検査せず

参考 ; ラット発がん性試験 (毒性資料 No. 原体-18)

用量 (ppm)	発生頻度 (%) / 試験した眼									
	0	50	125	300	800	0	50	125	300	800
性	雄					雌				
12 ヶ月後										
水晶体後囊混濁	0	1.0	2.0	0	2.0	0	0	0	0	0
皮質水性裂	4.1	5.1	8.0	11.3*	7.1	4.5	2.1	2.1	5.2	3.2

Fisher 検定 : *P<0.05, Cochran-Amitage 傾向検定;有意差なし (申請者により実施)

7. 機能観察検査 (FOB)

25 週目および 52 週目に機能観察検査と握力測定を各用量群の 10 匹について行った。

ホームケージ内、ハンドリング時、オープンフィールドおよび握力検査において、両検査時共に、検体を投与したラットで神経毒性を疑わせるような徴候、症状は認められなかった。

8. 臨床検査

任意に選抜した各群 10 匹(UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ(UDP-GT)のみ各群 5 例)の動物について下記に示す日程で血液一般検査、血液生化学的検査、尿検査及び肝組織中の酵素活性の測定を行った。

検査	実施週		
	14	27	53*
血液一般検査	14	27	53*
血液生化学	14	27	53
尿検査	14	27	53
肝組織中の酵素活性	54		

*;更に瀕死状態の動物について、白血球分画用に屠殺時に血液塗抹標本を作製した。

8-1. 血液学的検査 (表 4)

絶食、エーテル麻酔下の動物の眼窩静脈叢から採取した末梢血において、白血球分画、赤血球形態、赤血球数、白血球数、ヘモグロビン濃度(HB)、ヘマトクリット値(HCT)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)、平均赤血球容積(MCV)、血小板数(THRO)、網状赤血球数及びトロンボプラスチン時間(HQUICK)を測定又は算定した。

血液学的検査で、雄において平均 HCT (14、27 及び 53 週目) 及び平均 HB (53 週目) の有意な低下が 125ppm 以上で認められた。しかし、対照との差はわずかであり、用量依存性が認められず、これらの値はいずれも既存対照値の 2SD 範囲内*であった。したがって、これらの差は毒性学的に意味のないものと考えられる。他の項目にも、対照値と比べ統計学的に有意な差が散見された。これらの差は対照値と比べ小さく、投与量及び投与時点との関連性がそれぞれ認められなかったため、毒性学的に意味がないものと考えられる。また、切迫剖検例を含む全ての例で白血球分画には投与と関係のある差が認められなかった。

以上のように、血液学的検査項目においては、検体に関連したと考えられる影響は認められなかった。

*:HCT(g/L) 雄/12~25 週齢;0.431-0.500, 26~35 週齢;0.431-0.518, 36~60 週齢;0.421-0.525

HB(g/L) 雄/12~25 週齢;144-169, 26~35 週齢;140-168, 36~60 週齢;134-170

表 4 血液学的検査 (有意差の認められた項目)

投与量 ppm	50			125			300			800		
検査時期(週)	14	27	53	14	27	53	14	27	53	14	27	53
雄												
赤血球 ^D								↓95	↓95			
HB ^D				↓95	↓96	↓95		↓96	↓95			↓95
HCT ^D				↓92	↓94	↓94	↓95	↓95	↓93	↓96	↓96	↓95
MCV ^D	↓95	↓97	↓96	↓95	↓97	↓96						
MCHC ^D				↑102			↑102					
THRO ^D										↑112		
雌												
HQUICK ^{K+U}						↑109						
リンパ球 ^{K+U}							↑132					
単球 ^{K+U}									↓56			

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの、

↑ ↓ : P<0.05, ▲ ▼ : P<0.01 (D:分散分析+Dunnett, K+U; Kruskal-Wallis+ajust U 検定による)

8-2. 血液生化学的検査 (表 5)

以下の項目について測定した。なお、これらの血液サンプルは、グルコース測定用 (無麻酔下で絶食した動物の尾静脈から採血し、除蛋白処理) を除き、エーテル麻酔下で絶食した動物の眼窩静脈叢から採血した。

酵素

アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALAT), アルカリホスファターゼ (ALP), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ASAT), γ-グルタミルトランスフェラーゼ (GGT)

基質

アルブミン (ALB), 総ビリルビン (BIL-t), コレステロール (CHOL), クレアチニン (CREA), 蛋白 (PROT), トリグリセリド (TRIGL), 尿素 (UREA), アルブミン/グロブリン比 (ALB/GLOB), グルコース

電解質

塩素 (Cl), カルシウム (Ca), 無機リン (P), カリウム (K), ナトリウム (Na)

甲状腺機能関連項目

トリヨードチロニン (T3), チロキシン (T4), チロキシン-結合能 (TBC; 53 週), 甲状腺刺激ホルモン (TSH)

検査の結果は以下の通りであった。

T3 濃度は、雄では 800ppm 群の 14、27 週目、300ppm 群の 27 週目に統計学的に有意に上昇し、TSH 値は雌雄とも 800ppm 群で常に最も高かった (統計学的な有意差なし)。T4 濃度及び TBC 値は対照値と有意差がなかった。

CHOL 濃度は 800ppm 群の雌雄で常に低い傾向を示し、雌では 53 週目に統計学的に有意に低下した（雄では統計学的有意差なし）。本検体の作用機作が脂質合成障害であることから、この低下が本検体の影響であることを必ずしも否定できない。しかし、個体値がいずれも背景データ範囲内にあることから、有害関には達していない変動と考えられた。

ASAT は 125ppm 群以上の雌で 53 週目に有意な低下した。しかし、この変化に用量依存性が認められずまた対照値が比較的高かったためであり、これは偶発的なもので、検体の投与とは無関係と考えられた。全時点で 800ppm 群の雌雄の末梢血の BIL-t の有意な低下と、27 週目及び 53 週目に 800ppm 群の雌の有意なタンパク質濃度の低下が認められた。300ppm 群の雄における 53 週目の BIL-t の低下及び 300ppm 群の雌における 27 週目の PROT の低下は、有意差が認められたのは雌雄それぞれ 1 時点のみであり、差は小さく、関連所見が認められなかったから毒性学的に意味のないものと考えられた。300ppm 及び 800ppm 群の雌における 14 週目の CREA の有意な低下は、対照との差が小さく用量依存性が認められなかったから毒性学的に意味のないものと考えられる。

その他認められた統計学的な有意差は、投与量及び投与時点との関連性がそれぞれ認められなかったので検体投与の影響とは考えられなかった。

表 5 血液生化学的検査（有意差の認められた項目）

投与量 検査週	50ppm			125ppm			300ppm			800ppm		
	14	27	53	14	27	53	14	27	53	14	27	53
雄												
BIL ^{K+U}									↓ 82	↓ 87	↓ 81	↓ 68
T3 ^{K+U}								↑ 135		↑ 117	↑ 162	
TSH ^{K+U}										(112)	(151)	(116)
Ca ^V	↑ 103			↑ 102	↑ 102		↑ 104			↑ 103		
P ^V			↓ 90			↓ 87			↓ 88			
雌												
ASAT ^V						↓ 55			↓ 65			↓ 55
CHOL ^V								↓ 75				↓ 66
CREA ^D							↓ 88			↓ 90		
BIL ^{K+U}				↓ 82	↓ 72					↓ 76	↓ 60	↓ 59
PROT ^D								↓ 94			↓ 93	↓ 90
TSH ^{K+U}										(172)	(140)	(143)
Na ^V									↓ 99			
Ca ^V								↓ 97				
P ^V		↓ 72	↓ 73			↓ 81			↓ 80			

↑ ↓ : P<0.05, ↑ ↓ : P<0.01 (K+U ; Kruskal-Wallis+ajust U 検定, W; Adjusted Welsh test, D; 分散分析+Dunnett), 表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの () は統計学的に有意差なし

8-3. 尿検査(表 6)

各動物とも血液採取数日前に、16 時間蓄尿した。サンプリング中は、給水のみ行い、給餌しなかった。潜血、ビリルビン、糖、ケトン体、pH、蛋白、沈渣、ウロビリノーゲンを半定量的に、比重、尿量、蛋白濃度、採取した尿中の蛋白全量を定量的に測定した。

定量的尿検査も半定量的尿検査も投与に起因する影響を示さなかった。
尿沈渣は雌雄とも異常を示さなかった。

8-4. 肝組織中の酵素活性(表 6)

剖検時に各群の最初の雌雄各 10 匹の生存動物から採取した肝臓のホモジネート液について下記の項目を測定した：

アミノピリン-N-デメチラーゼ (N-DEM), p-ニトロアニソール-O-デメチラーゼ (O-DEM), チトクロム P450 (P450), UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ (UDP-GT)

N-DEM 活性の測定において、50、300 及び 800ppm 群の雄で有意な低下が認められた。しかし、用量依存性が認められず、対照との差は比較的小さかった。したがってこれらの差は偶発的なもので、検体の投与とは無関係と考えられる。肝臓の P-450 濃度は 800ppm 群の雌では軽度だが、有意に上昇した。肝臓組織の UDP-GT 活性については、800ppm 群まで雌雄ともに有意な変化は認められなかった。

表 6 肝組織中の酵素活性 (有意差の認められた項目)

性別	雄				雌				
	投与用量 (ppm)	50	125	300	800	50	125	300	800
N-DEM		↓76		↓70	↓74				
P450									↑114

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

↑↓ : P<0.01 (Adjusted Welsh test)

9. 臓器重量 (表 7)

試験最終屠殺例の脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣及び卵巣の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

腎対体重比は 800ppm 群の雌では軽度だが統計学的に有意に増大した。対照との差が小さく、尿検査でも病理組織学的検査でも腎臓に対する投与の影響を示す証拠が認められなかったことから、これは毒性学的に意味がないものと考えた。

表7 臓器重量 (有意差の認められた項目)

性別	雄				雌			
	50	125	300	800	50	125	300	800
投与用量 (ppm)	50	125	300	800	50	125	300	800
肝/実重量		↑110						
腎/対体重比								▲110

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの

↑ : P<0.05, ▲ : P<0.01 (分散分析+Dunnnett Test)

10. 剖検

途中死亡動物及び最終計画屠殺動物の全動物を剖検した。

投与期間終了時の剖検では800ppm群の雄で肝肥大の発現頻度の軽度上昇が認められた (発現頻度; 0, 50, 125, 300, 800ppm; 0/2/0/1/4)。

雌では、子宮に液状物質が貯留している例が800ppm群で比較的頻繁に認められた (2/3/2/2/7)。子宮拡張の発現率は800ppmで上昇した (2/4/1/0/7)。神経病理学的検査計画例 (各群5例) の剖検の際に認められた発現率 (3/0/1/0/0) を考慮すると、800ppm群と対照群の発現率の差はわずかとなった (5/4/2/0/7)。また、組織学的検査において子宮拡張の発現率及び程度が全群で同様であり (病理組織学的検査の項目参照)、剖検時にみられたこの所見を追認することはできなかった。従って、この所見は偶発的なものと考えられた。

両側の副腎の褐色化が800ppm群の雌で認められた (発現頻度 : 0/1/0/0/9)。雄では副腎に投与と関係のある変化は認められなかった。

他の肉眼所見はすべて各群に均一に分布していた。

11. 病理組織学的検査

最終計画屠殺動物について投与期間終了時に、ジエチルエーテル麻酔下に放血によって屠殺し、下記の表に示す臓器及び組織を全体または部分的に採取し、10%緩衝ホルマリンで固定した。

副腎、大動脈、脳 (大脳、小脳、橋/延髄)、腸管 (十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、腸管残余)、精巣上体、食道、眼球 (眼瞼を含む)、外涙腺、大腿骨 (骨髓、膝関節を含む)、ハーダー氏腺、頭-鼻-咽頭、心臓、腎臓、喉頭、肝臓、肺、リンパ節 (腸間膜及び顎下)、乳腺、視神経、卵巣、輸卵管、膀胱、脳下垂体、前立腺、唾液腺、坐骨神経、精のう (凝固腺を含む)、骨格筋、皮膚 (乳腺部)、脊髄 (3部位)、脾臓、胸骨、胃、精巣、胸腺、甲状腺 (上皮小体)、舌、気管、尿管、尿道、膀胱、子宮 (頸部を含む)、膺、外耳道腺、個体識別部位 (入れ墨尾)、異常部位

神経病理学的検査のため各群雌雄5例は50mg/kg体重のナルコレン腹腔内投与

により麻酔し、左心房から亜硝酸ナトリウムを含有するリン酸緩衝液を一気に注入し、次いで、リン酸緩衝液中 3%ホルムアルデヒド+1%グルタルアルデヒドを用いて下記の組織について in situ 固定した。

脳、脊髄（頸髄、胸髄、腰髄、馬尾）、脊髄神経根線維及び神経節（後根及び前根、頸髄；後根神経節及び前根神経節、腰髄）、ガッセル神経節、眼球、視神経、腓腹筋、末梢神経（坐骨神経、脛骨神経及び腓腹神経）

11-1. 非腫瘍性病変（表 7）

主な非腫瘍性病変は、子宮、甲状腺、副腎、下垂体でみられた。

子宮

剖検の際に子宮拡張がやや高い発現率で認められたが、病理組織学的検査では子宮拡張の発現率も程度も全群で同様であり、剖検所見の結果を担保できるものではなかった。子宮内膜炎は 800ppm 群でやや増加した。子宮内膜上皮細胞の肥大の程度は 800ppm ではやや高かったが、発現率はすべての用量群でほぼ同等であった。

甲状腺

300ppm 群、800ppm 群の雄と 800ppm 群の雌の甲状腺で、ろ胞細胞肥大とコロイド変化(凝集)の頻度及び程度が上昇した。これらの甲状腺の変化は、肝 UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ (UDP-GT) 誘導に起因する T4 の胆汁註への排泄増加、代償性下垂体 TSH 分泌の増加及び甲状腺の刺激の結果であると評価される。本試験中測定した末梢血中の T3、T4、TSH 及び UDP-GT 値に変化がみられていないことから、今回認められた甲状腺の病変を上記の機序要因によるものかどうか完全に証明できたわけではない。しかしながら、本試験で証明されなかった現象 (UDP-GT を含む肝ミクロゾーム酵素誘導、T4 及び T3 の濃度低下) が起こることが 90 日間反復経口毒性試験 (毒性資料 No. 9) 及び 4 週間反復経口毒性試験 (毒性資料 No. 9 に添付) で既に明らかにされているので、この推察は妥当であるものと考えられた。

副腎

副腎では、800ppm 群の雌で束状帯の細胞質好酸性化が認められ、剖検時に認められた両側副腎の褐色変化とほぼ対応していた。これらは小空胞の減少を示唆するものと考えられた。

下垂体

800ppm 群の雄では、下垂体前葉の限局性過形成の発現率が対照群よりわずかに高かった。これは偶発的なものと考えられた (腫瘍性病変の項参照)。

表7 明らかな非腫瘍性病変(臓器/群/性)

性	雄					雌				
	0	50	125	300	800	0	50	125	300	800
用量(ppm)										
臓器/所見	動物数									
子宮 [§]	-	-	-	-	-	23	20	21	20	20
-拡張	総数					5	7	4	3	9
	程度2					1	1	2	2	3
	程度3					2	3	1	0	4
	程度4					2	3	1	1	2
-炎症	総数					3	4	4	2	7
	程度2					2	0	2	1	4
	程度3					1	3	1	1	3
	程度4					0	1	1	0	0
-内膜上皮の肥大	総数					8	8	7	6	8
	程度2					8	8	7	6	5
	程度3					0	0	0	0	2
	程度4					0	0	0	0	1
甲状腺	20	20	19	20	20	20	20	20	20	20
-ろ胞細胞肥大	総数					1 [#]	1	0	8 ^{**}	9 ^{**}
	程度2					1	1	0	6	8
	程度3					0	0	0	2	1
-コロイド変化(凝集)	総数					10 [#]	13	11	15	17 [*]
	程度1					6	5	3	3	4
	程度2					3	7	6	7	8
-限局性ろ胞細胞過形成	総数					0	0	0	0	1
	程度2					0	0	0	0	1
副腎	20	20	19	20	20	20	20	20	20	20
-束状帯細胞質好酸性化	総数					0	0	0	0	7 ^{**}
	程度2					0	0	0	0	6
	程度3					0	0	0	0	1
下垂体	20	20	19	20	20	20	20	20	20	20
-限局性過形成(前葉)	総数					0	1	0	1	3
	程度1					0	1	0	0	0
	程度2					0	0	0	0	0
	程度3					0	0	0	1	3

[§]:病理組織学的検査用動物の所見も含む,

[#]:P<0.05(Cochran-Amitage 傾向検定), *:P<0.05, **:P<0.01(Fisher 検定(片側))

11-2. 腫瘍性病変 (表8)

下垂体前葉の腺腫が800ppm群の雄2例に現れたが、雌ではほぼ全群に均一に分布していた。この800ppm群の雄で認められた下垂体前葉の腺腫の発現率の軽度上昇は、過形成の増加がみられなかったこと、また同じ用量でより長期間(2年間)投与され、より多数の動物を用いたラット発がん性試験(毒性資料

No. 18) では増加しなかったことから偶発的なものと判断された。

甲状腺ろ胞細胞腺腫及びC細胞腺腫が800ppm群の雄においてそれぞれ1例及び2例にみられた。これら所見も、上述のラット発がん性試験では増加しなかった。従って、これらの腫瘍も投与に関連したものではなく、偶発的にみられたものと考えられた。

表 8-腫瘍性病変を担う動物数

性別 用量 (ppm) 臓器/所見		雄					雌				
		0	50	125	300	800	0	50	125	300	800
脳	検査数	20	0	0	0	20	20	2	0	2	20
	上衣腫 (b)	0	-	-	-	1	0	0	-	0	0
下垂体	検査数	20	20	19	20	20	20	20	20	20	20
	前葉腺腫 (b)	0	0	0	0	2	1	2	0	3	1
甲状腺	検査数	20	20	19	20	20	20	20	20	20	20
	ろ胞細胞腺腫 (b)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	C-細胞腺腫 (b)	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0
胸腺	検査数	20	10	11	19	20	20	15	20	20	20
	良性胸腺腫 (b)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
血液リンパ網内系	検査数	0	0	0	0	0	20	1	0	0	20
	悪性リンパ腫 (m)	-	-	-	-	-	0	1	-	-	0
皮膚	検査数	20	0	1	0	20	20	3	0	2	20
	平滑筋肉腫 (m)	0	-	0	-	0	1	0		0	0
子宮 [§]	検査数	/	/	/	/		23	20	21	20	20
	腺腫 (b)						1	0	0	0	0
	平滑筋腫 (b)						0	1	0	0	0
	間質ポリープ (b)						6	2	2	1	2

[§]:病理組織学的検査用動物の所見も含む, (b); 良性, (m); 悪性傾向検定 (Peto 法), Fisher 検定 (片側) を実施

11-3. 神経病理学的検査

各群雌雄5例における神経毒性検索用の病理組織学的検査では、灌流固定したいずれの神経組織、腓腹筋、眼球に投与に関連した所見は認められなかった。

以上、本剤のラットに対する1年間飼料混入投与による反復経口毒性試験における本剤の影響として、雄では300ppm群以上で、T3の増加、甲状腺ろ胞細胞の肥大及びコロイド変化(凝集)の頻度の増加がみられた。また800ppm群ではTSHの増加(統計学的有意差なし)もみられた。

一方雌では、800ppm群で体重減少、TSHの増加(統計学的有意差なし)、甲状腺のろ胞細胞の肥大及びコロイド変化(凝集)、副腎の褐色化及び束状帯の細胞質好酸性化の頻度の増加が認められた。300ppm群では、検体投与に起因した所見は認められなかった。

神経行動学的変化、神経病理学的検査の結果、本剤の神経毒性作用は雌雄共に認められなかった。

検体投与に起因したと考えられる腫瘍性病変も認められなかった。

従って、本試験条件下におけるスピロメシフェンの雌雄ラットに対する無毒性量(NOEL)は、飼料中濃度が雄では125ppm(6.5mg/kg体重/日)、雌では300ppm(19.3mg/kg体重/日)であった。

スピロメシフェンのイヌにおける1年間反復経口投与毒性試験

(毒性資料 No. 原体-17)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：2002年1月14日

検体の純度：

試験動物：ビーグル犬、1群雌雄各4匹

投与開始時；23週齢 平均体重；雄 7.5kg 雌 6.8kg

投与期間：12ヵ月(2000年4月～2001年4月)

投与方法：

検体を0(対照群)、50、400、4000ppmとなるように飼料と混和し、12ヵ月間雌雄各4匹のイヌに投与した。

飼料は制限給餌(第1週～第6週；250g/日、第7週～第54週；280g/日)とし、水は自由に摂取させた。検体を添加した飼料は、1週間に1回調製した。投与直前に検体混合飼料(対照群は飼料のみ)に微温湯の水道水を1：1の割合で添加し家庭用ミキサーで均一なペースト状として動物に毎日与えた。

投与用量設定の根拠；

試験項目及び結果：

1. 臨床症状

全動物の外観と行動を毎日観察した(原則として、臨床症状及び生死を少なくとも1日2回(週末と休日は1回)観察した。)

検体に起因すると考えられる所見は認められなかった。

2. 死亡率

全試験期間を通じて死亡例は認められなかった。

3. 体重

週1回体重を測定した。

雄では対照群に比べ50ppm群以上でやや増体重抑制が認められた。400ppm群で最も体重増加抑制を示したが、最高投与量群である4000ppm群の体重増加量はむしろ50ppm群より大きく、明らかな用量相関性は認められなかった。雌の体重増加は、対照群に比べて4000ppm群でやや増加遅延が認められた。一方、試験終了時(53週目)には、4000ppm群の雌雄の平均体重は、この齢期のビーグル犬の背景対照値と同等であった(雄:平均:11.73kg, s=1.32;雌:平均:10.82kg, s=1.54)。従って、雌雄の体重増加量に認められた変化は4000ppmまで毒性学的な意義はないものと考えられた。

群	性別	投与前(-1週)	投与後 (第53週)	増加量 (-1~53週)
0ppm	雄	7.4kg	12.3kg	+ 4.9kg
	雌	6.7kg	11.4kg	+ 4.7kg
50ppm	雄	7.5kg	11.0kg	+ 3.5kg
	雌	7.1kg	12.1kg	+ 5.0kg
400ppm	雄	7.5kg	10.3kg	+ 2.8kg
	雌	7.0kg	11.3kg	+ 4.3kg
4000ppm	雄	7.6kg	11.3kg	+ 3.7kg
	雌	6.6kg	10.5kg	+ 3.9kg

図1. 体重(雄)

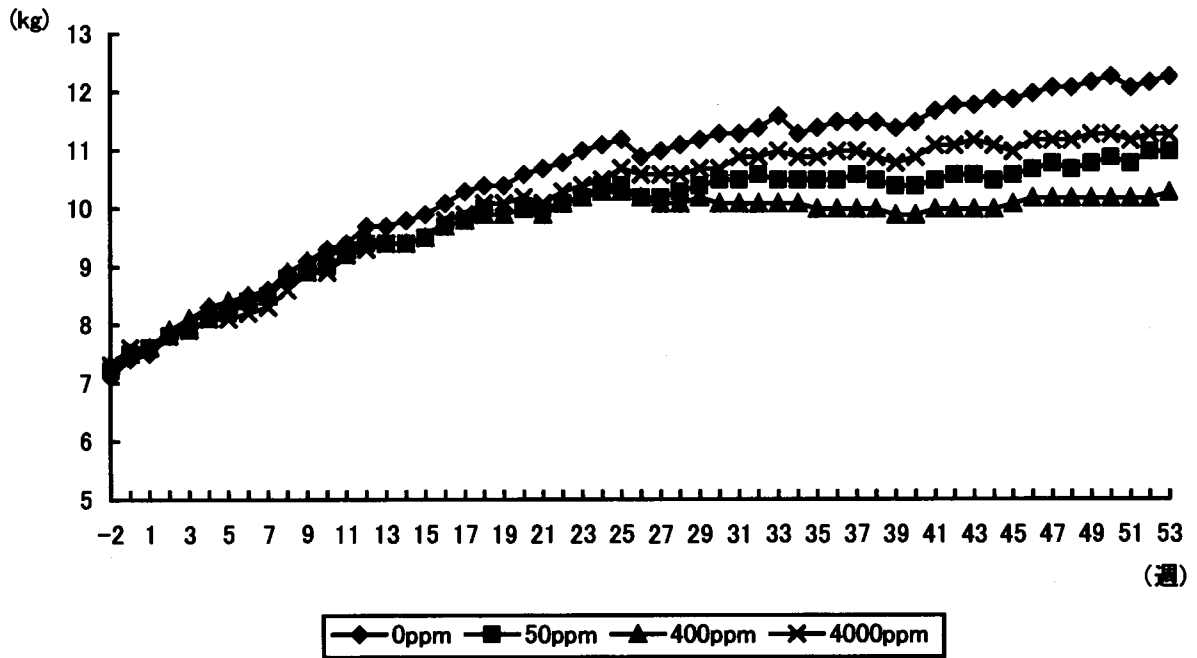
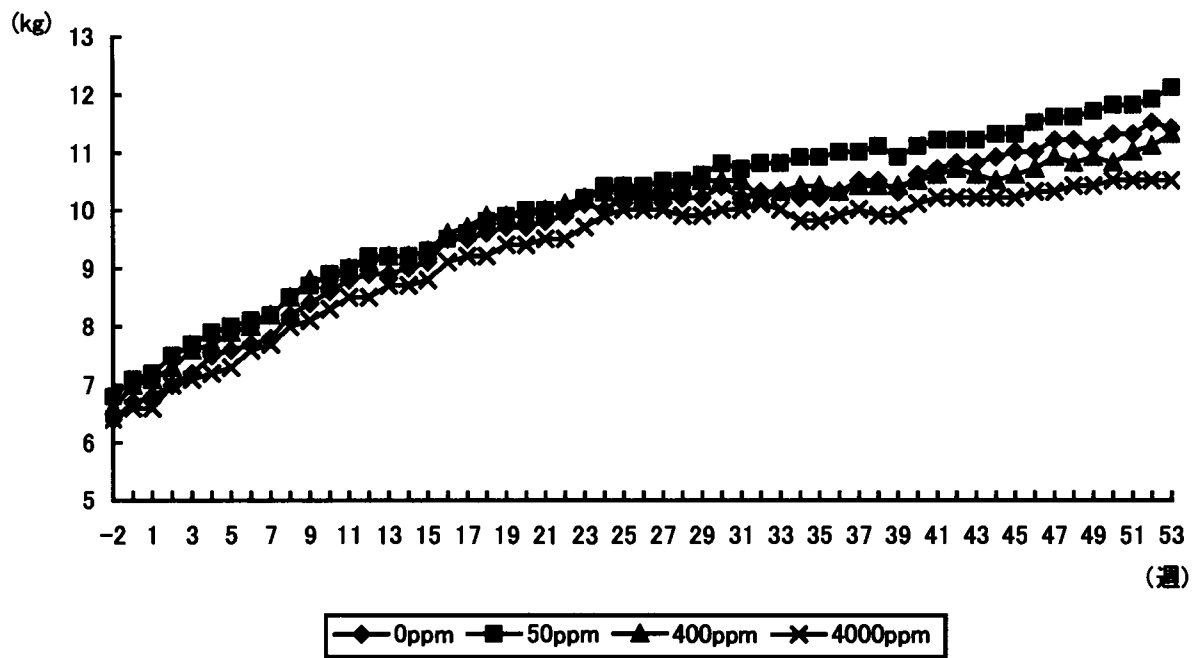


図1. 体重(雌)



4. 摂餌量及び検体摂取量 (表 1)

毎日、摂餌量を測定した。

投与期間中の摂餌量に対照群と用量群間に差は認められなかった。

投与期間中の平均検体摂取量(mg/kg/日)は以下のとおりであった。

表 1 検体摂取量(mg/kg 体重/日)

投与用量(ppm)		50	400	4000
検体摂取量	雄	1.4	11.5	109
	雌	1.4	10.8	117

5. 神経学的検査及び体温測定

反射検査(瞳孔、角膜、膝蓋腱、伸筋、体位及び屈筋)及び体温の測定を、試験開始前(-2週)、投与後13、26、39、52週に実施した。

どの検査時点においても、検体に起因する所見は認められなかった。

6. 眼科学的検査

全動物での眼科学的検査は、試験開始前(-2週)、投与後13、26、39、52週に実施した。

どの検査時点においても、検体に起因する所見は認められなかった。

7. 心電図検査および血圧

全動物について、試験開始前(-2週)、投与後13、26、39、52週のそれぞれ給餌後2時間に実施した。

どの検査時点においても心電図の波形に変化は認められなかった。また血圧、心拍数にも影響はみられなかった。

8. 血液学的検査 (表 2)

試験開始前(試験-2週目)及び試験6、13、26、39及び52週目に、血液を頸静脈から採取し、以下の項目の測定を行った。

白血球数, 赤血球数, ヘモグロビン量(Hb), ヘマトクリット値(HCT), 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), メトヘモグロビン量, 網状赤血球数, 血小板数(THRO), ハイイツ小体, トロンボプ

ラスチン時間 (PT), 部分トロンボプラスチン時間 (PTT) 及び赤血球沈降速度 (ESR), 白血球百分率

いくつかの項目に有意差が認められたが、これらの項目のいずれにおいても用量、経時的な関連性がなく、また全て背景データ範囲内*にあったことから、本検体の影響ではないものと考えられた。

従って、血液学的検査項目において、本検体の影響と考えられる項目は認められなかった。

表 2 血液学的検査 (有意差の認められた項目)

用量	50ppm						400ppm						4000ppm							
	時期	-2	6	13	26	39	52	-2	6	13	26	39	52	-2	6	13	26	39	52	
雄																				
LYM							(104)													
EOS	(106)		↑ 114											(97)		↑ 187			↑ 171	
赤血球	(100)				↓ 88	↓ 89	(107)				↓ 91	↓ 87	↓ 90	(112)					↓ 86	↓ 89
Hb	(101)				↓ 88	↓ 90	(109)					↓ 88	↓ 90	(115)					↓ 88	↓ 89
HCT	(100)			↓ 92	↓ 88	↓ 90	(109)						↓ 89	↓ 91	(114)				↓ 87	↓ 90
THRO														(113)		↑ 144	↑ 139	↓ 158	↑ 155	
PTT														(91)		↓ 92	↓ 94			
雌																				
白血球														(85)						↑ 130
赤血球	(103)	↓ 93					(100)	↓ 87	↓ 88			↓ 87		(105)	↓ 90	↓ 90				↓ 90
Hb							(100)	↓ 87	↓ 89			↓ 87		(105)	↓ 90	↓ 90				
HCT							(101)	↓ 87	↓ 90			↓ 87		(105)	↓ 89	↓ 90				
THRO														(108)		↑ 126				↑ 128
PT							(100)				↓ 85									

LYM: リンパ球, EOS; 好酸球

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

↑ ↓ : p<0.05, ▲ ▼ : p<0.01 (Bartlett+Dunnette の多重比較: 申請者により実施)

*背景データ (主な項目):

赤血球 (10E12/L); 雄 40 週 ~ 120 週齢 / 5.62 ~ 8.22

Hb (g/L); 雄 40 週 ~ 120 週齢 / 124 ~ 187

HCT (L/L); 雄 40 週 ~ 120 週齢 / 0.376 ~ 0.566

THRO ((10E9/L); 雄 27 週 ~ 39 週齢 / 163 ~ 433, 40 週 ~ 120 週齢 / 141 ~ 419

8. 血液生化学的検査 (表 3)

試験開始前(試験-2週目)及び試験 6、13、26、39 及び 52 週目に、血液を頸静脈から採取し、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(ASAT), アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALAT), アルカリホスファターゼ(ALP), グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GLDH), γ -グルタミルトランスフェラーゼ(GGT), 乳酸脱水素酵素(LDH), クレアチンキナーゼ(CK), 血糖(GLUC), コレステロール(CHOL), トリグリセリド(TRIGL), クレアチニン(CREA), 尿素(UREA), 総ビリルビン(BILI-t), 総蛋白(PROT), アルブミン(ALB), 血清電解質 (Na, K, Ca, CL, P, Fe 及び Mg) 並びに甲状腺ホルモンのトリヨードチロニン(T3), チロキシン(T4), チロキシン結合能(TBC)

4000ppm 群において ALP 活性の増加が雌雄共に認められ、本検体の影響と考えられた。一方、GLDH 活性の上昇が 4000ppm 群の雌でみられたが、これは 1 例が 26 週目以降から特異的に高値を示したためであり、この例について第 53 週に再度測定した結果、低値であったこと(52 週/16.0U/L, 53 週 6.7U/L)から、本検体の影響とはみなさなかつた。90 日間反復投与毒性試験(毒性資料 No. 10, 11)でみられたものと同様に、T4 の減少が雌雄ともに認められた。これは肝薬物代謝酵素誘導による T4 の代謝/排泄によるものであり、検体の影響と考えられた。病理組織学的検査において、甲状腺に影響は認められていないことから、この影響は甲状腺に対して器質的な有害作用ではないものと考えられた。他に認められた統計学的に有意な変動には明らかな用量および時間的な関連性が認められないことからいずれも検体に起因するものとは考えられなかつた。

表3 血液学的検査 (有意差の認められた項目)

用量 時期	50ppm						400ppm						4000ppm					
	-2	6	13	26	39	52	-2	6	13	26	39	52	-2	6	13	26	39	52
雄																		
ALP													(84)	▲251	↑*311	↑*599	▲398	▲*581
LDH							↑148											
CREA													(106)					↓85
UREA													(110)					↓68
ALB													(108)			↓88	↓85	↑118
Na	(99)				↓79		(100)				↓99							
K	(96)		↓93			↓94	(98)		↓93	↓91	↓89	↓88	(111)		↓93	↓89		↓92
P	(112)				↓77		(109)				↓71		(109)					↓79
Mg							(94)		↓87				(100)		↓88		↓91	
T3													(105)					↑131
T4													(96)	↓56				↓34
TBC													(104)	↑104				
雌																		
ALP													(102)	(373)	(488)	(557)	(678)	(735)
GLDH													(111)	↑130		▲175	↑179	
LDH							↑109						(111)	▲203				
CK													(132)	↑251				
GLUC													(98)		↑101			
CREA	↑114												(106)					↓88
PROT	(98)	↓93	↓94															
ALB													(105)		↓90	↓89	↓85	↓88
Na													(100)					▲102
K	(105)					↓88							(102)					↓90
Mg	(99)		↓84										(108)		↓86			
T4													(122)	↓56				↓44

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの。

↑↓: p<0.05, ▲▼: p<0.01 (Bartlett+Dunnetteの多重比較: 申請者により実施)

↑*↓*: p<0.05, ▲*▼*: p<0.01 (Bartlett+non-parametric Dunnetteの多重比較: 申請者により実施)

9. 肝臓組織の酵素活性及びトリグリセリドの測定 (表4)

投与終了後に全動物の肝臓組織の N-デメチラーゼ (N-DEM)、O-デメチラーゼ (O-DEM)、P450 及びトリグリセリド (TRIG) を測定した。

N-DEM の増加が雌雄ともに 400ppm 群以上で、O-DEM、P450 の増加は雄では 400ppm 群以上、雌では 4000ppm 群で認められた。この変化は異物を投与した際に起こる代謝亢進を意味するものと考えられた。少なくとも 400ppm 群での変化は、血液生化学検査、病理組織学的検査において肝臓に影響が認められていないことから、有害作用ではないものと考えた。尚トリグリセリドには用量に依存した増加が認められていないため、検体の影響とはみなさなかつた。

表 4 肝薬物代謝酵素の測定 (有意差の認められた項目)

性別 用量(ppm)	雄			雌		
	50	400	4000	50	400	4000
N-DEM*		▲201	▲400		▲254	▲599
O-DEM**		▲163	▲248			▲200
P450		↑126	▲196			▲255
TRIG		▲126	↑121			

※：基質/アミノピリン ※※：基質/4-ニトロアニソール

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

↑： p<0.05, ▲： p<0.01 (Bartlett+Dunnette の多重比較：申請者により実施)

10. 尿検査

試験開始前(試験-2週目)及び試験 6、13、26、39 及び 52 週目に、全ての動物について尿検査を行った。項目は以下のとおりであった。

尿量、比重、pH、クレアチニン、NA、糖、蛋白、潜血、ビリルビン、ケトン体、ウロビリノーゲン及び尿沈渣(細菌、白血球、赤血球、上皮細胞、三リン酸塩及びシュウ酸塩)について尿検査を実施した。

尿検査の結果、いずれの項目にも検体投与に関連した変動は認められなかった。

11. 本検体及びその主要代謝物の血漿中濃度の測定 (表 5)

12. 剖検

試験終了時に、全動物を Narcoren®麻酔下で放血致死させ剖検した。

剖検の結果、検体投与に関連した肉眼的病理所見は認められなかった。

13. 臓器重量(表 6)

全例について、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、卵巣、甲状腺、副腎、胸腺、前立腺、脳、下垂体、膵臓、子宮、精巣上体、胆のう(胆のう内容物を取り除いたもの)の重量測定と対体重比について算出した。

肝重量において 4000ppm 群の雌雄(雌では対体重比のみ統計学的に有意)で増加がみられた。薬物代謝酵素誘導や肝細胞質の変化が認められていることから、本検体の影響と考えられた。精巣上体の実重量に統計学的に有意な減少が 4000ppm 群で認められた。病理組織学的には精巣上体に及ぼす影響は認められなかったため、精巣上体の重量における変化は毒性学的に意義のないものと変化と考えられた。

表 7 臓器重量 (有意差の認められた項目)

性別 用量 (ppm)	雄			雌		
	50	400	4000	50	400	4000
肝実重量			▲137			
肝対体重比			▲155			↑*131
精巣上体実重量			↓74			

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

↓ : p<0.05, ▲ : p<0.01 (Bartlett+Dunnette の多重比較 : 申請者により実施)

↑* : p<0.05 (Bartlett+non-parametric Dunnette の多重比較 : 申請者により実施)

14. 病理組織学的検査 (表 7)

全動物を対象として、以下の臓器について病理標本を作製した。

副腎、大動脈、骨髄(円柱)、脳(大脳、小脳、橋/延髄)、精巣上体、食道、眼、大腿骨、胆嚢、心臓(乳頭筋)、腸(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(下顎、腸間膜)、鼻、視神経、卵巣、卵管、膵臓、耳下腺、咽頭、下垂体、前立腺、坐骨神経、骨格筋(大腿)、皮膚(乳腺部)、脊髄(頸部、胸部、腰部)、脾臓、胸骨、胃(前胃、腺胃)、顎下腺、精巣、胸腺、上皮小体を伴う甲状腺、舌、扁桃腺、気管、膀胱、子宮頸部を伴う子宮、臍、身体標識(入墨)及び肉眼的変化が認められた全ての臓器

これらは 10%中性緩衝ホルマリン及び/又は Davidson の溶液中で固定した。肺 1 葉については固定前に気管支内経路で 10%ホルマリンを注入した。全てのスラ

イドはヘマトキシリン及びエオジン(H&E)で染色した。ホルマリン固定の肝臓標本から作製した凍結切片はOil Red O (ORO)で染色した。

4000ppm 群のほとんど全ての動物(雄 4 匹、雌 3 匹)の肝臓に細胞質変化(細胞質が密になり均質化)が認められた。またこの用量群では、対照群、50ppm 群、400ppm 群に比べると、細胞質の封入体/空胞の発生頻度が高かった。副腎では、副腎の束状帯に比較的小さい細胞(軽微又は軽度)が認められた。また、副腎球状帯又は束状帯の細胞質に空胞が認められた。しかし、これらの変化の分布には、投与との関連性はまったく認められなかった。精巣では限局的な精細管上皮の扁平化が対照群および 400ppm 群の各 2 例に軽微かつ片側の所見として認められ、4000ppm 群では 2 例(それぞれ程度は軽微, 軽度)で両側の精巣に観察された。また巨細胞が 400ppm 群(軽度)、4000ppm 群(軽微)のそれぞれ各 1 例で認められた。これらの所見は用量群に均等に分布しており、この系統及び齢期のイヌに認められる自然発生的変化として知られている。従って、これらの変化は検体投与との関連性は否定できるものと考えられた。

表 8 主要な病理組織学的所見

性別	雄				雌			
項目 用量(ppm)	0	50	400	4000	0	50	400	4000
検査動物	4	4	4	4	4	4	4	4
肝臓								
細胞質変化#	0 ⁺	0	0	4 [*]	0 ⁺	0	0	3
封入体/空胞	2	2	1	4	0 ^{**}	0	1	4 [*]
副腎								
束状帯/小細胞	1	1	0	2	1	0	0	2
束状帯/空胞化	0	0	0	0	2	0	1	1
球状帯/空胞化	1	1	1	0	1	2	0	0
精巣								
精細管上皮の扁平化	2	0	2	2	/	/	/	/
精細管形成不全	0	0	0	1	/	/	/	/
上皮空胞形成	1	0	1	1	/	/	/	/
巨細胞	0	0	1	1	/	/	/	/
顎下リンパ節								
円形細胞浸潤	3 ⁺	1	0	1	0	0	1	1
下垂体								
のう胞	0	0	4	1	0	1	1	0

+ : p<0.05 ++ : p<0.01 (Cochran-Amitage 傾向検定, ; 申請者により実施)

* : p<0.05 ** : p<0.01 (Fisher 検定 (片側) ; 申請者により実施)

: 細胞質が密になり均質化

以上の結果から、イヌを用いた 1 年間反復経口投与毒性試験における本剤の影響としてみられた所見は、400ppm 群以上で肝薬物代謝酵素誘導 (N-DEM、O-DEM、P450) が認められた。この変化は肝臓関連所見が認められていないことから、異物投与による適応反応と考えられ、有害作用とはみなさなかつた。4000ppm 群では、肝薬物代謝酵素誘導に加え、ALP の増加、T4 の減少、肝重量の増加、肝細胞質の変化 (細胞質が密になり均質化) が認められた。

従って、本試験条件下における無毒性量 (NOAEL) は、400ppm (雄 ; 11.5mg/kg 体重/日、雌 ; 10.8mg/kg 体重/日) であると判断した。

スピロメシフェンのラットを用いた混餌投与による発がん性試験

(毒性資料 No. 原体-18)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 2001年12月19日

検体の純度：

試験動物： ウィスター(HsdCpb:WU)系ラット

[試験開始時5~6週齢、体重 雄129~163g, 雌113~147g]

1群雌雄各50匹

投与期間： 2年(1999年1月~2001年2月)

試験方法：

検体を0(対照群)、50、125、300及び800ppmとなるように粉末飼料(1%のピーナッツ油添加)に混ぜ、2年間ラットに投与した。検体を混入した飼料は毎週調製した。給餌回数は週2回とした。

用量設定の根拠：

観察・検査項目及び結果：

1. 臨床症状

動物を少なくとも1日2回（週末と休日は1回）観察し、臨床症状と異常を記録した。各個体の詳細な検査は週1回実施した。

その結果、800ppm 群では雌で蒼白（用量昇順での発症例数 2/4/2/1/9）、雄で触診可能な組織塊（雄；2/3/3/2/9）について発生頻度の増加がみられた。これらの所見は、血液学的検査及び病理組織学的検査において、関連する変化が見られなかったため、偶発的で検体投与に関連しないものと考えられた。更に、800ppm 群の雌では腹部膨満（3/5/3/3/8）、膣出血（3/5/3/4/10）の発生頻度の増加が観察された。

2. 死亡率（表1）

死亡率に検体投与の影響はみられなかった。

表1 死亡率（107週までの累積死亡率）

投与量 (ppm)	0	50	125	300	800
雄	26	28	26	22	24
雌	42	38	28	30	42

§：採血中あるいは採血後に死亡した動物を除く（♂125ppm；1例，♀125ppm，800ppm 各1例）

3. 体重（図1a, b）

投与開始時から13週までは毎週、その後は4週間毎に生存動物の体重を測定した。更に、臓器の対体重比の計算のため、計画屠殺直前に体重を測定した。

800ppm 群では雌雄共に対照群と比較して体重増加が低下した。雄ではこの影響は最初の3ヶ月間に限られ、対照群との最大差は6%であった。雌では第81週まで増体重の減少が認められ、対照群との最大差は7%であった。

300ppm 群以下では体重増加に影響は見られなかった。

図 1a. 体重(雄)

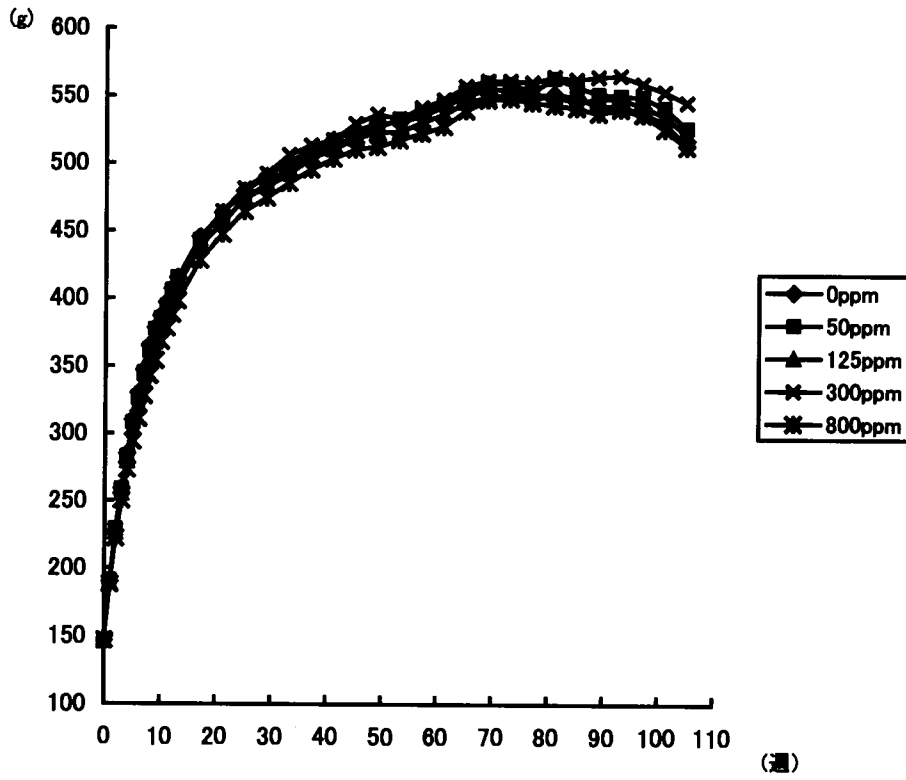
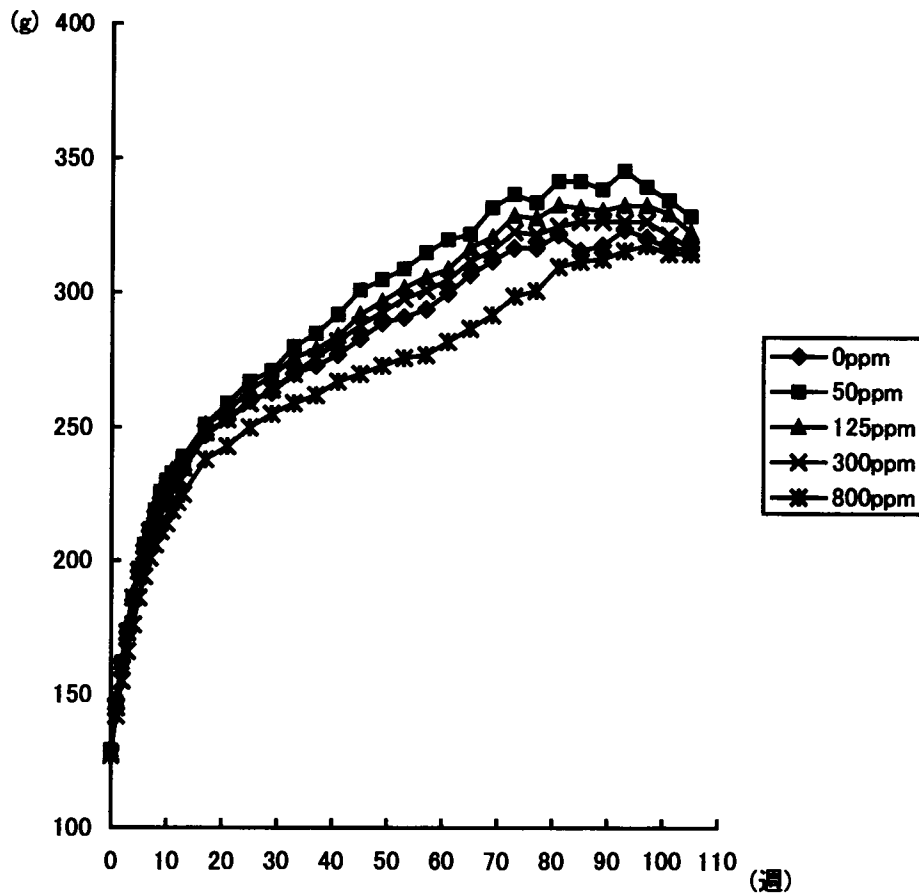


図 1b. 体重(雌)



4. 摂餌量及び検体摂取量 (表 2)

摂餌量を全例について 13 週まで毎週 1 回の間隔で、その後は 4 週毎に 1 回の間隔で測定しこれを基に検体摂取量を算定した。

投与群の雌雄の平均摂餌量は対照群と比較して顕著な差がなかった。各検体摂取量の比は用量比とほぼ一致していた。

表 2 検体摂取量(mg/kg 体重/日)

投与量(ppm)		50	125	300	800
検体摂取量	雄	2.5	6.1	14.8	40.0
	雌	3.3	8.2	19.5	53.5

5. 飲水量

飲水量を 4 週間に 1 回の間隔で測定した。

飲水量には検体に関連した変化は認められなかった。

6. 眼科学的検査 (表 3)

全例について投与開始前に眼科学的検査を行った。さらに投与 12 ヶ月後及び期間終了時の 24 ヶ月後に全ての動物について眼科学的検査を実施した。

両眼の瞳孔反射の検査を最初に暗室で行った。Mydriaticum-Stulln®点眼剤で瞳孔を散大させた後に、間接検眼鏡によって眼球及び眼底の屈折組織を検査した。眼については細隙灯を用いる検査も行った。尚、投与 12 ヶ月後においては 50、125、300ppm 群の動物については細隙灯のみで検査した。

同系統のラットを用いて本試験と同用量で平行して行われた 1 年間の反復経口投与毒性試験(毒性資料 No. 16)において、800ppm 群の雄で水晶体後囊混濁のわずかな増加を認めたが、本試験では 12 ヶ月後の検査ではほとんど増加は認められなかった。これはこの所見に、本試験で使用した動物の系統に個体差があることを示しているものと考えられた。一方、24 ヶ月後ではこの所見は全ての雌雄検体投与群で対照群に比べ高頻度にみられた。この所見の投与群での頻度は 300ppm 群の雌を除いて背景データの範囲(雄 20.3-67.4%, 雌 2.2-37.1%)内にあった。またその発現頻度には雌雄ともに用量依存性がみられなかった。雌では 800ppm の発現頻度が一番低いということから、少なくとも雌では、この所見は投与に関連したものではないものと考えられた。雄では 300ppm 及び 800ppm 群の発現率は対照群よりも著しく高く、300ppm 群の発現率は背景データの上限に近かった。これらの群では発現頻度の著しい上昇から、投与による影響を否定することは難しいと考えられた。しかしながら、一般にこの所見は水晶体における加齢性病変と考えられ

ていることから、特異的な眼毒性ではないと考えられる。この考察は、90日間反復経口毒性試験(毒性資料 No. 原体-10;3000ppm まで) および90日間反復経口神経毒性試験(毒性資料 No. 原体-14;2000ppm まで) で、眼に影響が認められていないことから支持されるものとする。

水晶体の皮質水性裂の発現頻度(雄:12ヶ月, 300ppm, 雌:24ヶ月, 50~300ppm)及び角膜混濁の発生頻度(雄:24ヶ月, 125~800ppm)の増加は、特定時点の片性のみに限られており、用量依存性はないかもしくは、800ppm群における発生頻度は対照群に比べ低かった。従って検体の影響ではなく、偶発的なものと考えられた。

表3. 眼科学的検査結果

性	発生頻度(%) / 試験した眼									
	雄					雌				
用量(ppm)	0	50	125	300	800	0	50	125	300	800
12ヶ月後										
角膜混濁*	7.1	2.0	4.0	5.1	0	1.1	3.2	0	0	1.0
皮質水性裂	4.1	5.1	8.0	11.3	7.1	4.5	2.1	2.1	5.2	3.2
水晶体後囊混濁	0	1.0	2.0	0	2.0	0	0	0	0	0
24ヶ月後										
角膜混濁*	15.8	15.4	23.3	25.3	22.6	6.8	1.6	2.6	5.7	0
皮質水性裂	34.2	32.1	37.0	31.3	32.1	18.6	21.9	21.1	28.6	15.8
水晶体後囊混濁	27.6	44.9	38.4	60.2	52.4	18.6	35.9	31.6	40.0	29.8

*; 角膜、新血管形成を含む

7. 臨床検査

各群任意に選抜した各群10匹の動物について下記に示す日程で血液一般検査、血液生化学的検査、尿検査を行った。

検査	実施週				
血液一般検査	52	58	78	87	104
白血球分画(追加)*	51		77		103
血液生化学	52		78	87	104
尿検査	52		78		104

* : 血液塗抹/ 51、77週; 対照群及び800ppm群全動物, 103週; 全群全動物

7-1. 血液学的検査 (表4)

絶食、エーテル麻酔下の動物の眼窩静脈叢から採取した末梢血において、白血球分画、赤血球形態、赤血球数、白血球数、ヘモグロビン濃度(HB)、ヘマトクリット値(HCT)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)、平均赤血球容積(MCV)、血小板数(THRO)、網状赤血球数及びトロンボプラスチン時間(HQUICK)を測定又は算定した。

赤血球に関する項目(赤血球数、網状赤血球数の割合、平均赤血球容積、平均

赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット)は雌雄共に投与に関連した影響は認められなかった。また、赤血球形態の評価においても投与に関連すると考えられる所見は認められなかった。血小板数、トロンボプラスチン時間測定では、いずれの投与群においても統計学的に有意な変動は認められず、血液凝固に対する検体投与と関係は否定できるものと考えられた。

白血球分画のいくつかの項目に 50ppm 群以上で統計学的な有意差がみられたが、明らかな用量相関性が認められず、病理組織学的検査では、造血組織に対する投与に関連した影響は認められなかった。また同じ用量で同系統のラットに1年間反復経口投与毒性試験(毒性資料 No. 16)ではこのような影響は認められなかった。更に、尾静脈血液の塗抹標本作製し、白血球分画を調べたが、用量に依存した影響は認められなかった。従って白血球分画において認められた統計学的な有意差は偶発的なものであり、投与による影響とは考えられなかった。

表 4-1 血液学的検査 (有意差の認められた項目)

	用量 (ppm)	検査 (週)	HB	HCT	MCH	MCHC	白血球	Neutro	LYM	MONO	EOS	BASO	ATPY
雄	50	52					↓ 65		↓ 66	↓ 50			
		58											
		78					↓ 78		↓ 73			↓ 67	
		87											
		104											
	125	52					↓ 68		↓ 67	↓ 58			
		58											
		78					↓ 72		↓ 72			↓ 33	
		87											
		104											
	300	52					↓ 68		↓ 64				
		58											
		78					↓ 73		↓ 71			↓ 67	
		87											
		104											
	800	52	↓ 96				↓ 74		↓ 65				
		58											
		78							↓ 76			↓ 33	
		87											
		104					↑ 148	↑ 187					
雌	50	52					↓ 76		↓ 80	↓ 61			
		58											
		78								↓ 69			
		87								↓ 61		↓ 60	
		104				↓ 97						↓ 60	
	125	52					↓ 71		↓ 68	↓ 70			
		58											
		78											
		87											
		104											
	300	52					↓ 71		↓ 72	↓ 57		↓ 67	
		58											
		78							↓ 77	↓ 66			
		87								↓ 56			
		104								↓ 59		↓ 60	
	800	52					↓ 71		↓ 58	↓ 65	↓ 56		
		58			↓ 96								
		78	↓ 88	↓ 90					↓ 79				
		87								↓ 54			
		104				↓ 98							

↑ ↓ : p<0.05 , ↓ ↓ : p<0.01 (赤血球関連;variance+Dunnett, 白血球関連;Kruskal-Wallis+adjusted U-test)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

Neutro;好中球, LYM;リンパ球, MONO;単球, EOS;好酸球, BASO,好塩基球, ATYP.LYMP;異形リンパ球

表 4-2 血液塗抹による白血球百分率 (有意差の認められた項目)

投与量 ppm	50	125	300	800		
検査時期(週)	103	103	103	51	77	103
雄						
LYM				↓96		↓85
SEGM				↑129		
MONO			↑132			↑167
BAND	↓53	↓59	↓65			↑167
ATYP. LYM	↓35	↓44	↓38	↓68		
雌						
SEGM		↑126				
MONO	↓39	↓43	↓33			
BAND		↓41	↓37			

↓ : p<0.05 , ↑↓ : p<0.01 (Kruskal-Wallis+adjusted U-test) ,
 表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの
 LYM;リンパ球, SEGM;分葉核好中球, MONO;単球, BAND;杆状核好中球
 ATYP. LYMP;異形リンパ球

7-2. 血液生化学的検査 (表 5)

以下の項目について測定した。なお、これらの血液サンプルは、グルコース測定用 (無麻酔下で絶食した動物の尾静脈から採血し、除蛋白処理) を除き、エーテル麻酔下で絶食した動物の眼窩静脈叢から採血した。

酵素

アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALAT), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ASAT), アルカリホスファターゼ (ALP), γ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT)

基質

総ビリルビン (BIL), コレステロール (CHOL), クレアチニン (CREA), 蛋白 (PROT), トリグリセリド (TRIGL), 尿素 (UREA), アルブミン (ALB), アルブミン/グロブリン比 (ALB/GLOB), グルコース, 蛋白分画 (電気泳動)

電解質

塩素 (Cl), カルシウム (Ca), 無機リン (P), カリウム (K), ナトリウム (Na)

甲状腺機能関連項目

トリヨードチロニン (T3), チロキシン (T4), チロキシン-結合能 (TBC;104 週), 甲状腺刺激ホルモン (TSH)

検査の結果は以下のとおりであった。

酵素

ALAT、ASAT、ALP、GGT は、全測定時点を通じて検体投与による影響は認められなかった。

基質

血漿中のコレステロール値が 300ppm 及び 800ppm 群の雌で 78 週目に統計学的に有意に低下した。本検体の作用機作（脂質合成障害）を考慮するとみられた低下に検体の影響を必ずしも否定はできないかもしれないが、これらの変動は単発的な変化であり、関連する肝臓への影響がみられないことから、有害閾に達していない変動と考えた。γ-グロブリン量は 300ppm 群以上の雌でわずかな低下（統計学的に有意差あり）が認められた。しかしながら、この変化は雌の対照群の値が高かったこと、また 800ppm 群の雌と対照群との差は比較的少ないことから偶発的な変化であり、本検体に関連した変化ではないと考えられた。一方、時として、免疫グロブリンを産生する B 細胞に対する影響が γ-グロブリンの減少を伴ってみられることがあるため、今回の γ-グロブリンの低下がその可能性を示唆することも考えられうる。しかしこの作用は、ラット（3000ppm 群まで）及びマウス（3500ppm 群まで）における極めて感受性の高い免疫プラーク形成細胞アッセイで影響が認められなかったことよって否定された（本報告書に参考資料として添付）。その他の項目には用量相関性がなくまた経時的な関連性がないため、偶発的な変化と考えられた。

電解質

カリウム濃度が雄において第 52 週で 50ppm 群以上で統計学的に有意に低下し、カルシウム濃度が雌で第 78 週で 50ppm 群以上、第 87 週で 300ppm 群以上で低下した。その他に認められたいくつかの電解質における有意差も含め、これらは、対照との差が小さく、用量依存性がなく、一方の性のみに限られていた。従って、これらの変化は毒性学的に意味のある影響を示すものではないと考えられた。

甲状腺機能関連項目

800ppm 群の雌で 104 週時に認められた TSH の増加を除けば、TSH 濃度、T3 濃度、T4 濃度及び TBC 値は雌雄共に検体投与に起因すると考えられる変化は見られなかった。

表5 血液生化学的検査（有意差の認められた項目）

-雄-

用量	50				125				300				800			
	52	78	87	104	52	78	87	104	52	78	87	104	52	78	87	104
Na			/				/		↑101		/				/	
K	↓94		/		↓93		/		↓96		/		↓93		/	
CL			/				/				/				/	↓98
Ca						↓97										
P			/		↓88	↓91	/				/				/	
T3			/		↑116		/				/				/	
TSH			/			↓46	/				/				/	
α-GLOB	/	/	/	↑118	/	/	/		/	/	/		/	/	/	

-雌-

用量	50				125				300				800			
	52	78	87	104	52	78	87	104	52	78	87	104	52	78	87	104
CHOL			/							↓71				↓65		
BIL		↓79				↓82				↓71			↓54	↓57		
PROT		↓92								↓93						
ALB		↓90												↓90		
Na			/				/			↓99	/				/	
Ca		↓96				↓96				↓96	↓97			↓96	↓97	
TSH																↑175
γ-GLOB	/	/	/		/	/	/		/	/	/	↓85	/	/	/	↓79

↑↓ : p<0.05 , ▲▼ : p<0.01,

Na, K, Ca, CL, P, CHOL : Adjusted Welsh test, BIL, PROT, ALB:variance+Dunnett test,

T3, α2-GLOB, γ-GLOB : TSH:Kruskal-Wallis+ajusted U-test,

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

/ ; 測定せず

7-3. 尿検査

各動物とも血液採取数日前に、16 時間蓄尿した。サンプリング中は、給水のみ行い、給餌しなかった。潜血、ビリルビン、糖、ケトン体、pH、蛋白、沈渣、ウロビリノーゲンを半定量的に、比重、尿量、蛋白濃度、採取した尿中の蛋白全量を定量的に測定した。

定量的尿検査も半定量的尿検査も投与に起因する影響を示さなかった。

尿沈渣は雌雄とも異常を示さなかった。

8. 臓器重量（表6）

投与期間終了時に屠殺した動物の下記臓器の重量を固定前に測定した：

脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓（左右）、副腎（左右）、卵巣及び精巣（左右）、子宮、甲状腺（右側）、精巣上体、

臓器重量の測定において、投与に関連した変化は認められなかった。

表 6 臓器重量 (有意差の認められた項目)

性別	雄				雌			
	50	125	300	800	50	125	300	800
投与用量 (ppm)								
副腎/対体重比			↓85					
腎/対体重比					↓92			

↓: P<0.05 (Dunnett+variance analysis),

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

9. 剖検

途中死亡動物及び最終計画屠殺動物の全動物を剖検した。最終計画屠殺動物については、エーテル深麻酔下で放血致死させた。

800ppm 群の雄で肺の部分的変色(暗赤色)に軽度の増加が認められた (発現頻度(用量昇順): 6/11/5/7/16)。この変化は、病理組織学的検査において関連所見がないことまた用量依存性がないことから、偶発的なものと考えられ投与に起因したものではないと評価した。更に、精巣に少数の結節が認められた(発現頻度:0/2/1/3/4)。病理組織学的検査において、ライディッヒ細胞腺腫に投与に関連した増加が認められていないため、この剖検での所見は毒性学的に意味のあるものとは考えられなかった。

子宮拡張(発現頻度:3/4/3/3/12)及び子宮の結節を示す動物数(発現頻度:10/14/8/11/18)が 800ppm 群で増加した。これらの所見は、後述の病理組織学的検査結果に示した様に偶発的で、検体に起因した影響とは評価しなかった。

10. 病理組織学的検査 (表 7~11)

下記の臓器の組織の代表的部分を 10%中性リン酸緩衝ホルマリンで保存した。

副腎、大動脈、脳(大脳、小脳、脳幹)、精巣上体、食道、眼球(眼瞼及び視神経を含む)、大腿骨(骨髄及び膝関節)、ハーダー腺、鼻及び咽頭を含む頭部、心臓、腸管(十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸及び他の腸管組織)、腎臓、涙腺(眼窩外)、喉頭、肝臓、肺(4%緩衝ホルマリンの気管内注入後)、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、卵巣(卵管を含む)、膵臓、下垂体、前立腺、唾液腺、坐骨神経、凝固腺を伴う精のう、骨格筋、乳腺部分の皮膚、脊髄を含む脊椎(頸椎、胸椎及び[原文頁:964/4]腰椎)、脾臓、胸骨、胃、刺青した尾、精巣、胸腺、甲状腺(上皮小体を含む)、舌、気管、尿管、尿道、膀胱(ホルマリンで灌流)、子宮、膺、外耳道腺、肉眼所見が認められた臓器及び組織

但し、病理標本作製には、眼瞼、頭部、残余の腸組織、刺青した尾(個体標識部)、尿管、尿道及び外耳道腺を除いた。

各切片はヘマトキシリン・エオシンで染色した。

10-1. 非腫瘍性病変(表 7, 10)

顕微鏡検査において、多数の非腫瘍性病変が認められた。これらの所見のほとんどはラットの加齢に伴うものであり、本質的に変性性、炎症性あるいは増殖性のものであった。

800ppm 群で子宮拡張を示す雌動物数の増加が認められた。更に炎症性変化(内膜炎/子宮炎)の発現率もこの用量群で軽度に高かった。子宮内腔拡張はラットで頻繁に報告されており、発情周期の中で正常な特徴であると考えられる。本試験で子宮内腔拡張を示した例の多くの例では、分泌物の貯留、大きな腺のう胞、子宮内膜間質ポリープ及び組織塊のような所見を伴っており、これらの病変は加齢ラットで好発することが知られている。さらに今回関連性のある変化が卵巣、卵管、膈及び乳腺で認められていないことから、本試験で認められた子宮の軽度の変化は検体投与との関連性はないものと考えられる。尚、剖検の際に記録された子宮結節は関連する鏡検所見は認められなかった。

眼球では水晶体変性が全用量群の多数のラットに認められた。明らかな用量反応関係はないが、発現率は対照群と比較したとき雄投与群でわずかに高かった。ラットにおける水晶体変性(白内障)は自然発生的な加齢に伴う病変であるが、生体外異物によっても誘発される。本試験では明瞭な用量反応関係が認められなかったので、この所見は、検体の毒性ではなく偶発的なものであると考えられる。

甲状腺では、コロイド変化が全群のほとんどの動物で認められた。この所見は、甲状腺ろ胞内でのコロイドの軽度な凝集を特徴としていた。800ppm 群の雌で、この所見の発生頻度はわずかに高くまた程度もわずかに強かった。これらの軽度な甲状腺の変化は、肝ミクロゾーム酵素誘導に起因する T4 の胆汁排泄の増加、代償性下垂体 TSH 分泌の増加及び甲状腺への刺激の結果であると評価される。この評価は既に報告されている 90 日間(毒性資料 No. 9)及び 1 年間反復経口毒性試験(毒性資料 No. 16)でも記述したように、比較的短期間の投与において、UDP-グルクロニルトランスフェラーゼを含む肝ミクロゾーム酵素誘導、T4 及び T3 の濃度の低下、TSH が増加した事実に基づいている。尚、ろ胞上皮細胞の限局性の過形成はいずれの用量群においても意味のある増加を示さなかった。

その他、いろいろな組織における変性性及び炎症性変化は対照群と投与群の間でほぼ同じ発現頻度で認められ、偶発的なものと考えられた。

表 7 主な非腫瘍性病変(臓器/群/性)

性別 用量(ppm)	雄					雌				
	0	50	125	300	800	0	50	125	300	800
子宮 検査数						49	50	50	50	50
拡張						18 ^{##}	15	25	23	32 ^{**}
子宮内膜炎/子宮炎						6	5	5	6	11
眼 検査数	50	50	50	50	50	49	50	50	50	50
水晶体の変性	13	24 [*]	18	19	24 [*]	11	18	12	16	10
甲状腺 検査数	50	50	50	50	50	49	49	50	50	50
コロイド変化	49	49	48	49	47	41 [#]	45	43	45	48 [*]
ろ胞細胞過形成	0	0	1	1	1	0	0	1	5 [*]	0

= $p \leq 0.05$, ## = $p \leq 0.01$ (Cochran-Amitage 傾向検定),

* = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ (Fisher 検定(片側))

10-2. 腫瘍性病変(表 11)

腫瘍の種類、発現率、良悪、部位について分類した。

全ての腫瘍性病変の腫瘍の種類、発現率、臓器分布は投与群と対照群のラットの間で有意な差を示さないかあるいは偶発的な変化と考えられた。また用量群別及び雌雄別における良性及び悪性腫瘍を担う動物の数についても、投与群と対照群との間に差は認められなかった。

精巣ではライディツヒ細胞腺腫(発現頻度: 3/6/3/2/4)が剖検時に認められた精巣結節に関連した鏡検所見と考えられた。しかしながら、この腫瘍発現と投与との関連性は明らかではなかった。

剖検で認められた子宮結節に関連する所見は病理組織学的検査において認められなかった。

ろ胞細胞腺腫は 800ppm 群の雄において統計学的有意に増加傾向を示したが、対照群との群間比較ではいずれの用量群においてもその発生数に有意差がなく、また過形成の増加を伴わず、背景データ(0~2例)を大きく上回ることはなかったことから、検体投与によって増加しなかったと判断した。

また、その他各臓器で認められた腫瘍の発生数は、統計学的な有意差も認められず、本検体の影響とは考えられなかった。

担腫瘍動物の発現率、良性腫瘍のみ、悪性腫瘍のみ、あるいは良性かつ悪性腫瘍を有する動物数の増加に雌雄共に用量に関連した増加は認められなかった(表 8)。

腫瘍を有する動物の経時的発生(表 9)については雌雄ともに用量に関連した影響は認められなかった。

表 8—途中死亡例あるいは試験終了時に屠殺した担腫瘍動物

性別 用量 (ppm)	雄					雌				
	0	50	125	300	800	0	50	125	300	800
	途中死亡動物									
検査動物数	13	15	14	11	12	20	19	15	15	22
動物数;腫瘍を有する(総)	6	10	9	6	6	18	17	14	14	12
良性腫瘍のみを有する	3	6	5	4	2	9	10	6	5	5
悪性腫瘍のみを有する	2	3	1	2	2	6	5	3	4	3
良悪腫瘍を有する	1	1	3	0	2	3	2	5	5	4
転移性腫瘍を有する	0	1	1	1	1	6	3	3	6	3
総腫瘍数 ^a	8	11	14	6	10	24	26	25	23	18
良性腫瘍数 ^a	5	7	9	4	6	15	19	16	13	11
悪性腫瘍数 ^a	3	4	5	2	4	9	7	9	10	7
	最終解剖動物									
検査動物数	37	35	36	39	38	29	31	35	35	28
動物数;腫瘍を有する(総)	25	23	19	24	25	21	23	31	26	21
良性腫瘍のみを有する	22	21	17	23	19	15	17	24	20	17
悪性腫瘍のみを有する	2	1	2	0	2	1	3	1	1	1
良悪腫瘍を有する	1	1	0	1	4	5	3	6	5	3
転移性腫瘍を有する	3	0	1	0	2	0	1	0	3	1
総腫瘍数 ^a	38	32	27	35	41	37	41	53	53	35
良性腫瘍数 ^a	35	30	25	34	35	31	35	45	47	30
悪性腫瘍数 ^a	3	2	2	1	6	6	6	8	6	5
	全動物									
検査動物数	50	50	50	50	50	49	50	50	50	50
動物数;腫瘍を有する(総)	31	33	28	30	31	39	40	45	40	33
良性腫瘍のみを有する	25	27	22	27	21	24	27	30	25	22
悪性腫瘍のみを有する	4	4	3	2	4	7	8	4	5	4
良悪腫瘍を有する	2	2	3	1	6	8	5	11	10	7
転移性腫瘍を有する	3	1	2	1	3	6	4	3	9	4
総腫瘍数 ^a	46	43	41	41	51	61	67	78	76	53
良性腫瘍数 ^a	40	37	34	38	41	46	54	61	60	41
悪性腫瘍数 ^a	6	6	7	3	10	15	13	17	16	12

^a両側/同一部位で組織形態の同じ腫瘍の多中心性の腫瘍は単一腫瘍として評価した。

転移腫瘍は数に含まれていない(但し、原発性の腫瘍が同定できない場合に悪性腫瘍としてカウントした。)

表9 - 腫瘍を有する最終計画屠殺動物

性別	雄					雌				
	0	50	125	300	800	0	50	125	300	800
用量 (ppm)	0	50	125	300	800	0	50	125	300	800
途中死亡例	13	15	14	11	12	21	19	15	15	22
腫瘍数 ^{&}										
良性	5	7	9	4	6	15	19	16	13	11
悪性	3	4	5	2	4	9	7	9	10	7
総	8	11	14	6	10	24	26	25	23	18
担腫瘍動物数										
週										
1 - 13										
14 - 26										
27 - 39										
40 - 52	1					1				
53 - 65	1					3 3 1 1				
66 - 78	2		1	2	1		1	1	4	1
79 - 91	2	1	4		2	8	4	5	2	6
92 - 剖検	2	8	4	4	2	6	9	7	7	5
全期間	6	10	9	6	6	18	17	14	14	12

[&] = 両側/同一部位で組織形態の同じ腫瘍の多重腫瘍及びは単一腫瘍として評価した。

以上の結果から、本剤のラットに対する 24 ヶ月間飼料混入投与による発がん試験における本剤の影響として、雄では 800ppm 群で体重増加の抑制、300ppm 群以上で水晶体後囊混濁の頻度の増加が認められた。雌では、800ppm 群で腹部膨満、膣出血、体重増加抑制、TSH の増加、甲状腺のコロイド変化(凝集)の頻度の増加がみられた。

これらのことから、本試験条件下において、スピロメシフェンの雌雄ラットに対する無毒性量 (NOAEL) は、飼料中濃度が雄では 125ppm (6.1mg/kg 体重/日)、雌では 300ppm (19.5mg/kg 体重/日) であった。

腫瘍の種類、腫瘍性病変の発生頻度及び臓器分布に検体投与群と対照群の間に差は認められなかったため、本薬の発がん性誘発作用はないものと判断された。

表 10-1. 主な非腫瘍性病変

性別	雄					雌					
	0	50	125	300	800	0	50	125	300	800	
	用量 (ppm)										
	所見/検査数										
途中死亡動物	子宮						20	19	15	15	22
	拡張						9	7	7	6	15
	子宮内膜炎/子宮炎						3	3	3	4	10*
	線維化						18	15	15	14	14*
	色素沈着						19	18	15	15	17
	単核細胞浸潤						3	1	1	2	1
	子宮腺過形成						0	0	1	0	2
	子宮頸部						20	19	15	15	22
	色素沈着						0	1	0	2	0
	単核細胞浸潤						0	1	1	1	1
	子宮内膜間質過形成						0	1	0	0	1
	眼	13	15	14	11	12	20	19	15	15	22
	水晶体の変性	1	4	2	1	4	4	0	1	1	3
	甲状腺 検査数	13	15	14	11	12	20	18	15	15	22
	コロイド変化	12	15	13	11	12	13	14	10	13	20*
	ろ胞細胞過形成	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
	肝臓	13	15	14	11	12	20	19	15	15	22
	明細胞巢	0	9**	3	4*	2	1	3	2	3	1
	塩基性細胞巢	1	6	0	1	3	5	3	3	4	3
	好酸性細胞巢	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
胆管過形成	7	10	12	7	9	10	6	9	8	9	
精巣	13	15	14	11	12						
精細管萎縮	5	5	4	0	1						
ライディッヒ細胞過形成	2	0	1	0	0						
最終屠殺動物	子宮						29	31	35	35	28
	拡張						9	8	18	17	17*
	子宮内膜炎/子宮炎						3	2	2	2	1
	線維化						29	30	35	35	28
	色素沈着						29	30	34	33	26
	単核細胞浸潤						10	6	5	9	4
	子宮内膜過形成						0	1	0	0	0
	子宮腺過形成						5	6	3	3	3
	子宮頸部						29	31	35	35	28
	色素沈着						0	4	0	3	2
	単核細胞浸潤						1	7*	2	4	0
	腺上皮過形成						0	1	0	0	0
	子宮内膜間質過形成						0	3	1	1	5*
	眼	37	35	36	39	38	29	31	35	35	28
	水晶体の変性	12	20*	16	18	20	7	18**	11	15	7

*= p ≤ 0.05, ** = p ≤ 0.01 (Fisher 検定(片側))

表 10-2. 主な非腫瘍性病変

	性別	雄					雌				
	用量(ppm)	0	50	125	300	800	0	50	125	300	800
	所見/検査数										
最終層殺動物	甲状腺	37	35	36	39	38	29	31	35	35	28
	コロイド変化	37	34	35	38	35	28	31	33	32	28
	ろ胞細胞の過形成	0	0	1	1	1	0	0	0	4	0
	肝臓	37	35	36	39	38	29	31	35	35	28
	明細胞巢	30	29	30	37	28	10	17	14	12	12
	塩基性細胞巢	8	13	9	10	14	14	16	13	14	16
	好酸性細胞巢	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
	胆管過形成	30	32	30	32	37*	20	23	22	24	17
	精巣	37	35	36	39	38					
	精細管萎縮	12	13	13	7	7					
ライディット細胞過形成	6	7	5	2	1*						
全動物	子宮						49	50	50	50	50
	拡張						18#	15	25	23	32**
	子宮内膜炎/子宮炎						6	5	5	6	11
	線維化						47	45	50	49	42*
	色素沈着						48	48	49	48	43*
	単核細胞浸潤						13	7	6	11	5*
	子宮内膜過形成						0	1	0	0	0
	子宮腺過形成						5	6	4	3	5
	子宮頸部						49	50	50	50	50
	色素沈着						0	5*	0	5*	2
	単核細胞浸潤						1	8*	3	5	1
	腺上皮過形成						0	1	0	0	0
	子宮内膜間質過形成						0	4	1	1	6*
	眼	50	50	50	50	50	49	50	50	50	50
	水晶体の変性	13	24*	18	19	24*	11	18	12	16	10
	甲状腺	50	50	50	50	50	49	49	50	50	50
	コロイド変化	49	49	48	49	47	41#	45	43	45	48*
	ろ胞細胞過形成	0	0	1	1	1	0	0	1	5*	0
	肝臓	50	50	50	50	50	49	50	50	50	50
	明細胞巢	30	38	33	41*	30	11	20*	16	15	13
	塩基性細胞巢	9	19*	9	11	17	19	19	16	18	19
	好酸性細胞巢	0	0	2	0	1	0	1	0	0	0
	胆管過形成	37	42	42	39	46*	30	29	31	32	26
精巣	50	50	50	50	50						
精細管萎縮	17	18	17	7*	8*						
ライディット細胞過形成	8	7	6	2*	1*						

= p ≤ 0.05, ## = p ≤ 0.01 (Cocran-Amitage 傾向検定, 全動物について実施)

* = p ≤ 0.05, ** = p ≤ 0.01 (Fisher 検定(片側))

表 11-1. 腫瘍性病変

性別	雄					雌				
	0	50	125	300	800	0	50	125	300	800
用量(ppm)										
所見/検査数										
脳	13	15	14	11	12	20	19	15	15	22
星状膠細胞腫	m	0	0	0	1	0	0	0	0	0
乏突起膠細胞腫	b	0	1	0	0	0	0	0	1	0
上衣腫	m	0	0	1	0	0	0	0	0	0
脊髓	13	15	14	11	12	20	19	15	15	22
髄膜腫	b	0	0	0	0	0	0	0	0	1
星状膠細胞腫	m	0	0	0	0	0	1	0	0	0
心臓	13	15	14	11	12	20	19	15	15	22
心内膜神経鞘腫	m	0	0	1	0	0	0	0	0	0
肺	13	15	14	11	12	20	19	15	15	22
腺腫	b	0	0	0	0	0	0	0	0	1
肝臓	13	15	14	11	12	20	19	15	15	22
胆管癌	m	0	1	0	0	1	0	0	0	0
膵臓	13	15	14	11	12	20	19	15	15	22
島細胞腺腫	b	0	0	0	0	1	0	0	0	0
卵巣						20	19	15	15	22
顆粒膜細胞腫	b					0	0	0	1	0
セルトリ細胞腫	b					0	1	0	0	0
子宮						20	19	15	15	22
子宮内膜間質ポリープ	b					3	4	3	0	2
腺腫	b					1	0	0	0	0
腺癌	m					5	1	2	5	5
子宮内膜間質肉腫	m					0	2	1	0	1
卵黄囊癌	m					0	0	0	1	0
精巣	13	15	14	11	12					
ライディツヒ細胞腺腫	b	0	2	0	0	1				
下垂体	13	15	14	11	12	20	19	15	15	22
腺腫	b	2	2	4	0	2	9	6	9	9
甲状腺	13	15	14	11	12	20	18	15	15	22
C-細胞腺腫	b	0	0	1	1	0	0	2	1	0
C-細胞癌	m	1	0	0	0	0	0	0	0	1
副腎	13	15	14	11	12	20	19	15	15	22
皮質腺腫	b	0	1	0	0	0	0	0	0	0
髄質腫瘍	b	3	1	1	2	1	0	1	0	1
血液リンパ網内系 [§]	1	-	1	1	2	-	1	1	-	-
組織球性肉腫	m	1	-	1	1	2	0	1	1	-
脾臓	13	15	14	11	12	20	19	15	15	22
脂肪肉腫	m	1	0	0	0	0	0	0	0	0
血管肉腫	m	0	0	0	0	0	0	1	0	0

[§]: 通常検査を行わない, b=良性, m=悪性

*= p ≤ 0.05, ** = p ≤ 0.01 (Fisher 検定(片側))

表 11-2. 腫瘍性病変

性別	雄					雌					
	0	50	125	300	800	0	50	125	300	800	
用量 (ppm)											
所見/検査数											
途中死亡動物	胸腺	13	14	14	10	12	19	19	14	15	22
	胸腺腫	b	0	0	1	0	0	0	1	0	0
	悪性胸腺腫	m	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	ハーダー氏腺	13	15	14	11	12	20	19	15	15	22
	線維肉腫	m	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	鼻涙管 ^s	-	2	1	-	-	-	-	1	-	-
	扁平上皮細胞癌	m	-	0	0	-	-	-	1	-	-
	乳腺部位	13	15	14	11	12	20	19	15	15	22
	線維腺腫	b	0	0	0	0	0	2	4	2	1
	腺癌	m	0	0	0	0	0	0	1	2	3
	皮膚	13	15	14	11	12	20	19	15	15	22
	毛包腫瘍	b	0	0	1	0	0	0	1	0	0
	扁平上皮細胞癌	m	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	角化棘細胞腫	b	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	乳頭腫	b	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	線維性組織球腫	m	0	0	1	0	0	0	0	1	0
	線維肉腫	m	0	1	0	0	0	1	0	0	0
	神経鞘腫	m	0	1	0	0	0	0	0	1	0
	骨(多種) ^s	2	1	-	-	-	1	-	-	-	-
	骨肉腫	m	0	1	-	-	0	-	-	-	-
	体腔 ^s	1	1	0	2	1	1	1	2	5	5
	脂肪腫	b	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	脂肪肉腫	m	0	0	0	1	0	0	0	0	0
最終層殺動物	脳	37	35	36	39	38	29	31	35	35	28
	乏突起膠細胞腫	b	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	顆粒細胞腫	b	0	1	1	1	0	0	0	0	0
	脊髓	37	35	36	39	38	29	31	35	35	28
	髄膜腫	b	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	心臓	37	35	36	39	38	29	31	35	35	28
	心内膜神経鞘腫	m	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	肺	37	35	36	39	38	29	31	35	35	28
	腺腫	b	0	1	0	0	1	0	0	0	0
	角化扁平細胞腫	b	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	口腔 ^s	2	-	-	-	1	1	-	1	-	-
	扁平上皮細胞癌	m	1	-	-	-	1	-	1	-	-
	胃	37	35	36	39	38	29	31	35	35	28
	扁平上皮細胞癌	m	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	空腸	37	35	36	39	38	29	31	35	35	28
平滑筋腫	b	0	0	0	1	0	0	1	0	0	

^s: 通常検査を行わない, b=良性, m=悪性

* = p ≤ 0.05, ** = p ≤ 0.01 (Fisher 検定 (片側))

表 11-3. 腫瘍性病変

性別	雄					雌				
	0	50	125	300	800	0	50	125	300	800
用量(ppm)										
所見/検査数										
回腸	37	35	36	39	38	29	31	35	35	28
平滑筋腫	b	1	0	0	0	0	0	0	0	0
肝臓	37	35	36	39	38	29	31	35	35	28
肝細胞腺腫	b	1	0	0	2	1	0	0	0	1
脾臓	37	35	36	39	38	29	31	35	35	28
島細胞腺腫	b	0	0	0	1	0	0	0	1	0
腺房細胞腺腫	b	1	0	0	1	1	0	0	0	0
腎臓	37	35	36	39	38	29	31	35	35	28
脂肪腫	b	0	0	0	1	0	1	1	0	0
脂肪肉腫	m	0	0	0	0	2	0	0	0	0
膀胱	37	35	36	39	38	29	31	35	35	28
乳頭腫	b	0	0	0	0	0	0	1	0	0
卵巣						29	31	35	35	28
顆粒膜細胞腫	b					0	2	0	1	2
莢膜細胞腫	m					0	0	1	0	0
セルトリ細胞腫	b					0	0	0	1	0
子宮						29	31	35	35	28
子宮内膜間質ポリープ	b					7	6	11	13	8
腺管ポリープ	b					0	1	0	0	0
腺癌	m					2	3	2	2	3
腫						29	31	35	35	28
肉腫 (鑑別診断せず)	m					0	0	0	0	1
扁平上皮細胞癌	m					0	0	0	0	1
精巣	37	35	36	39	38					
ライディツヒ細胞腺腫	b	3	4	3	2	3				
中皮腫	m	0	0	1	0	0				
精巣上体	37	35	36	39	38					
中皮腫	m	0	0	1	0	0				
下垂体	37	35	36	39	38	29	31	35	35	28
腺腫	b	8	9	6	7	5	13	11	18	15
甲状腺	37	35	36	39	38	29	31	35	35	28
C-細胞腺腫	b	6	0	3	8	7	3	3	1	3
C-細胞癌	m	0	0	0	0	0	0	1	0	0
ろ胞細胞腺腫	b	0	2	3	2	4	0	0	0	0
ろ胞細胞腺癌	m	0	1	0	0	0	0	0	0	0
上皮小体	37	33	36	39	38	28	31	35	35	28
腺腫	b	1	1	0	0	1	0	0	0	0

§:通常検査を行わない, b=良性, m=悪性

*= p ≤ 0.05, ** = p ≤ 0.01 (Fisher 検定(片側))

表 11-4. 腫瘍性病変

	性別	雄					雌				
		0	50	125	300	800	0	50	125	300	800
	用量 (ppm)										
	所見/検査数										
最終層殺動物	副腎	37	35	36	39	38	29	31	35	35	28
	皮質腺腫 b	0	1	0	1	0	0	2	0	1	0
	皮質腺癌 m	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	髓質腫瘍 b	12	9	4*	8	8	0	3	1	4	1
	悪性髓質腫瘍(褐色細胞腫) m	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	血液リンパ網内系 ^s	-	-	1	1	1	3	-	-	-	-
	リンパ腫 m	-	-	0	0	1	2	-	-	-	-
	組織球性肉腫 m	-	-	1	1	0	1	-	-	-	-
	胸腺	36	35	36	39	38	29	31	35	34	28
	胸腺腫 b	1	0	1	0	0	2	0	0	1	2
	腸間膜リンパ節	37	35	36	39	38	29	31	35	35	28
	血管腫 b	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0
	血管肉腫 m	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	ハーダー氏腺	37	35	36	39	38	29	31	35	35	28
	腺癌 m	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	乳腺部位	37	35	36	39	38	29	31	35	35	28
	線維腺腫 b	0	0	0	0	0	5	6	6	5	4
	混合腫瘍 m	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	腺癌(線維腺腫中) m	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	腺腫 b	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0
	腺癌 m	0	0	0	0	0	0	2	2	2	0
	皮膚	37	35	36	39	38	29	31	35	35	28
	脂肪腫 b	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
	角化棘細胞腫 b	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	神経鞘腫 m	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
	体腔 ^s	-	-	2	-	-	1	-	-	1	-
	脂肪腫 b	0	0	1	0	0	0	-	-	0	-
	中皮腫 m	0	0	1	0	0	0	-	-	0	-
全動物	脳	50	50	50	50	50	49	50	50	50	50
	星状膠細胞腫 m	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	乏突起膠細胞腫 b	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
	顆粒細胞腫 b	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	上衣腫 m	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	脊髄	50	50	50	50	50	49	50	50	50	50
	髄膜腫 b	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	悪性星状膠細胞腫 m	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	心臓	50	50	50	50	50	49	50	50	50	50
	心内膜神経鞘腫 m	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0

^s: 通常検査を行わない, b=良性, m=悪性

= $p \leq 0.05$, ## = $p \leq 0.01$ (傾向検定, Peto 法, 全動物について実施),

* = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ (Fisher 検定(片側))

表 11-5. 腫瘍性病変

性別	雄					雌				
	0	50	125	300	800	0	50	125	300	800
用量(ppm)										
所見/検査数										
肺	50	50	50	50	50	49	50	50	50	50
腺腫	b	0	1	0	0	1	0	0	0	1
角化扁平細胞腫	b	0	0	0	0	0	0	0	0	1
口腔 ^s		4	-	-	-	1	-	1	-	-
扁平上皮細胞癌	m	1	-	-	-	1	-	1	-	-
胃		50	50	50	50	50	49	50	50	50
扁平上皮細胞癌	m	0	0	0	0	0	0	1	0	0
空腸		50	50	50	50	50	49	50	50	50
平滑筋腫	b	0	0	0	1	0	0	1	0	0
回腸		50	50	50	50	50	49	50	50	50
平滑筋腫	b	1	0	0	0	0	0	0	0	0
肝臓		50	50	50	50	50	49	50	50	50
肝細胞腺腫	b	1	0	0	2	1	0	0	0	1
胆管癌	m	0	1	0	0	1	0	0	0	0
膵臓		50	50	50	50	50	49	50	50	50
島細胞腺腫	b	0	0	1	0	2	0	0	0	1
腺房細胞腺腫	b	1	0	0	1	1	0	0	0	0
腎臓		50	50	50	50	50	49	50	50	50
脂肪腫	b	0	0	0	1	0	1	1	0	0
脂肪肉腫	m	0 [#]	0	0	0	2	0	0	0	0
膀胱		50	50	50	50	50	49	50	50	50
乳頭腫	b	0	0	0	0	0	0	1	0	0
卵巢							49	50	50	50
顆粒膜細胞腫	b						0	2	0	2
莢膜細胞腫	m						0	0	1	0
セルトリ細胞腫	b						0	1	0	1
子宮							49	50	50	50
子宮内膜間質ポリープ	b						10	10	14	13
腺管ポリープ	b						0	1	0	0
腺腫	b						1	0	0	0
腺癌	m						7	4	4	7
子宮内膜間質肉腫	m						0	2	1	0
卵黄囊癌	m						0	0	0	1
膣							49	50	50	50
肉腫 (鑑別診断せず)	m						0	0	0	1
扁平上皮細胞癌	m						0	0	0	1
精巣		50	50	50	50	50				
ライディツヒ細胞腺腫	b	3	6	3	2	4				
中皮腫	m	0	0	1	0	0				

^s: 通常検査を行わない, b=良性, m=悪性

[#] = p ≤ 0.05, ^{##} = p ≤ 0.01 (傾向検定, Peto 法), * = p ≤ 0.05, ** = p ≤ 0.01 (Fisher 検定(片側))

表 11-6. 腫瘍性病変

性別	雄					雌				
	0	50	125	300	800	0	50	125	300	800
用量 (ppm)										
所見/検査数										
精巢上体	50	50	50	50	50					
中皮腫 m	0	0	1	0	0					
下垂体	50	50	50	50	50	49	50	50	50	50
腺腫 b	10	11	10	7	7	22	17	27	24	14
甲状腺	50	50	50	50	50	49	49	50	50	50
C-細胞腺腫 b	6	0	4	9	7	3	5	2	3	2
C-細胞癌 m	1 ^{##}	0	0	0	0	0	1	0	0	1
ろ胞細胞腺腫 b	0 [#]	2	3	2	4	0	0	0	0	0
ろ胞細胞腺癌 m	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
上皮小体	49	48	49	49	50	48	50	49	50	47
腺腫 b	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
副腎	50	50	50	50	50	49	50	50	50	50
皮質腺腫 b	0	2	0	1	0	0	2	0	1	0
皮質腺癌 m	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
髄質腫瘍 b	15	10	5*	10	9	0	4	1	5*	1
悪性髄質腫瘍(褐色細胞腫) m	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
血液リンパ網内系 ^s	1	-	2	2	3	3	1	1	-	-
リンパ腫 m	0	-	0	0	1	2	0	0	-	-
組織球性肉腫 m	1	-	2	2	2	1	1	1	-	-
全動物 脾臓	50	50	50	50	50	49	50	50	50	50
脂肪肉腫 m	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
血管肉腫 m	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
胸腺	49	49	50	49	50	48	50	49	49	50
胸腺腫 b	1	0	2	0	0	2	0	1	1	2
悪性胸腺腫 m	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
腸間膜リンパ節	50	50	50	50	50	49	50	50	50	50
血管腫 b	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0
血管肉腫 m	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
ハーダー氏腺	50	50	50	50	50	49	50	50	50	50
線維肉腫 m	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
腺癌 m	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
鼻涙管 ^s	-	4	2	-	-	-	-	1	-	-
扁平上皮細胞癌 m	-	0	0	-	-	-	-	1	-	-
乳腺部位	50	50	50	50	50	49	50	50	50	50
線維腺腫 b	0	0	0	0	0	7	10	8	6	5
混合腫瘍 m	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
腺癌(線維腺腫中) m	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
腺腫 b	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0
腺癌 m	0	0	0	0	0	0	3	4	5*	0

^s: 通常検査を行わない, b=良性, m=悪性

= $p \leq 0.05$, ## = $p \leq 0.01$ (傾向検定, Peto 法), * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ (Fisher 検定 (片側))

表 11-7. 腫瘍性病変

	性別	雄					雌				
		0	50	125	300	800	0	50	125	300	800
用量 (ppm)											
所見/検査数											
全動物	皮膚	50	50	50	50	50	49	50	50	50	50
	脂肪腫	b	0	0	1	0	1	0	0	0	0
	毛包腫瘍	b	0	0	1	0	0	0	1	0	0
	扁平上皮細胞癌	m	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	角化棘細胞腫	b	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	乳頭腫	b	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	線維性組織球腫	m	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	線維肉腫	m	0	1	0	0	0	1	0	0	0
	神経鞘腫	m	0	1	0	0	1	0	0	0	1
	骨(多種) [§]		4	4	-	2	2	1	-	-	-
	骨肉腫	m	0	1	-	0	0	0	-	-	-
	体腔 [§]		1	1	2	2	1	2	1	2	6
	脂肪腫	b	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	脂肪肉腫	m	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	中皮腫	m	0	0	1	0	0	0	0	0	0

[§]: 通常検査を行わない, b=良性, m=悪性

= $p \leq 0.05$, ## = $p \leq 0.01$ (傾向検定, Peto 法), * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ (Fisher 検定(片側))

スピロメシフェンのマウスを用いた発がん性試験

(毒性資料No.原体-19)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 2001年12月18日

検体の純度：

試験動物： CD-1[Cr1:CD-1(ICR)BR]系マウス

[試験開始時6~7週齢、平均体重 雄29.5g, 雌23.0g]

1群雌雄各50匹

投与期間： 18ヵ月(1999年6月~2000年12月)

試験方法

検体を0(対照群)、20、140、1000及び2000ppmとなるように粉末飼料(1%のピーナツ油添加)に混ぜ18ヵ月間マウスに投与した。検体を混入した飼料は週毎に調製した。

用量設定の根拠；

試験項目及び試験結果

1. 臨床症状

動物を少なくとも1日2回（週末と休日は1回）観察し、臨床症状と異常を記録した。各個体の詳細な検査は週1回実施した。不健康な動物あるいは生死にかかわる可能性のある新生物ができた動物については、隔離して、より頻繁に観察し、もし瀕死状態にあれば切迫屠殺した。

その結果、高用量群雌4匹では明らかに飲水量が増加し、尿排泄量が増加したが、他の投与群の雌ではそれは認められなかった。しかしながらいずれも関連する病理組織学的所見が認められなかったため、検体投与に関連した影響とはみなさなかった。以上、全ての用量群において、臨床症状、体表、開口部、一般行動、姿勢、呼吸及び排泄物に検体投与に関連した所見は認められなかった。

2. 死亡率(表1)

本検体は2000ppm群まで雌雄共に死亡率に関して影響を示さなかった。

表1. 死亡率 (80週までの累積死亡数から求めた。)

投与量(ppm)		0	20	140	1000	2000
死亡率(%)	雄	30	34	32	32	28
	雌	16	16	38	36	24

3. 体重(図1, 図2)

投与開始前から13週までは毎週、その後は隔週に生存動物の体重を測定した。更に、臓器重量の対体重比の算出のため、計画屠殺直前に体重を測定した。

第25週以降2000ppm群の雄で体重増加抑制が認められた。対照群との差は最大で9%であり、試験終了時点における差は8%であった。他の投与群及び雌では、体重に対して意味のある影響は認められなかった。

図 1. 体重(雄)

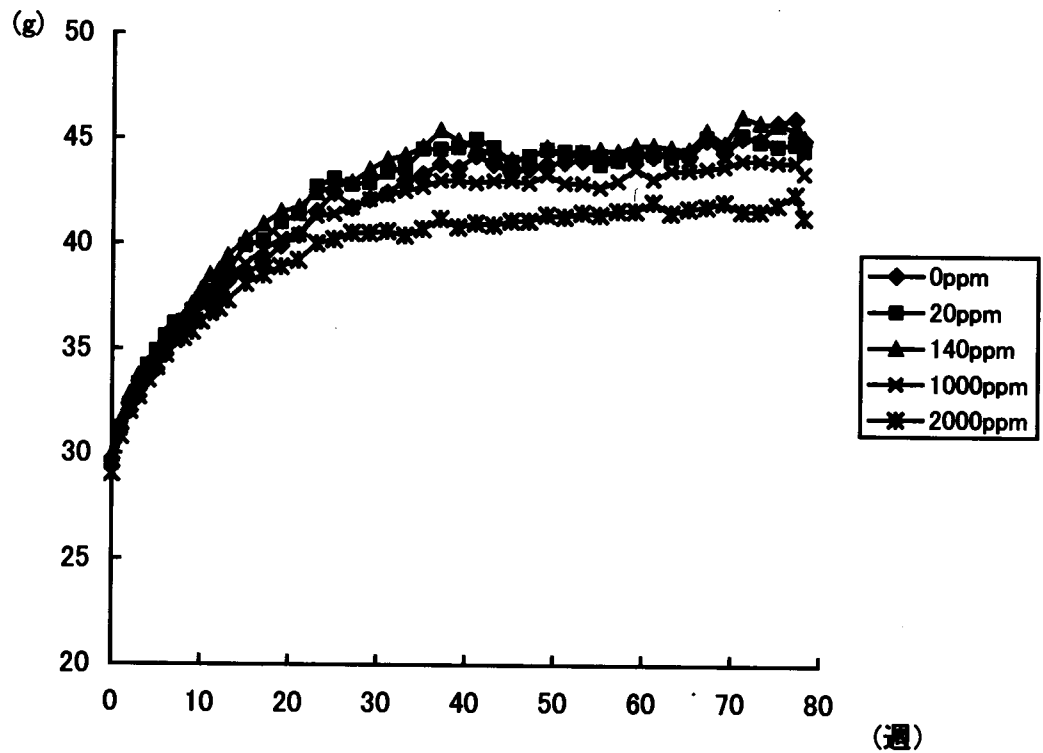
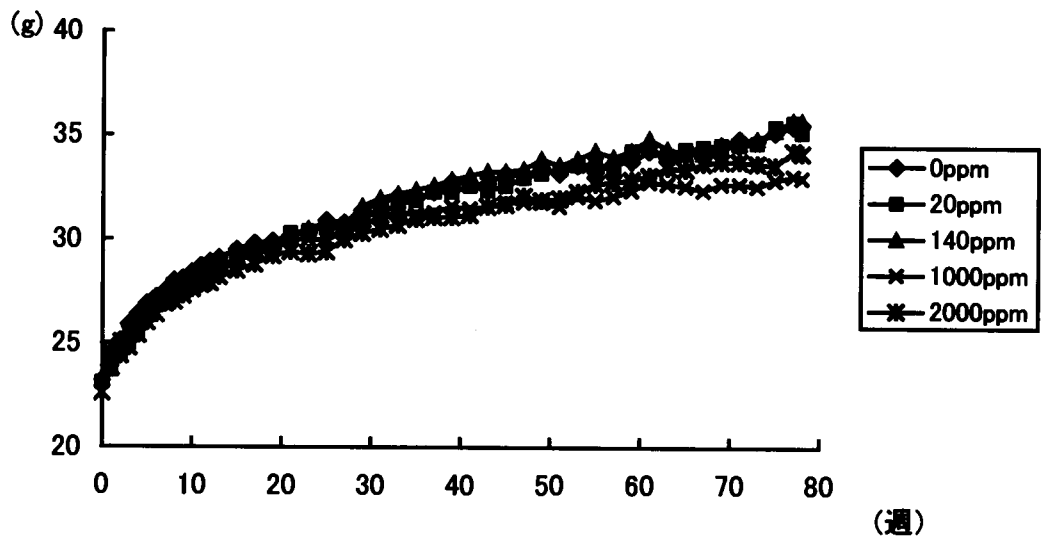


図 2. 体重(雌)



4. 摂餌量及び検体摂取量 (表 2)

摂餌量を個体毎に 13 週まで週 1 回の間隔で、その後は 4 週間に 1 回の間隔で測定し、これを基に検体摂取量を算定した。

検体投与群雌雄における摂餌量は、対照群に比較して意味のある差は認められ

なかった。また検体摂取量は用量に関する理論的差にほぼ相当するものであった。以下に検体摂取量(mg/kg/日)を示す。

表 2. 検体摂取量(mg/kg 体重/日)

投与量(ppm)		20	140	1000	2000
検体摂取量	雄	3.3	21.7	156.7	334.6
	雌	3.8	29.9	200.5	400.6

5. 血液学的検査 (表 3)

全動物について第 52 週、78 週に血液塗抹標本を作製した。血液塗抹標本用の血液試料はジエチルエーテル麻酔下で非絶食マウスの後眼窩静脈叢から採取した。さらに、瀕死状態のために屠殺したマウスについても屠殺日に血液塗抹標本を作製した。この屠殺動物の血液は放血致死させる時に採取した。尚、血液塗抹標本の評価は全生存動物については 78 週に、また切迫屠殺動物については屠殺時に行なった。

2000ppm 群では、雄においてリンパ球数がわずかに増加し、分葉核中球数が減少した。しかしながら、個々の値が背景データの 2s 範囲を超えるものはなく(リンパ球数:55.5~88.7%)、あるいはこの範囲以下のものもなかった(分葉好中球数:9.3~42.4%)。その他単球及び異形リンパ球に統計学的な有意差が認められたが、対照群との差がわずかであるかあるいは用量関連性が認められなかったので、検体に起因した影響ではなく偶発的な変化と考えられた。瀕死状態のために屠殺した例について実施した白血球百分率の検査では、白血球の各成分の相対量にかなりの変動が認められた。これらのデータには検体関連の影響を示すものは認められなかった。

表 3 白血球百分比 (有意差の認められた項目)

検査時期	雄				雌			
	20	140	1000	2000	20	140	1000	2000
リンパ球				↑127				
分葉核好中球				↓73				
単球	↑160	↑200						
異形リンパ球	↓19	↓17	↓26	↓62	↓61	↓68		

↑ ↓ : p<0.05 , ↑ ↓ : p<0.01 (Kruskal-Wallis+adjusted U-test) ,
表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

6. 剖検(表4)

途中死亡動物及び18ヵ月投与した最終屠殺動物の全動物を剖検した。

投与終了時の剖検において、140ppm群以上の雌で副腎の変色が認められた。この変色を示したほとんどの場合、病理組織学的には副腎束状帯の細胞質の好酸性化に関連していたので、本検体の影響を示唆するものと考えられた。更に、140ppm群以上の雄で副腎が肥大していた。しかしながら副腎の肥大と臓器重量の所見との間に明らかな関連性がみられなかった。また、これは雌でも認められたが、用量依存性は認められなかった。

2000ppm群では、他の投与群に比較して、子宮の硬さの変化(硬い)の発現頻度が高かった。これに関連して、病理組織学的検査では子宮内膜のう胞状過形成が認められた。さらに腎臓における小結節が2000ppm群の雄4例のみにおいて認められた。これらの小結節は、顕微鏡的には腎アミロイド症、ならびにその結果として腎表面に結節様変化を伴う慢性腎症として観察された。これらの子宮及び腎臓の剖検に関連した病理組織学的所見は投与の影響であるとは考えられなかったため、上述の子宮および腎臓における肉眼的所見は投与関連の影響を示すものとは考えられなかった。

表4. 主な剖検所見

性別	雄					雌				
	0	20	140	1000	2000	0	20	140	1000	2000
用量(ppm)	0	20	140	1000	2000	0	20	140	1000	2000
副腎	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
肥大	0	1	5	6	11	0	0	3	9	4
変色(dark)	0	1	0	0	1	0	0	1	3	4
腎臓	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
小結節	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0
子宮						50	50	50	50	50
硬さの変化(硬い)						8	7	6	2	14

7. 臓器重量(表5)

投与終了時点で剖検を実施した動物について、脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓(両方)、副腎(両方)、精巣(両方)、精巣上体(両方)、卵巣、子宮の重量を測定し、対体重比も算出した。

副腎において、雄では影響は認められなかったが、雌では、1000ppm群および2000ppm群において対体重比が統計学的に有意に増加した。この増加は病理組織学

的には副腎皮質のアミロイド症に関連しているものと考えられた。このアミロイド症は加齢性病変であり、本系統のマウスでは通常的に認められ、またこの病変の頻度に著明な雌雄差は認められないことから、雌のみで認められたこの副腎の対体重比の増加は偶発的な変化と考えられた。

最終体重のわずかな低値による二次的な変化として、2000ppm 群の雄で脳の対体重比がわずかに増加した。同様に、1000ppm 及び 2000ppm 群の雌の心臓実重量の低下も最終体重のわずかな低下に関連したものと考えられた。

その他でみられた肝臓を含む全ての統計学的な有意差には用量依存性が認められず、それらに対応する病理組織学的所見も認められなかったため、これらは偶発的なものであり、投与関連の影響であるとは考えられなかった。

表 5 臓器重量 (有意差の認められた項目)

性別		雄				雌			
		20	140	1000	2000	20	140	1000	2000
用量									
体重					↓93			(91)	(94)
副腎	実重量								
	対体重比							↑156	↑147
肝臓	実重量	↑115		↑115					
	対体重比	↑117	↑113	↑120	↑119				
精巣 上体	実重量			↓84					
	対体重比			↓88					
卵巢	実重量							↑227	
	対体重比							↑248	
脾臓	実重量			↑156					
	対体重比		↑143	↑162	↑149				
心臓	実重量					↓92		↓85	↓90
	対体重比								
脳	実重量								
	対体重比				↑108				

↑ ↓ : p<0.05 , ↑ ↓ : p<0.01 (Dunnett test+variance analysis)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

() : 統計学的に有意差なし

8. 病理組織学的検査 (表 6 ~11)

途中死亡した動物や切迫屠殺動物及び最終屠殺動物の以下の臓器、組織について 10%緩衝ホルマリンに保存した。

副腎、大動脈、脳、盲腸、結腸、小腸(十二指腸、空腸、回腸)、精巣上体、食道、眼、外涙腺、大腿骨(骨髄、膝関節を含む)、胆のう、ハーダー氏腺、頭-鼻-咽

頭、心臓、腎臓、喉頭、肝臓、肺、リンパ節(頸部、腸間膜)、乳腺、視神経、卵巣、卵管、膵臓、個体識別、下垂体、前立腺、直腸、腸管残余、唾液腺、坐骨神経、精のう(凝固腺を含む)、骨格筋、皮膚(乳腺部)、脊髄(頸部、腰部、胸部)、脾臓、胸骨、胃、精巣、胸腺、甲状腺(上皮小体)、舌、気管、尿管、尿道、膀胱、子宮、子宮頸部、膾、外耳道腺、肉眼的異常部位

尿道、尿管、腸管残余、外耳道腺、個体識別を除き、上記全臓器、組織について病理標本を作製し、病理組織学的検査を行った。染色はヘマトキシリン・エオシンで行った。

8-1. 非腫瘍性病変 (表 7, 表 11)

副腎

副腎皮質では、雄では 140ppm 群でセロイド(リポフスチン)沈着の発現頻度が低下し、1000ppm 群および 2000ppm 群ではセロイド沈着を示す例は認められなかった。雌では、セロイド沈着は 140ppm 群以上で発現頻度および/あるいは程度が低下した。また、通常認められる副腎皮質のび慢性小脂肪滴の発現頻度が 140ppm 群の雌雄で低下し(140ppm 雄統計学的に有意差なし)、1000ppm 群および 2000ppm 群では全く認められなかった。これに伴って、140ppm 群以上の雌雄共に束状帯の細胞質の好酸性化が認められた。これらの影響は組織学的にはステロイド貯蔵の低下(コレステロール含有小胞の減少、小胞周辺の好酸性組織の密集化)を示唆するものであり、血中コレステロール濃度の低下と関連するものと推察した。

また、140ppm 群以上の雌では、A 型細胞増殖の発現頻度が低下した。この変化は生物学的変動範囲内であり、毒性学的影響を示すものではないと考えられた。

アミロイド症(種々の臓器/組織)

臓器毎にアミロイド症の発生頻度を調べたところ、全用量群のマウスにおいて、副腎皮質および肝臓にアミロイド症が認められ、140ppm 群以上の雌雄において発現頻度の増加および/あるいは程度の増強が認められた。140ppm 群以上の雄の膵臓および唾液腺においてもアミロイド症の発現頻度の増加が認められ、雌においては唾液腺、膵臓で 140ppm 群以上(2000ppm 群有意差なし)あるいは 1000ppm 群以上で上皮小体でアミロイド症の発現頻度の増加が認められた。また、これとは対照的に、140ppm 群以上の雄では腸間膜リンパ節、涙腺および精巣、ならびに 2000ppm 群の雌では心臓でアミロイド症の発現頻度の低下が認められ

た。以上のように、アミロイド症にはいろいろな臓器/組織で頻度及び程度の増加あるいは減少が認められた。

また、アミロイド症について、全身性にみられた個体数を基に調べた結果は以下のとおりであった。表6に示したように、雄の発症数では用量に相関した増加は認められず、また、140ppm以上の群で中等度の病変を示す動物が増加したが、程度が用量相関的に増強することはなかった。雌では1000ppmあるいは2000ppmで発症例数がわずかではあるが増加し、統計学的に有意であった。しかし、20ppmから2000ppmの間ではその発症数はほぼ均等に分布し、用量相関的に増加することはなかった。一方程度としては、140ppm以上の群で中等度を示す動物数に増加傾向がみられたが、2000ppmの中等度を示す例が1000ppmでの例より少数であり、重度の例は2000ppmでも認められなかったように、その程度は用量相関的に増強していないものと考えられた。

表6: アミロイド症を示した雄動物数

用量 (ppm)	0	20	140	1000	2000
雄					
評価動物数	50	50	50	50	50
アミロイド症を示した動物数	11	13	14	14	13
程度(平均)					
軽度	10	9	4	3	4
中等度	1	3	10	10	9
重度	0	1	0	1	0
雌					
評価動物数	49	50	50	50	50
アミロイド症を示した動物数	4	10	10	13*	11*
程度(平均)					
軽微	0	1	0	0	2
軽度	4	6	4	4	2
中等度	0	3	5	9	7
重度	0	0	1	0	0

One-sided Exact Fisher Test: * = p<0.05 ** = p<0.01 (01=Control)

マウスにおけるアミロイド症は全身性の病変で、系統、性及び週齢に依存して発現する病変とされている。この試験で使用されたCD-1マウスでは全身性アミロイド症は通常みられる加齢性病変である。文献によれば、アミロイド症は同じ試験施設内であっても試験ごとに、また同系統のマウスを使用していたとしても試験施設ごとに著しいばらつきがあり、対照群の動物でもアミロイド症を示す発生頻度は10~40%であるとの報告がある(Facciniら, 1990年)。本試験におけるアミロイド症の発生率は雄では22%~28%で文献値の範囲にあり、また統計学的にも有意に増加していなかった。一方、雌では発生率は8.2~26%であ

り、1000ppm以上の用量群では統計学的有意に増加していたものの用量相関性は必ずしも明確ではなく、またこの発生率も文献値の範囲内にあった。さらに、雌雄とも病変の程度に用量に相関した明らかな増強もみられなかった。

従って、本試験においてみられたアミロイド症はいろいろな臓器/組織で認められ、その頻度及び程度には増加あるいは減少が見られ、一定の傾向を示さなかった。また個体ごとに見た場合においても、発生率は文献の背景データ範囲内にあり、発生率、程度の増強についても明確な用量相関性がみられなかった。これらのこと、そしてアミロイド症は本系統のマウスでは通常認められる加齢性病変であることから、本試験でみられたアミロイド症は検体投与によるものではなく、偶発的な変化と考えられた。

子宮

剖検時に 2000ppm 群で観察された子宮の硬さの変化(硬い)に関連した所見として、子宮内膜のう胞状過形成が認められた。この所見には用量に依存した増加は認められなかった。従って、本病理所見及び関連する剖検所見は検体の影響とは考えられなかった。

腎臓

2000ppm 群の雄 4 例にのみ認められた小結節に関連した所見として、腎アミロイド症、ならびにその結果として腎表面に結節様変化を伴った慢性腎症が観察された。雌雄共に、これらの病理組織学的所見に検体投与に関連した影響は認められなかったため、これに関連した剖検所見も投与に関連した所見とは考えられなかった。

その他に認められた非腫瘍性病変の種類、発現頻度、および重症度については、検体投与群と対照群との間に差は認められなかった。

表 6 - 18ヶ月計画投与動物の主な非腫瘍性病変

性別 用量(ppm)	雄					雌				
	0	20	140	1000	2000	0	20	140	1000	2000
副腎 検査数	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
A-細胞増殖	22	15	18	19	18	47 ^{###}	46	42*	26**	31**
セロイド沈着	19 ^{###}	20	9*	0**	0**	22 ^{###}	32*	14	1**	4**
程度平均	1.7	2.0	1.6			1.7	2.0	20.	1.0	1.0
び慢性小脂肪滴	19 ^{###}	20	13	0**	0**	31 ^{###}	30	17**	0**	0**
程度平均	1.0	1.0	1.0			1.0	1.0	1.0		
束状帯 細胞質好酸性化	0 ^{###}	0	8**	35**	40**	0 ^{###}	0	8**	26**	38**
程度平均			1.0	1.0	1.0			1.0	1.0	1.0
アミロイド症	9	11	12	12	10	4 ^{###}	7	9	11*	11*
肝臓 検査数	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
アミロイド症	8	6	11	9	10	2*	6	8*	10*	7
脾臓 検査数	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
アミロイド症	0 ^{###}	0	5*	7**	7**	0*	1	7**	8**	3
唾液腺 検査数	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
アミロイド症	0 ^{###}	0	1	4	4	0*	4	10**	10**	3
胃 検査数	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
アミロイド症	5	7	12	10	10	0*	6*	10**	9**	7**
上皮小体 検査数	45	47	44	45	44	46	43	44	47	46
アミロイド症	3	8	10*	10*	8	2*	6	7	10*	8*
腸間膜リンパ節 検査数	49	50	49	50	50	49	49	50	50	50
アミロイド症	10 [#]	9	7	5	4	3	6	6	8	3
涙腺 検査数	48	46	49	50	50	49	48	48	48	50
アミロイド症	7 ^{###}	8	1*	3	2	2	1	2	2	0
精巣 検査数	49	50	49	50	50					
アミロイド症	5 ^{###}	9	5	1	0*					
心臓 検査数	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
アミロイド症	5	11	12	7	4	3	5	5	5	0
子宮 検査数						49	50	50	50	50
のう胞状子宮内膜過形成						29	30	31	26	35
腎臓 検査数	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
アミロイド症	8	12	12	10	10	4	7	8	10	7
慢性腎症	10	13	15	12	12	7	9	13	12	7

= p ≤ 0.05, ### = p ≤ 0.01 (Cocran-Amitage 傾向検定),

* = p ≤ 0.05, ** = p ≤ 0.01 (Fisher 検定(片側))

8-2. 腫瘍性病変 (表 7~9, 表 11)

傾向検定で統計学的な有意差がいくつか認められた。しかしながら、対照群との違いはわずかである、背景データ範囲内にある、および/あるいは群間比較では統計学的有意差が認められないことからこれらは投与に関連した影響とは考えられなかった。

したがって、全ての腫瘍性病変の組織形態、発現率、臓器分布に投与に関連した影響はみられなかったものと結論した。

腫瘍を有する動物数 (表 7)、良性及び悪性腫瘍数並びに総腫瘍数 (表 8) には雌雄共に用量に関連した増加は認められなかった。また、腫瘍動物の発生における経時的変化 (表 9) に用量依存性は認められなかった。

表 7-途中死亡例あるいは試験終了時に屠殺した担腫瘍動物

性別 用量 (ppm)	雄					雌				
	0	20	140	1000	2000	0	20	140	1000	2000
	途中死亡あるいは切迫屠殺動物									
検査動物数	14	17	15	16	14	7	8	19	18	12
動物数;腫瘍を有する(総)	6	8	6	4	3	4	3	8	3	6
良性腫瘍のみを有する	3	4	3	0	1	0	1	2	1	3
悪性腫瘍のみを有する	3	2	3	4	0	4	2	5	2	3
良悪腫瘍を有する	0	2	0	0	2	0	0	1	0	0
転移性腫瘍を有する	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	最終解剖動物									
検査動物数	35	33	34	34	36	42	42	31	32	38
動物数;腫瘍を有する(総)	15	10	10	15	16	9	14	11	12	12
良性腫瘍のみを有する	10	6	8	11	10	5	9	8	6	7
悪性腫瘍のみを有する	4	3	1	3	5	2	5	3	4	4
良悪腫瘍を有する	1	1	1	1	1	2	0	0	2	1
転移性腫瘍を有する	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	全動物									
検査動物数	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
動物数;腫瘍を有する(総)	21	18	16	19	19	13	17	19	15	18
良性腫瘍のみを有する	13	10	11	11	11	5	10	10	7	10
悪性腫瘍のみを有する	7	5	4	7	5	6	7	8	6	7
良悪腫瘍を有する	1	3	1	1	3	2	0	1	2	1
転移性腫瘍を有する	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

表 8. 全動物の腫瘍数

性	雄					雌				
	0	20	140	1000	2000	0	20	140	1000	2000
用量 (ppm)	0	20	140	1000	2000	0	20	140	1000	2000
良性腫瘍数	14	16	13	15	16	7	11	17	13	15
悪性腫瘍数	9	9	5	9	9	8	7	10	8	8
総腫瘍数	23	25	18	24	25	15	18	27	21	23

両側/同一部位で組織形態の同じ腫瘍の多中心性の腫瘍は単一腫瘍として評価した。

表 9. 途中死亡あるいは試験終了時に屠殺した動物の担腫瘍動物数

性別	雄					雌					
	0	20	140	1000	2000	0	20	140	1000	2000	
用量 (ppm)	0	20	140	1000	2000	0	20	140	1000	2000	
途中死亡例	15	17	16	16	14	8	8	19	18	12	
腫瘍数*											
良性	3	7	3	0	3	0	1	7	1	4	
悪性	3	4	3	4	2	4	2	6	2	3	
総	6	11	6	4	5	4	3	13	3	7	
担腫瘍動物数	6	8	6	4	3	4	3	8	3	6	
週											
1 - 13											
14 - 26						1					
27 - 39								1			
40 - 52	1			1							
53 - 65	1			1	2	3	2	1	2	1	
66 - 79	4	8	3	2							
全期間	6	8	6	4	3	4	3	8	3	6	

* = 両側/同一部位で組織形態の同じ腫瘍の多重腫瘍及びは単一腫瘍として評価した。

以上の結果から、本剤のマウスに対する 18 ヶ月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、2000ppm 群の雄で体重増加抑制が認められた。140ppm 群以上の雌雄では副腎において通常認められる皮質のび慢性小脂肪滴を示す例の減少、副腎束状帯細胞質の好酸性化の増加が認められた。

従って本試験条件下において、本剤の雌雄マウスに対する無毒性量 (NOAEL) は、飼料中濃度 20ppm (雄 : 3.3mg/kg 体重/日, 雌 : 3.8mg/kg 体重/日) であった。

本検体に発がん性は認められなかった。

表 10-1 主要な非腫瘍性病変

性別	雄					雌					
	0	20	140	1000	2000	0	20	140	1000	2000	
用量 (ppm)											
所見/検査数											
途中死亡動物	副腎	14	17	15	16	14	7	8	19	18	12
	A-細胞増殖	7	3	3	4	3	5	7	13	4*	8
	セロイド沈着	3	7	2	0	0	1	5	4	0	1
	び漫性の小脂肪滴	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0
	束状帯細胞質好酸性化	0	0	6*	8**	6**	0	0	2	3	6*
	アミロイド症	4	8	7	7	8	2	3	6	8	4
	肝臓	14	17	15	16	14	7	8	19	18	12
	アミロイド症	4	5	6	7	8	1	2	6	8	4
	脾臓	14	17	15	16	14	7	8	19	18	12
	アミロイド症	0	0	3	5*	6*	0	0	4	6	2
	唾液腺	14	17	15	16	14	7	8	19	18	12
	アミロイド症	0	0	1	3	4*	0	1	6	8*	2
	胃	14	17	15	16	14	7	8	19	18	12
	アミロイド症	3	4	6	7	7	0	2	6	7	3
	上皮小体	13	17	13	12	11	6	7	15	18	12
	アミロイド症	2	6	4	5	5	1	2	4	8	4
	腸間膜リンパ節	14	17	15	16	14	7	8	19	18	12
	アミロイド症	5	7	2	2	2	1	3	3	7	1
	涙腺	14	15	15	16	14	7	7	18	17	12
	アミロイド症	5	6	1	3	2	2	1	1	2	0
	精巣	14	17	15	16	14					
	アミロイド症	1	7*	1	1	0					
	心臓	14	17	15	16	24	7	8	19	18	12
	アミロイド症	1	8	6*	6	3	2	1	2	4	0
	子宮						7	8	19	18	12
	のう胞状子宮内膜過形成						1	5	8	5	6
	腎臓	14	17	15	16	24	7	8	19	18	12
	アミロイド症	4	9	7	8	8	2	3	6	8	4
	慢性腎症	6	11	9	9	9	3	4	10	10	5

*= $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ (Fisher 検定(片側))

表 10-2. 主な非腫瘍性病変

性別	雄					雌					
	0	20	140	1000	2000	0	20	140	1000	2000	
用量(ppm)											
所見/検査数											
最終層殺動物	副腎	35	33	34	34	36	42	42	31	32	38
	A-細胞増殖	15	12	15	15	15	42	39	29	22**	23**
	セロイド沈着	16	13	7	0**	0**	21	27	10	1**	3**
	び漫性の小脂肪滴	19	17	13	0**	0**	31	30	16*	0**	0**
	束状帯細胞質好酸性化	0	0	2	27**	34**	0	0	6**	23**	32**
	アミロイド症	5	3	5	5	2	2	4	3	3	7
	肝臓	35	33	34	34	36	42	42	31	32	38
	アミロイド症	4	1	5	2	2	1	4	2	2	3
	膵臓	35	33	34	34	36	42	42	31	32	38
	アミロイド症	0	0	2	2	1	0	1	3	2	1
	唾液腺	35	33	34	34	36	42	42	31	32	38
	アミロイド症	0	0	0	1	0	0	3	4*	2	1
	胃	35	33	34	34	36	42	42	31	32	38
	アミロイド症	2	3	6	3	3	0	4	4*	2	4*
	上皮小体	32	30	31	33	33	40	36	29	29	34
	アミロイド症	1	2	6*	5	3	1	4	3	2	4
	腸間膜リンパ節	35	33	34	34	36	42	41	31	32	38
	アミロイド症	5	2	5	3	2	2	3	3	1	2
	涙腺	34	31	34	34	36	42	41	30	31	38
	アミロイド症	2	2	0	0	0	0	0	1	0	0
	精巣	35	33	34	34	36					
	アミロイド症	4	2	4	0	0					
	心臓	35	33	34	34	36	42	42	31	32	38
	アミロイド症	4	3	6	1	1	1	4	3	1	0
	子宮						42	42	31	32	38
	のう胞状子宮内膜過形成						28	25	23	21	29
	腎臓	35	33	34	34	36	42	42	31	32	38
	アミロイド症	4	3	5	2	2	2	4	2	2	3
慢性腎症	4	2	6	3	3	4	5	3	2	2	

* = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ (Fisher 検定(片側))

表 10-3. 主な非腫瘍性病変

性別	雄					雌				
	0	20	140	1000	2000	0	20	140	1000	2000
用量 (ppm)										
所見/検査数										
副腎	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
A-細胞増殖	20	15	18	19	18	47##	46	42*	26**	31**
セロイド沈着	19##	20	9*	0**	0**	22##	32*	14	1**	4**
び漫性の小脂肪滴	19##	20	13	0**	0**	31##	30	17**	0**	0**
束状帯細胞質好酸性化	0##	0	8**	35**	40**	0##	0	8**	26**	38**
アミロイド症	9	11	12	12	10	4##	7	9	11*	11*
肝臓	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
アミロイド症	8	6	11	9	10	2*	6	8*	10*	7
脾臓	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
アミロイド症	0##	0	5*	7**	7**	0#	1	7**	8**	3
唾液腺	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
アミロイド症	0##	0	1	4	4	0#	4	10**	10**	3
胃	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
アミロイド症	5	7	12	10	10	0#	6*	10**	9**	7**
全動物	45	47	44	45	44	46	43	44	47	46
上皮小体	3	8	10*	10*	8	2#	6	7	10*	8*
アミロイド症	49	50	49	50	50	49	49	50	50	50
腸間膜リンパ節	49	50	49	50	50	49	49	50	50	50
アミロイド症	10#	9	7	5	4	3	6	6	8	3
涙腺	48	46	49	50	50	49	48	48	48	50
アミロイド症	7##	8	1*	3	2	2	1	2	2	0
精巣	49	50	49	50	50					
アミロイド症	5##	9	5	1	0*					
心臓	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
アミロイド症	5	11	12	7	4	3	5	5	5	0
子宮						49	50	50	50	50
のう胞状子宮内膜過形成						29	30	31	26	35
腎臓	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
アミロイド症	8	12	12	10	10	4	7	8	10	7
慢性腎症	10	13	15	12	12	7	9	13	12	7

= $p \leq 0.05$, ## = $p \leq 0.01$ (Cocran-Amitage 傾向検定)

* = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ (Fisher 検定(片側))

表 11-1. 腫瘍性病変

性別	雄					雌				
	0	20	140	1000	2000	0	20	140	1000	2000
用量(ppm)										
所見/検査数										
血液リンパ網内系	14	17	15	16	14	7	8	19	18	12
リンパ腫 m	1	1	2	1	2	2	2	3	2	2
組織球性肉腫 m	0	1	0	1	0	1	0	2	0	0
肺	14	17	15	16	14	7	8	19	18	12
細気管支/肺胞腺腫 b	2	3	0	0	1	0	0	2	0	0
細気管支/肺胞癌 m	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
肝臓	14	17	15	16	14	7	8	19	18	12
肝細胞腺腫 b	0	3	1	0	1	0	0	0	0	0
肝細胞癌 m	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
血管腫 b	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
血管肉腫 m	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
腸間膜リンパ節	14	17	15	16	14	7	8	19	18	12
途 血管腫 b	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
中 ハーダー氏腺	14	17	15	16	14	7	8	19	18	12
死 腺腫 b	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
亡 乳腺部位	14	17	15	16	14	7	8	19	18	12
動物 腺癌 m	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
骨格筋	14	17	15	16	14	7	8	19	18	12
血管肉腫 m	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
子宮						7	8	19	18	12
間質ポリープ b						0	1	2	0	2
腺管ポリープ b						0	0	0	0	1
平滑筋腫 b						0	0	2	1	0
子宮内膜間質肉腫 m						1	0	0	0	0
精巣	14	17	15	16	14					
ライディッヒ細胞腫瘍 b	1	0	0	0	0					
胸骨/骨髄	14	17	15	16	14	7	8	19	18	12
骨肉腫 m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
頭部 [§]	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
骨腫 b	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-

§:通常検査を行わない, b=良性, m=悪性

*= $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ (Fisher 検定(片側))

表 11-2. 腫瘍性病変

性別	雄					雌				
	0	20	140	1000	2000	0	20	140	1000	2000
用量 (ppm)										
所見/検査数										
血液リンパ網内系	35	33	34	34	36	42	42	31	32	38
リンパ腫 m	1	1	1	1	1	1	0	1	2	1
組織球性肉腫 m	0	0	0	0	0	0	3	1	1	1
肺	35	33	34	34	36	42	42	31	32	38
細気管支/肺胞腺腫 b	4	4	3	5	5	1	4	1	2	1
細気管支/肺胞癌 m	4	2	1	2	2	1	1	0	0	1
肝臓	35	33	34	34	36	42	42	31	32	38
肝細胞腺腫 b	3	3	5	7	7	0	1	0	1	0
肝細胞癌 m	0	2	0	1	2	0	0	0	0	0
血管腫 b	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
血管肉腫 m	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
腎臓	35	33	34	34	36	42	42	31	32	38
尿細管癌 m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
結腸	35	33	34	34	36	42	42	31	32	38
腺癌 m	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
胃	35	33	34	34	36	42	42	31	32	38
扁平上皮細胞癌 m	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
脾臓	35	33	34	34	36	42	42	31	32	38
血管腫 b	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
腸間膜リンパ節	35	33	34	34	36	42	41	31	32	38
血管腫 b	0	0	0	0	0	0	2	1	0	1
ハーダー氏腺	35	33	34	34	36	42	42	31	32	38
腺腫 b	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1
乳腺部位	35	33	34	34	36	42	42	31	32	38
腺癌 m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
皮膚	35	33	34	34	36	42	42	31	32	38
線維性組織球腫 b	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
脳	35	33	34	34	36	42	42	31	32	38
髄膜肉腫 m	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
副腎皮質	35	33	34	34	36	42	42	31	32	38
皮質腺腫 b	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
甲状腺	35	33	34	34	36	42	42	31	32	38
ろ胞細胞腺腫 m	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
下垂体	35	33	34	34	36	42	42	30	32	37
下垂体前葉腺腫 b	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

b=良性, m=悪性

*= p ≤ 0.05, ** = p ≤ 0.01 (Fisher 検定(片側))

表 11-3. 腫瘍性病変

	性別	雄					雌				
	用量 (ppm)	0	20	140	1000	2000	0	20	140	1000	2000
	所見/検査数										
最終層殺動物	卵巣						42	42	31	32	38
	顆粒膜細胞腫 b						0	0	0	1	0
	囊腺腫 b						0	0	2	2	2
	子宮						42	42	31	32	38
	顆粒細胞腫 b						0	2	0	0	0
	間質ポリープ b						2	0	2	2	4
	腺管ポリープ b						0	0	0	1	1
	腺癌 m						0	0	0	1	0
	血管腫 b						0	0	0	1	0
	平滑筋腫 b						2	0	3	1	0
	平滑筋肉腫 m						0	0	1	1	0
	子宮内膜間質肉腫 m						2	0	0	0	0
	膣						42	41	31	32	38
	間質ポリープ b						0	0	0	0	1
	四肢 ^s		-	-	-	-	-	1	-	1	-
骨腫 b		-	-	-	-	-	1	-	0	-	-
全動物	血液リンパ網内系	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
	リンパ腫 m	2	2	3	2	3	3	2	4	4	3
	組織球性肉腫 m	0	1	0	1	0	1	3	3	1	1
	肺	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
	細気管支/肺胞腺腫 b	6	7	3	5	6	1	4	3	2	1
	細気管支/肺胞癌 m	5	2	1	3	2	1	1	0	0	1
	肝臓	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
	肝細胞腺腫 b	3	6	6	7	8	0	1	0	1	0
	肝細胞癌 m	0	4	0	1	2	0	0	0	0	0
	血管腫 b	0	1	0	0	2	0	0	1	0	0
	血管肉腫 m	1	0	1	2	1	0	0	0	0	0
	腎臓	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
	尿細管癌 m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	結腸	49	50	49	49	50	49	50	50	50	50
	腺癌 m	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
	胃	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
	扁平上皮細胞癌 m	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	脾臓	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
	血管腫 b	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	腸間膜リンパ節	49	50	49	50	50	49	49	50	50	50
血管腫 b	0	0	1	0	0	0	2	1	0	1	

^s: 通常検査を行わない, b=良性, m=悪性

= $p \leq 0.05$, ### = $p \leq 0.01$ (傾向検定, Peto 法, 全動物について実施), * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ (Fisher 検定 (片側))

表 11-4. 腫瘍性病変

性別	雄					雌				
	0	20	140	1000	2000	0	20	140	1000	2000
用量(ppm)										
所見/検査数										
ハーダー氏腺	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
腺腫 b	1	1	2	1	0	1	1	0	0	2
乳腺部位	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
腺癌 m	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
骨格筋	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
血管肉腫 m	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
皮膚	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
線維性組織球腫 b	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
脳	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
髄膜肉腫 m	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
副腎皮質	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
皮質腺腫 b	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
甲状腺	49	50	49	50	50	49	50	50	50	50
ろ胞細胞腺腫 m	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
下垂体	48	49	49	50	50	49	50	49	49	49
下垂体前葉腺腫 b	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
精巣	49	50	49	50	50					
ライディッヒ細胞腫瘍 b	1	0	0	0	0					
全動物						49	50	50	50	50
卵巣										
顆粒膜細胞腫 b						0	0	0	1	0
囊腺腫 b						0#	0	2	2	2
子宮						49	50	50	50	50
顆粒細胞腫 b						0	2	0	0	0
間質ポリープ b						2#	1	4	2	6
腺管ポリープ b						0#	0	0	1	2
腺癌 m						0	0	0	1	0
血管腫 b						0	0	0	1	0
平滑筋腫 b						2	0	5	2	0
平滑筋肉腫 m						0	0	1	1	0
子宮内膜間質肉腫 m						3#	0	0	0	0
腫						49	49	49	50	50
間質ポリープ b						0	0	0	0	1
胸骨/骨髄	49	49	49	50	50	48	50	50	50	50
骨肉腫 m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
四肢 [§]	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-
骨腫 b	-	-	-	-	-	1	-	0	-	-
頭部 [§]	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
骨腫 b	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-

§: 通常検査を行わない, b=良性, m=悪性

#=p ≤ 0.05, ##=p ≤ 0.01(傾向検定, Peto 法), *=p ≤ 0.05, **=p ≤ 0.01(Fisher 検定(片側))