

WBC及びLymの増加、血液生化学的検査において雄で認められたナトリウム、塩素、カルシウムの減少、A/G比の増加、雌で認められた塩素の増加については、その変化が軽微であり、用量あるいは雌雄間で一貫性が認められなかったことから、検体投与による影響ではないと判断された。リンについては、20000 ppm 投与群雌雄の他に、2000 及び 6300 ppm 投与群の雌においても増加したが、用量相関性もないことから検体投与による影響ではないと判断された。

臓器重量測定において、6300 及び 20000 ppm 投与群の雌で、肝比重量¹が増加した。しかし、血液生化学的及び病理組織学的検査等においては肝毒性を示唆する変化が認められないため、これらの変化は検体投与による毒性影響ではないと考えられた。

本試験において、6300 ppm 以上投与群の雄及び 20000 ppm 投与群の雌で、体重増加抑制、摂餌量減少等が認められたことから、無毒性量は雄で 2000 ppm (171 mg/kg 体重/日)、雌で 6300 ppm (587 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 26)

表 19 ラット 90 日間亜急性毒性試験で認められた毒性所見

| 投与群 | 雄 | 雌 |
|----------------|--|---|
| 20000 ppm | <ul style="list-style-type: none"> ・ PLT 増加 ・ ALP、AST、GGT、URE、リン増加、TP 低下 ・ 肝比重量増加 ・ 小葉中心性肝細胞肥大、下顎リンパ節洞赤血球増加/赤血球貪食、腸間膜リンパ節洞血球増加/赤血球貪食 | <ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制 ・ 摂餌量減少、食餌効率低下 ・ PLT 増加 ・ TG 低下、リン増加、URE 増加 |
| 6300 ppm 以上 | <ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制 ・ 摂餌量減少、食餌効率低下 | 6300 ppm 以下毒性所見なし |
| 2000 ppm | 毒性所見なし | |

(2) 90 日間亜急性毒性試験 (イヌ)

ビーグル犬(一群雌雄各 4 匹)を用いたカプセル経口(原体:0、100、300 及び 1000 mg/kg 体重/日)投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

各投与群で認められた毒性所見は表 20 に示されている。

血液生化学的検査において、投与 6 週に全投与群の雌雄で T.Bil が有意に増加した。しかし、対照群を含む全動物が背景データを超える異常な高値を示しており、RBC 及び尿中ビリルビンには影響がなかったこと、投与 13 週に同様の変化が認められなかったことから、検体投与による影響とは考えられなかった。その他の血液生化学的検査項目及び血液学的検査項目において有意な変化が認められたが、いずれの変化も軽微であり、用量あるいは雌雄間で一貫性が認められなかったことから、検体投与の影響ではないと判断された。

¹ : 体重比重量のことを比重量という (以下同じ)。

尿検査において、1000 mg/kg 体重/日投与群の雌で尿量の有意な減少が投与6及び13週に認められたが、投与開始前の傾向を反映しており、検体投与の影響ではないと判断された。

本試験において、1000 mg/kg 体重/日投与群の雌雄で体重増加抑制及び摂餌量減少等が認められたことから、無毒性量は雌雄とも300 mg/kg 体重/日であると考えられた。(参照28)

表20 イヌ90日間亜急性毒性試験で認められた毒性所見

| 投与群 | 雄 | 雌 |
|------------------|---|---|
| 1000 mg/kg 体重/日 | <ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・摂餌量減少(投与4週まで) | <ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・摂餌量減少(投与4週まで) ・ALP増加 |
| 300 mg/kg 体重/日以下 | 毒性所見なし | 毒性所見なし |

(3) 21日間亜急性経皮毒性試験(ラット)

SDラット(1群雌雄各10匹)を用いた経皮(原体:0、100、300及び1000 mg/kg 体重/日)投与(1日1回6時間、閉塞貼付)による21日間亜急性経皮毒性試験が実施された。

各投与群で認められた毒性所見は表21に示されている。

血液学的及び血液生化学的検査において、いくつかの項目で統計学的に有意な変化が認められたが、いずれの変化も軽微であり、用量あるいは雌雄間で一貫性が認められなかったことから、検体投与の影響ではないと判断された。

病理組織学的検査において、300 mg/kg 体重/日投与群雌及び1000 mg/kg 体重/日投与群雌雄の投与部位の表皮過形成の程度の増強が認められたが、検体投与方法に起因した物理的刺激による変化と考えられ、毒性学的意義はないと判断された。

本試験において、1000 mg/kg 体重/日投与群の雄において体重増加抑制及び食餌効率の減少が認められ、雌では検体投与の影響は認められなかったことから、無毒性量は雄で300 mg/kg 体重/日、雌で1000 mg/kg 体重/日であると考えられた。(参照29)

表21 ラット21日間亜急性経皮毒性試験で認められた毒性所見

| 投与群 | 雄 | 雌 |
|------------------|--|---------|
| 1000 mg/kg 体重/日 | <ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・食餌効率減少 | ・毒性所見なし |
| 300 mg/kg 体重/日以下 | ・毒性所見なし | |

1.1. 慢性毒性試験及び発がん性試験

(1) 1年間慢性毒性試験(イヌ)

ビーグル犬（一群雌雄各 4 匹）を用いたカプセル経口（原体：0、10、100、300 及び 1000 mg/kg 体重/日）投与による 1 年間慢性毒性試験が実施された。

各投与群で認められた毒性所見は表 22 に示されている。

一般症状において、液状便が 1000 mg/kg 体重/日投与群雌雄で投与期間を通じて認められ、300 mg/kg 体重/日投与群においても断続的に認められた。しかし、本所見に関連した消化器の病理組織学的変化（炎症等）が認められなかったことから、毒性学的意義はないと考えられた。

体重増加量においては、雄の 100 mg/kg 体重/日以上投与群及び雌の 1000 mg/kg 体重/日投与群で投与 0～4 週、雌の 100 mg/kg 体重/日以上投与群の 0～13 週で有意な低値が認められた。

血液学的、血液生化学的検査（TP 及び Alb 以外）、尿検査において、いくつかの項目に有意な変化がみられたが、それらの変化は軽微であり、投与前と同様の傾向を示すか、用量、雌雄あるいは検査時期で一貫性が認められなかったことから、検体投与の影響とは考えられなかった。

臓器重量測定において、100、300 及び 1000 mg/kg 体重/日投与群の雄で、副腎の比重量が有意に増加した。この変化は、300 及び 1000 mg/kg 体重/日投与群では病理組織学的検査で認められた皮質細胞肥大と関連していたが、100 mg/kg 体重/日投与群では関連する病理組織学的変化は認められないため、同群における副腎比重量増加には毒性学的意義はないと判断された。

剖検において、食道の退色が 300 及び 1000 mg/kg 体重/日投与群の雄で認められたが、関連する病理組織学的変化は認められなかった。雌雄の投与群で、胸腺の小型化が認められ、病理組織学的検査で認められた退縮/萎縮の程度と関連していた。

本試験において、100 mg/kg 体重/日以上投与群の雌雄で体重増加抑制が認められたことから、無毒性量は雌雄ともに 10 mg/kg 体重/日であると考えられた。（参照 30）

表 22 イヌ 1 年間慢性毒性試験で認められた毒性所見

| 投与群 | 雄 | 雌 |
|------------------|---|--|
| 1000 mg/kg 体重/日 | <ul style="list-style-type: none"> ・ 摂餌量減少 ・ TP 低下、Alb 低下 ・ 小葉中心性肝細胞肥大 | <ul style="list-style-type: none"> ・ TP 低下、Alb 低下 |
| 300 mg/kg 体重/日以上 | <ul style="list-style-type: none"> ・ 副腎比重量増加 ・ 副腎皮質細胞肥大(2 匹) | <ul style="list-style-type: none"> ・ 摂餌量減少 (1-4 週)(有意差は 1000 mg/kg 体重/日投与群のみ) |
| 100 mg/kg 体重/日以上 | <ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制 | <ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制 |
| 10 mg/kg 体重/日 | 毒性所見なし | 毒性所見なし |

(2) 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験（ラット）

Wistar ラット（一群雌雄各 70 匹：発がん性群一群雌雄各 50 匹、慢性毒性群一群雌雄各 20 匹）を用いた混餌（原体：0、200（慢性毒性群のみ）、2000、10000 及び 20000 ppm：平均検体摂取量は表 23 参照）投与による 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験が実施された。

表 23 ラット 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験の平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)

| 投与群 | | 200 ppm | 2000 ppm | 10000 ppm | 20000 ppm |
|--------------------|---|---------|----------|-----------|-----------|
| 慢性毒性群 (1-52 週) | 雄 | 11.1 | 112 | 568 | 1160 |
| | 雌 | 14.3 | 147 | 753 | 1500 |
| 発がん性群 (1-104 週) | 雄 | — | 96.0 | 496 | 1000 |
| | 雌 | — | 129 | 697 | 1440 |

各投与群で認められた毒性所見は表 24 に示されている。

発がん性群において、最後の 13 週に 10000 及び 20000 ppm 投与群の雌で死亡が増加し、20000 ppm 投与群では生存率が有意に低下した。

血液学的検査では、検体投与の影響は認められなかった。

血液生化学的検査において、URE、Cre、Glu、T.Chol 及び TG に統計学的に有意な変動が認められたが、いずれの個体値も背景データの範囲内にあり、用量関連性ないし検査時期間での一貫性が認められなかったことから、検体投与の影響ではないと判断した。

尿検査において、尿量が 20000 ppm 投与群雄で投与 12 週に低下し、投与 51 週に雌の投与群で低下した。これらの変化は、軽度で用量相関性のない変化であり、実施機関の背景データの範囲内の変動であったことから、検体投与による影響とは考えられなかった。

病理組織学的検査の結果、前胃の扁平上皮癌が 20000 ppm 投与群雌 1 匹で、扁平上皮乳頭腫が 10000 ppm 投与群雌 1 匹及び 20000 ppm 投与群雌 2 匹で認められた(表 25 参照)。10000 及び 20000 ppm 投与群の雌では、前胃に炎症性及び過形成性変化が認められており、前胃に認められた腫瘍は、慢性炎症性変化に起因すると考えられた。

非腫瘍性病変のうち、検体投与の影響と考えられる病変が、肝臓、腎臓、前胃、盲腸、十二指腸、甲状腺及び腸間膜リンパ節に認められた。

腎臓の皮質尿細管色素沈着が慢性毒性群及び発がん性群の雌雄で認められ、この色素はシュモール反応陽性であり、リポフスチンであることが証明された。

本試験において、2000 ppm 以上投与群の雌雄に体重増加抑制、肝比重量増加及び小葉中間帯肝細胞空胞化の増加等が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 200 ppm (雄: 11.1 mg/kg 体重/日、雌: 14.3 mg/kg 体重/日) であると考えられた。10000 ppm 以上投与群の雌雄で肝細胞腺腫が増加し、10000 ppm 以上投与群の雌で前胃腫瘍が低頻度ながら発生した。(参照 32)

表 24 ラット 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験で認められた毒性所見

| 投与群 | 試験群 | 雄 | 雌 |
|-------|-----|-------------|-------------|
| 20000 | 両群 | ・腎皮質尿細管色素沈着 | ・小葉中心性肝細胞肥大 |

| | | | |
|--------------------|----------|---|--|
| ppm | 慢性 毒性 | <ul style="list-style-type: none"> ・肝外胆管拡張 ・肝門脈周囲炎症 | <ul style="list-style-type: none"> ・肝外胆管拡張 |
| | 発がん 性 | <ul style="list-style-type: none"> ・肝嚢胞 ・甲状腺濾胞細胞肥大 | <ul style="list-style-type: none"> ・生存率低下 ・背部脱毛 ・肝小葉像明瞭化、骨格筋萎縮 ・甲状腺濾胞細胞肥大、甲状腺嚢胞状濾胞細胞過形成 ・子宮筋層萎縮、子宮筋層線維化 ・腔上皮粘液分泌低下 ・前胃扁平上皮癌 |
| 10000 ppm 以上 | 両群 | <ul style="list-style-type: none"> ・摂餌量減少 ・食餌効率減少 ・小葉中心性肝細胞肥大 | <ul style="list-style-type: none"> ・食餌効率減少 ・肝比重量増加 ・腎比重量増加 |
| | 慢性 毒性 | <ul style="list-style-type: none"> ・腸間膜リンパ節洞赤血球増加/赤血球貪食、肥満細胞症（有意差は20000ppmのみ） | <ul style="list-style-type: none"> ・GGT 増加(26週時) ・尿 pH 上昇、尿蛋白増加 ・肝内胆管過形成 ・腎皮質尿細管好塩基性化(有意差は20000ppmのみ) ・腸間膜リンパ節洞赤血球増加/赤血球貪食(有意差は20000ppmのみ)、肥満細胞症 |
| | 発がん 性 | <ul style="list-style-type: none"> ・腹部脱毛 ・肝絶対重量増加 ・肝嚢胞性変性 ・腎皮質尿細管色素沈着、慢性腎症（有意差は20000ppmのみ）、皮質尿細管好塩基性化、腎乳頭鉍質沈着、尿円柱減少 ・腸間膜リンパ節洞赤血球増加/赤血球貪食(有意差は20000ppmのみ)、肥満細胞症 ・肝細胞腺腫 | <ul style="list-style-type: none"> ・削瘦、立毛、円背位、過剰咀嚼、歯牙退色 ・肝絶対重量増加 ・腸間膜リンパ節うっ血、子宮非薄化 ・小葉中心性肝細胞肥大、小葉中間帯肝細胞空胞化 ・慢性腎症、腎乳頭鉍質沈着 ・腸間膜リンパ節洞赤血球増加/赤血球貪食、肥満細胞症(有意差は10000ppmのみ)、洞組織球症 ・前胃上皮過形成/角化亢進/潰瘍/粘膜下織炎症/粘膜下織浮腫(有意差は20000ppmのみ)、漿膜炎 ・前胃扁平上皮乳頭腫 ・盲腸粘膜下織浮腫(有意差は20000ppmのみ) ・角膜炎 |

| | | | |
|-------------|------|--|--|
| | | | ・肝細胞腺腫 |
| 2000 ppm 以上 | 両群 | ・体重増加抑制 ・肝比重量増加 ・肝内胆管過形成 | ・体重増加抑制 ・摂餌量減少 ・腎皮質尿細管色素沈着(リポフスチン) |
| | 慢性毒性 | ・GGT 増加 ・尿 pH 上昇 ・腎比重量増加 ・小葉中間帯肝細胞空胞化 | ・肝比重量増加 ・小葉中間帯肝細胞空胞化 (有意差は 10000ppm 以上) |
| | 発がん性 | ・小葉中心性肝細胞肥大 | ・肝内胆管過形成 ・腎皮質尿細管好塩基性化(2000 ppm 群のみ) |
| 200 ppm | 慢性毒性 | 毒性所見なし | 毒性所見なし |

表 25 ラットの 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験において認められた
肝臓及び前胃腫瘍発生数

| 性別 | | 雄 | | | | 雌 | | | |
|----------------|--------|----|------|-------|-------|----|------|-------|-------|
| 投与群 (ppm) | | 0 | 2000 | 10000 | 20000 | 0 | 2000 | 10000 | 20000 |
| 検査動物数 | | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| 肝・肝細胞 腺腫 | 最終と殺動物 | 0 | 2 | 9↑ | 12↑ | 0 | 1 | 16↑ | 10↑ |
| | 死亡動物 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 8↑ | 18↑ |
| | 全動物 | 0 | 2 | 10↑ | 13↑ | 0 | 1 | 24↑ | 28↑ |
| 肝・肝細胞 癌 | 最終と殺動物 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| | 死亡動物 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 全動物 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| 前胃・扁平 上皮乳頭腫 | 最終と殺動物 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 死亡動物 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| | 全動物 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 前胃・扁平 上皮癌 | 最終と殺動物 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | 死亡動物 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 全動物 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |

Fisher 直接確率法、↑↓ : p<0.05、↑↓ : p<0.01

(3) 18 カ月間発がん性試験 (マウス)

ICR マウス (一群雌雄各 50 匹) を用いた混餌 (原体: 0、100、800、4000 及び 8000 ppm: 平均検体摂取量は表 26 参照) 投与による 18 カ月間発がん性試験が実施された。

表 26 マウス 18 カ月間発がん性試験の平均検体摂取量

| 投与群 | | 100 ppm | 800 ppm | 4000 ppm | 8000 ppm |
|-------------------------|---|---------|---------|----------|----------|
| 平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日) | 雄 | 11.6 | 97.8 | 494 | 1040 |
| | 雌 | 13.5 | 121 | 594 | 1260 |

各投与群で認められた毒性所見は表 27 に示されている。

非腫瘍性病変について、盲腸では、粘膜、粘膜下織及び粘膜下織細静脈壁の細胞内色素沈着が、800 ppm 以上投与群の雌雄に認められた。この色素については、ヘモジデリン、リポフスチン、胆汁色素等が疑われ特殊染色を試みたが同定できなかった。

腫瘍性病変については、800 ppm 以上投与群の雄において、肝細胞腺腫の発生数が有意に増加した (表 28 参照)。

本試験において、800 ppm 以上投与群の雌雄で、盲腸粘膜、粘膜下織及び粘膜下織細静脈壁細胞内色素沈着の増加等が認められたことから、無毒性量は、雌雄とも 100 ppm (雄 : 11.6 mg/kg 体重/日、雌 : 13.5 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 31)

表 27 マウス 18 カ月間発がん性試験で認められた毒性所見

| 投与群 | 雄 | 雌 |
|----------------|--|--|
| 8000 ppm | <ul style="list-style-type: none"> ・食餌効率低下 ・巣状肝細胞壊死 | <ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 |
| 4000 ppm 以上 | <ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 | <ul style="list-style-type: none"> ・肝絶対及び比重量増加 ・腎皮質尿細管好塩基性化(有意差は 4000 ppm のみ) |
| 800 ppm 以上 | <ul style="list-style-type: none"> ・肝絶対及び比重量増加 ・盲腸粘膜細胞内色素沈着、盲腸粘膜下織及び粘膜下織細静脈壁細胞内色素沈着(有意差は 4000 及び 8000 ppm) ・肝細胞腺腫 | <ul style="list-style-type: none"> ・盲腸粘膜細胞内色素沈着(有意差は 4000 ppm のみ)、盲腸粘膜下織及び粘膜下織細静脈壁細胞内色素沈着(有意差は 4000 及び 8000 ppm) ・腎血管周囲性リンパ球細胞集簇(有意差は 8000 ppm のみ) |
| 100 ppm | <ul style="list-style-type: none"> ・毒性所見なし | <ul style="list-style-type: none"> ・毒性所見なし |

表 28 マウス 18 カ月間発がん性試験で認められた肝細胞腺腫の発生数

| 性別 | | 雄 | | | | |
|-----------|------------|------|------|------|------|------|
| 投与群 (ppm) | | 0 | 100 | 800 | 4000 | 8000 |
| 検査動物数 | | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| 肝細胞腺腫 | 78 週最終と殺動物 | 7 | 11 | 12 | 20↑ | 17 |
| | 死亡動物 | 1 | 1 | 5↑ | 3 | 1 |
| | 全動物 | 8 | 12 | 17↑ | 23↑ | 18↑ |
| | 腫瘍数/匹 | 0.22 | 0.34 | 0.50 | 0.80 | 0.60 |

Fisher 直接確率法、↑↓ : p<0.05、↑↓ : p<0.01

1.2. 生殖発生毒性試験

(1) 2世代繁殖試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 28 匹 (P 世代) または 24 匹 (F₁ 世代)) を用いた混餌 (原体: 0、120、600、3000 及び 15000 ppm: 平均検体摂取量は表 29 参照) 投与による 2 世代繁殖試験が実施された。

表 29 ラット 2 世代繁殖試験における平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)

| 投与群 | | 120 ppm | 600 ppm | 3000 ppm | 15000 ppm |
|-------------------|---|---------|---------|----------|-----------|
| P 世代 | 雄 | 9.8 | 48.5 | 240 | 1200 |
| | 雌 | 10.5 | 53.0 | 261 | 1290 |
| F ₁ 世代 | 雄 | 11.7 | 59.0 | 307 | 1690 |
| | 雌 | 13.0 | 64.6 | 338 | 1810 |

親動物及び児動物における各投与群で認められた毒性所見は、それぞれ表 30 に示されている。

親動物において P 世代では繁殖性に関する検査項目には検体投与の影響は認められなかったが、F₁ 世代の 15000 ppm 投与群において性周期延長、交尾率低下、卵巣萎縮、卵胞数減少、子宮筋層非薄化、子宮扁平上皮化生等が観察され、15000 ppm 投与群の F₁ では妊娠雌が 2 例しか得られず、F₂ 出生児の評価は不可能となった。F₁ 雄の交配実験で繁殖性には異常がみられなかったことから、F₁ 雌に繁殖性の低下の原因があると考えられた。本試験において、3000 ppm 以上投与群の親動物雌雄において体重増加抑制及び摂餌量減少が、児動物において体重増加抑制及び胸腺の絶対及び比重量の低下等が認められたことから、親動物及び児動物雌雄の無毒性量は 600 ppm (P: 雄 48.5 mg/kg 体重/日、雌 53.0mg/kg 体重/日、F₁: 雄 59.0 mg/kg 体重、雌 64.6mg/kg 体重/日) と判断された。(参照 33)

表 30 ラット 2 世代繁殖試験で認められた所見

| 投与群 | 親: P、児: F ₁ | | 親: F ₁ 、児: F ₂ | |
|-----|------------------------|---|--------------------------------------|---|
| | 雄 | 雌 | 雄 | 雌 |
| | | | | |

| | | | | | |
|---------|-------------|------------------------------|--|------------------------------|--|
| 親動物への影響 | 15000 ppm | ・体重増加抑制 | ・卵巢絶対及び比重量低下 | ・腹部膨満 ・副腎比重量増加 | ・腹部膨満 ・育成中体重増加抑制及び摂餌量低下(妊娠中及び授乳中は評価せず) ・性周期延長 ・交尾率低下、受胎率低下、繁殖率低下 ・卵巢絶対及び比重量低下、副腎絶対及び比重量増加、腎絶対及び比重量低下、下垂体絶対及び比重量増加、子宮絶対及び比重量低下 ・卵巢小型化 ・卵巢萎縮、卵胞数減少 ・子宮へモジデリン沈着減少、血管壁フィブリノイド壊死減少、筋層菲薄化、扁平上皮化生 ・下垂体前葉細胞空胞化 |
| | 3000 ppm 以上 | ・摂餌量減少 | ・体重増加抑制 ・摂餌量減少 | ・体重増加抑制 ・摂餌量減少 | ・妊娠中体重増加抑制(3000 ppm 群のみ)(授乳中は体重増加) ・摂餌量減少(妊娠及び授乳中)(3000ppm群のみ) |
| | 600 ppm 以下 | 毒性所見なし | | 毒性所見なし | |
| 児動物への影響 | 15000 ppm | ・腹部膨満 ・性成熟遅延 | ・腹部膨満 ・子宮絶対及び比重量低下 | (十分な産児数が得られなかったため評価不可能) | |
| | 3000 ppm 以上 | ・低体重及び体重増加抑制 ・胸腺絶対及び比重量低下 | ・低体重及び体重増加抑制 ・性成熟遅延 ・胸腺絶対及び比重量低下 | ・低体重及び体重増加抑制 ・胸腺絶対及び比重量低下 | ・低体重及び体重増加抑制 ・胸腺絶対及び比重量低下、子宮絶対及び比重量低下 |
| | 600 ppm 以下 | 毒性所見なし | | 毒性所見なし | |

(2) 発生毒性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌 22 匹) の妊娠 6 ~19 日に強制経口 (原体 : 0、100、300 及び 1000 mg/kg 体重/日、溶媒 : 0.5%MC 水溶液) 投与して発生毒性試験が実施された。

母体ではいずれの群にも死亡は認められず、検体投与に起因する一般状態の変化も認められなかった。体重変化、摂餌量、剖検所見、妊娠子宮重量、黄体数、着床数、

吸収胚／死亡胎児数、生存胎児数、胎児の性比、胎児体重に検体投与の影響は認められなかった。

胎児では、各群に奇形、変異及び骨化遅延が散見されたが、その発生頻度はいずれも低く、対照群と検体投与群との間に差はみられなかった。1000 mg/kg 体重/日投与群の2母体の12胎児に口蓋裂が認められたが、口蓋裂は実施施設においてこの系統のラットで自然発生奇形として観察されており、本試験における発生頻度は実施施設における背景データ(0~3.5%)の上限とほぼ同様であることから、口蓋裂発現は検体投与によるものではないと考えられた。さらに、本試験で口蓋裂を有する胎児の母動物と交配した雄ラットは他の試験においても口蓋裂を有する胎児の親であったことから、本試験における口蓋裂発生には遺伝的要素が関わっている可能性が考えられた。

本試験において、いずれの投与群にも検体投与の影響が認められなかったことから、無毒性量は母動物及び胎児とも1000 mg/kg 体重/日であると考えられた。催奇形性は認められなかった。(参照 34)

(3) 発生毒性試験(ラット・高用量・確認試験)

ラットを用いた発生毒性試験[12. (2)]において、1000 mg/kg 体重/日投与群の胎児に観察された口蓋裂は検体投与によるとは考えられなかったため、Wistar ラット(一群雌20匹)の妊娠6~19日により高用量の本剤を強制経口(原体:0及び1500 mg/kg 体重/日、溶媒:0.5%MC水溶液)投与して催奇形性をさらに検討した。

母体では、いずれの群においても死亡は認められず、検体投与に起因すると考えられる一般状態の変化も認められなかった。1500 mg/kg 体重/日投与群において、投与期間中の摂餌量が減少したが、体重変化、剖検所見、妊娠子宮重量、黄体数、着床数、吸収胚／死亡胎児数、生存胎児数、胎児の性比、胎児重量に検体投与の影響は認められなかった。

胎児については、いずれの群にも奇形は認められなかった。1500 mg/kg 体重/日投与群の内臓及び骨格の変異を有する胎児の発現頻度には対照群との差は認められなかった。骨化進行度では、本剤投与群で中手骨の骨化数の減少が認められたが、この変化は背景データの範囲内であったことから、骨化数減少は検体投与の影響ではないと考えられた。

また、胸骨分節、後頭骨、仙尾椎及びその他の四肢骨における骨化状態には投与による影響は認められなかった。

本試験における無毒性量は、母動物及び胎児とも1500 mg/kg 体重/日であると考えられた。

ラット発生毒性試験[12. (2)]で認められた口蓋裂は本剤投与によるものではないと考えられた。(参照 35)

(4) 発生毒性試験(ウサギ)

NZW ウサギ(一群各雌24匹)の妊娠6~28日に強制経口(原体:0、30、100及び300 mg/kg 体重/日、溶媒:0.5%MC水溶液)投与して発生毒性試験が実施された。

母動物については300 mg/kg 体重/日投与群で体重が低値を示し、妊娠子宮重量を除

いた補正体重は 100 及び 300 mg/kg 体重/日投与群で低値を示した。摂餌量は 100 mg/kg 体重/日投与群では投与期間前半に、300 mg/kg 体重/日投与群では投与期間を通じて低かった。剖検及び着床所見（妊娠子宮重量、黄体数、着床数、吸収胚数、生存胎仔数、胎盤重量）に検体投与の影響は認められなかった。

胎児では、胎児体重、生存胎児数、胎児の性比、奇形を有する胎児の発生頻度に検体投与の影響は認められなかった。

本試験において、100 mg/kg 体重/日投与群の母動物に体重増加抑制及び摂餌量減少が認められ、胎児には検体投与の影響が認められなかったことから、無毒性量は母動物で 30 mg/kg 体重/日、胎児で 300 mg/kg 体重/日であると考えられた。催奇形性は認められなかった。（参照 36）

1.3. 遺伝毒性試験

アミスルブロムの細菌を用いた復帰突然変異試験、マウスリンパ腫由来 L5178Y 細胞を用いた遺伝子突然変異試験、ヒト末梢血リンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験、マウス骨髄細胞を用いた小核試験、ラット肝細胞を用いた小核試験、ラット肝細胞を用いた不定期 DNA 合成試験、マウス肝細胞を用いたコメットアッセイ、ラットの肝、前胃及び腺胃細胞を用いたコメットアッセイが実施された。

試験結果は表 31 に示されている。全ての試験において陰性であったことから、アミスルブロムに遺伝毒性はないものと考えられた。（参照 37～41）

表 31 遺伝毒性試験概要（原体）

| | 試験 | 対象 | 処理濃度・投与量 | 結果 |
|-----------------|-----------------------------------|---|--|----|
| <i>in vitro</i> | 復帰突然変異試験 (参照 37) | <i>S. typhimurium</i> (TA98,TA100, TA1535,TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2uvrA 株) | 5~5000 µg/プレート (+/-S9) | 陰性 |
| | 遺伝子突然変異試験 (参照 38) | マウスリンパ腫由来 L5178Y 細胞 | 2.5~20 µg/mL (-S9) 5~70 µg/mL (+S9) | 陰性 |
| | 染色体異常試験 (参照 39) | ヒト末梢血リンパ球 | 5.04~123 µg/mL (-S9) 73.4~240 µg/mL (+S9) | 陰性 |
| <i>in vivo</i> | 小核試験 (参照 40) | ICR マウス骨髄細胞 | 雄：0, 500, 1000, 2000 mg/kg 体重(単回経口投与) | 陰性 |
| | 小核試験 (参照 54) | Fischer ラット肝細胞 | 雌：0, 500, 2000 mg/kg 体重 (単回経口投与) | 陰性 |
| | 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験 (参照 41) | Fischer ラット肝細胞 | 雄：0, 400, 2000 mg/kg 体重 (単回経口投与) | 陰性 |
| | コメットアッセイ (参照 56) | ICR マウス肝細胞 | 雄：0, 500, 2000 mg/kg 体重 (単回経口投与) | 陰性 |

| | | | |
|---------------------|------------------------|-------------------------------------|----|
| コメントアッセイ (参照 55) | Wistar ラット肝細胞 | 雌：0, 500, 2000 mg/kg 体重 (単回経口投与) | 陰性 |
| コメントアッセイ (参照 57) | Wistar ラット前胃及 び腺胃細胞 | 雌：0, 500, 2000 mg/kg 体重 (単回経口投与) | 陰性 |

注) +/-S9：代謝活性化系存在下及び非存在下

土壌中分解物 D 及び植物固有代謝物 G について、細菌を用いた復帰突然変異試験及びマウス骨髄細胞を用いた小核試験が実施された。結果は表 32 に示されている。全ての試験において陰性であった。(参照 42~45)

表 32 遺伝毒性試験概要 (代謝物)

| 被験物質 | 試験 | 対象 | 投与量 | 結果 |
|-------|---------------------|---|------------------------------------|----|
| 分解物 D | 復帰突然変異試験 (参照 42) | <i>S. typhimurium</i> (TA98,TA100,TA1535, TA1537) <i>E. coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> 株) | 0.064~5000 µg/プレー ト (+/-S9) | 陰性 |
| | 小核試験 (参照 44) | ICR マウス骨髄細胞 | 雄：53.0~210 mg/kg 体重/日 (2 回経口投与) | 陰性 |
| 代謝物 G | 復帰突然変異試験 (参照 43) | <i>S. typhimurium</i> (TA98,TA100,TA1535, TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> 株) | 50~5000 µg/プレー ト (+/-S9) | 陰性 |
| | 小核試験 (参照 45) | ICR マウス骨髄細胞 | 雄：2000 mg/kg 体重 (単回経口投与) | 陰性 |

注) +/-S9：代謝活性化系存在下及び非存在下

1.4. その他の試験

(1) 肝における催腫瘍性に関する検討試験

マウス及びラットを用いた発がん性試験[11. (2)及び(3)]の結果、高用量群の肝臓において催腫瘍性が認められたため、本剤の催腫瘍性に関する作用機序を解明するため、以下の試験を追加実施した。

追加実施した肝小核試験 (ラット) 及びコメントアッセイ (ラット及びマウス) の結果がいずれも陰性であったことから、本剤には遺伝子障害作用のないことが確認された。

i) 中期肝発がん性試験 (ラット)

イニシエーション処理 (N-ニトロソジエチルアミン (DEN) を 2000 mg/kg 体重/日の用量で 1 回腹腔内投与) した Fishcer ラット (1 群雄 20 匹、DEN 無処理群は 10 匹) を用いて、6 週間混餌 (原体：0、200、2000 及び 20000 ppm：平均検体摂

取量は表 33 参照) 投与による肝中期発がん性試験が実施された。

表 33 ラットの中期肝発がん性試験における検体摂取量

| 投与群 (ppm) | 200 | 2000 | 20000 | 20000 |
|-------------------------|------|------|-------|-------|
| イニシエーション処理 | DEN | DEN | DEN | — |
| 平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日) | 12.0 | 120 | 1450 | 1800 |

20000 ppm 投与群及び DEN 無処理 20000 ppm 投与群で投与期間を通じて有意な体重増加抑制が認められた。摂餌量においては、20000 ppm 投与群及び DEN 無処理 20000 ppm 投与群で投与期間の大半で有意差はないものの高値傾向が認められた。2000、20000 及び DEN 無処理 20000 ppm 投与群において、肝絶対重量及び比重量が有意に増加し、検体投与の影響と考えられた。全動物について剖検したが、肉眼的に検体投与に起因する変化は認められなかった。200 ppm 投与群では肝比重量の軽度な増加が認められた。本試験の結果、GST-P 陽性細胞巢の数及び面積は、ともに DEN 処置を施した 2000 ppm 以上の投与群では DEN 単独処置群と比較して有意に増加した。なお、DEN 無処置 20000 ppm 投与群では GST-P 陽性細胞巢の発生は認められなかった。

以上の結果より、本剤は 2000 ppm (120 mg/kg 体重/日) 以上で肝発がんプロモーション作用を有するが、200 ppm (12.0 mg/kg 体重/日) では作用しないことが示された。(参照 46)

ii) 肝薬物代謝酵素誘導試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 5 匹、肝薬物代謝酵素活性測定用には一群雌雄各 4 匹) に 7 日間検体を混餌 (原体 : 0、200 及び 20000 ppm : 平均検体摂取量は表 34 参照) 投与し、肝薬物代謝酵素誘導試験が実施された。なお、陽性対照群として、フェノバルビタール (PB) (50 mg/kg 体重/日) を 7 日間強制経口投与する群を設けた。

表 34 ラット肝薬物代謝酵素誘導試験における平均検体摂取量

| 投与群 | | 200 ppm | 20000 ppm |
|-------------------------|---|---------|-----------|
| 平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日) | 雄 | 21.1 | 1950 |
| | 雌 | 20.6 | 2080 |

20000 ppm 投与群雄では、投与開始 3 及び 7 日に体重増加抑制が認められ、摂餌量も有意に低下した。同群においては、剖検時、雌雄で肝絶対重量及び比重量が有意に増加した。肝薬物代謝酵素活性の測定において、雌雄の 20000 ppm 投与群で、PB 投与により特徴的に強く誘導される PROD 活性の顕著な増加 (13-15 倍) が認められた。また、EROD 活性、MFCOD 活性、T-OH 活性も陽性対照群

と同様に有意に増加した。一方、200 ppm 投与群では全ての測定項目で有意な変化は認められなかった。

以上の結果から、本剤は 20000 ppm (雄: 1950 mg/kg 体重/日、雌: 2080 mg/kg 体重/日) の用量で、雌雄のラットに PB に類似した肝薬物代謝酵素活性誘導能を示したが、200 ppm (雄: 21.1 mg/kg 体重/日、雌: 20.6 mg/kg 体重/日) 投与では誘導は認められなかった。(参照 47)

iii) 肝薬物代謝酵素誘導試験 (マウス)

ICR マウス (一群雌雄各 5 匹、肝薬物代謝酵素活性測定用には一群雌雄各 4 匹) に 7 日間検体を混餌 (原体: 0、100 及び 8000 ppm: 平均検体摂取量は表 35 参照) 投与し、その後、肝臓の薬物代謝酵素活性を測定する肝薬物代謝酵素誘導試験が実施された。なお、陽性対照群として、PB (50 mg/kg 体重/日) を 7 日間強制経口投与する群を設けた。

表 35 マウス肝薬物代謝酵素誘導試験における平均検体摂取量

| 投与群 | | 100 ppm | 8000 ppm |
|-------------------------|---|---------|----------|
| 平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日) | 雄 | 13.4 | 1080 |
| | 雌 | 16.9 | 1310 |

体重変化において、検体投与群では有意な変化は認められなかった。陽性対照群では雌雄とも有意な体重増加抑制が認められた。摂餌量において、8000 ppm 投与群雌雄及び陽性対照群雌で、投与 3 日目に有意な低下が認められた。剖検時の臓器重量測定において、8000 ppm 投与群及び陽性対照群の雌雄の肝比重量が有意に増加した。肝薬物代謝酵素活性測定では、8000 ppm 投与群雌雄においてフェノバルビタール投与で特徴的に強く誘導される PROD 活性の有意な増加 (1.6~1.9 倍) が認められた。また、雌雄で EROD 活性が有意に増加し、有意差はないものの雄で T-OH 活性が増加した。

以上の結果より、本剤は 8000 ppm (雄: 1080 mg/kg 体重/日、雌: 1310 mg/kg 体重/日) の用量で、雌雄マウスにフェノバルビタールに類似した肝薬物代謝酵素活性誘導能を示したが、100 ppm (雄: 13.4 mg/kg 体重/日、雌: 16.9 mg/kg 体重/日) では誘導は認められなかった。(参照 48)

iv) 複製 DNA 合成 (RDS) 試験

Wistar ラット及び ICR マウスを用いて、検体を単回強制経口投与ないし反復投与 (混餌) し、その後、単回投与では投与 24、39 及び 48 時間後、反復投与では 0、3 及び 7 日後に剖検し、肝臓での BrdU 取り込みを指標とした RDS 誘発率を測定した。なお、陽性対照群には、PB (50 mg/kg 体重/日) を経口投与した。

試験結果は表 36 に示されている。(参照 49~51)

表 36 RDS 試験概要

| 投与方法 試験期間 | 供試 動物 | 1群当 り供試数 | 投与量 (mg/kg 体重) | 試験成績 | 結果及び無毒性量 (mg/kg 体重) |
|-----------------------------------|-------------------|-------------|---|---|--|
| 単回投与 (強制 経口) 48 時間 観察 | ラット (参照49) | 雌雄 各 5 | 0, 1000, 2000 | 2000 mg/kg 体重群雄で 肝重量増加 1000 mg/kg 体重以上の 投与群雌雄で RDS 誘発 率増加 | RDS 誘発能あり |
| 反復投与 (混餌 投与) 7 日間 | ラット (参照50) | 雌雄 各 4 | 0, 200, 2000, 10000 ppm ----- 雄 : 14.6, 136, 572 雌 : 16.6, 150, 656 | 10000 ppm 群雄で3日 目に体重増加抑制、 2000 ppm 群雄及び 10000 ppm 群雌雄で3 日に、10000 ppm 群雄 及び2000ppm 群雌は7 日に摂餌量減少、 2000 ppm 以上の群で3 日目に RDS 誘発率増加 | RDS 誘発能あり(3 日をピークとする 一過性の変化) 雄 : 14.6 (200 ppm) 雌 : 16.6 (200 ppm) |
| | マウス (参照51) | 雌雄 各 4 | 0, 100, 8000 ppm ----- 雄 : 15.3, 1020 雌 : 16.6, 1230 | 8000 ppm 群雌雄で 3 日目に摂餌量減 少、8000 ppm 群雄 で RDS 誘発率増加 | RDS 誘発能あり (雄のみ) 雄 : 15.3 (100 ppm) 雌 : 16.6 (100 ppm) |

v) 肝臓での 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) の免疫組織化学染色及び
8-OHdG 測定試験及び活性酸素種測定試験

Wistar ラット (一群雌各 3 匹) に 7 日間検体を混餌 (原体 : 0 及び 10000 ppm) 投与した後、剖検し肝臓を用いて酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の免疫組織化学染色を行い、8-OHdG 陽性率を算出した。マウスについては、7 日間反復経口投与による RDS 試験 (参照 51) のホルマリン固定標本を用いて試験が実施された。陽性対照群には、PB をラットには 500 及び 1500 ppm の濃度で 7 日間混餌投与し、マウスには 50 mg/kg 体重/日を 1 日 1 回、7 日間強制経口投与した。

また、Wistar ラット (一群雌雄各 5 匹) 及び ICR マウス (一群雌雄各 5 匹) に 7 日間検体を混餌 (原体 : 0 及び 10000 (ラット)、8000 (マウス) ppm) 投与した後、剖検し、各動物から摘出した肝臓の DNA を調製し、HPLC/ECD を用いて 8-OHdG を測定した。さらに、これらの動物の肝臓試料を用いて活性酸素種 (ROS) を測定した。

試験結果は表 37 に示されている。

8-OHdG 免疫染色の結果、雌ラットの 7 日間混餌投与において、10000 ppm の用量で 8-OHdG 陽性率に変化は認められず、肝臓に酸化ストレスを誘発しなかった。雌雄マウスの 7 日間混餌投与では、8000 ppm の用量で 8-OHdG 陽性率に増加傾向がみられたが、有意差は認められなかった。また、8-OHdG を HPLC/ECD を用い

て測定した結果、ラット及びマウスにおいても 8-OHdG 量に有意な増加は認められなかった。同じ動物の肝臓を用いて ROS を測定した結果、雌ラットでは有意な増加認められなかったが、雄ラット及び雄マウスでは有意な増加が認められた。

表 37 肝臓での酸化ストレス解析試験概要

| 投与方法 試験期間 | 供試動物 | 1 群当たり 供試数 | 投与量 (mg/kg 体重) | 試験成績 |
|----------------------|----------------|---------------|---|---|
| 反復投与 (混餌) 7 日間 | ラット (参照 52) | 雌 3 | 0, 10000 ppm ----- 雌 : 1010 | 10000 ppm 群で 3 日に摂餌量減少。 10000 ppm 群雌で 8-OHdG 陽性率変化なし。(免疫染色法) |
| | マウス (参照 53) | 雌雄各 4 | 0, 8000 ppm ----- 雄 : 1020 雌 : 1230 | 8000 ppm 群雌雄で 8-OHdG 陽性率変化なし。(免疫染色法) |
| | ラット (参照 70) | 雌雄各 5 | 0, 10000 ppm ----- 雄 : 1240 雌 : 1050 | 8-OHdG 誘発なし。 (HPLC/ECD 法) |
| | マウス (参照 71) | 雌雄各 5 | 0, 10000 ppm ----- 雄 : 1423 雌 : 1570 | 8-OHdG 誘発なし。 (HPLC/ECD 法) |
| | ラット (参照 72) | 雌雄各 5 | 0, 10000 ppm ----- 雄 : 1240 雌 : 1050 | 雄で ROS 産生増加。 |
| | マウス (参照 73) | 雄 5 | 0, 8000 ppm ----- 雄 : 1420 | ROS 産生増加。 |

vi) 肝小核試験 (ラット)

Fischer ラット (一群雌 4 匹) を用いて、検体を単回経口 (原体 : 500 及び 2000 mg/kg 体重) 投与し、肝臓をコラゲナーゼ還流法により採取し、肝細胞を AO-DAPI (アクリジン (AO) 溶液と 4,6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) 溶液の混合液) 染色液にて染色し、蛍光顕微鏡下で小核を有する肝細胞を計数する、小核試験が実施された。

その結果、いずれの処理群においても、溶媒対照群と比べ、小核を有する肝細胞の出現頻度に有意な増加は認められなかった。2000 mg/kg 体重投与群では、3 日目に分裂頻度が溶媒対照群に比べ有意に減少したが、5 日目には完全に回復した。

本試験において、肝細胞の分裂頻度に有意な減少が認められたことから、肝細胞は十分に暴露されており、このような条件下で小核を有する肝細胞の出現頻度がい

ずれの処理群においても有意に増加しなかったことから、本剤は *in vivo* 染色体異常誘発性を有しないものと判断された。(参照 54)

vii) コメットアッセイ

Wistar ラット及び ICR マウスに検体を単回強制経口投与又は 1 週間混餌投与した後、肝細胞を採取し、コメット標本を作製し、画像解析装置を用いてテールモーメントを計測するコメットアッセイが実施された。試験成績は表 38 に示されている。

本試験の結果、本剤はラット及びマウスの肝臓において DNA 損傷性を有しないものと判断された。(参照 55 及び 56、74 及び 75)

表 38 コメットアッセイの試験概要

| 採取部位 | 供試動物 | 1群当たり供試数 | 投与方法 | 投与量 (mg/kg 体重) | 試験成績 | 結果 |
|------|------------|----------|----------|----------------|------------------|----|
| 肝臓 | ラット (参照55) | 雌 4 | 単回強制経口 | 0, 500, 2000 | テールモーメントの有意な増加なし | 陰性 |
| | マウス (参照56) | 雄 4 | 単回強制経口 | 0, 500, 2000 | テールモーメントの有意な増加なし | 陰性 |
| | ラット (参照74) | 雌雄各 5 | 混餌 (1週間) | 0, 20000 ppm | テールモーメントの有意な増加なし | 陰性 |
| | マウス (参照75) | 雄 5 | 混餌 (1週間) | 0, 8000 ppm | テールモーメントの有意な増加なし | 陰性 |

以上の結果より、本剤の肝臓に認められた催腫瘍性は、本剤の遺伝子障害性に起因するものでなく、プロモーション作用によるものであり、ROS による酸化ストレス及び細胞増殖活性の亢進が関与している可能性が示唆された。よって、本剤は非遺伝毒性発がん物質に分類され、催腫瘍性には閾値が設定できるものと考えられた (肝腫瘍に関する無毒性量：ラット 2000 ppm；雄 96.0 mg/kg 体重/日、雌 129.2 mg/kg 体重/日、マウス 100 ppm；雄 11.6 mg/kg 体重/日)。

(2) 胃における催腫瘍性に関する検討試験

ラット前胃において認められた催腫瘍性の作用機序解明のため、コメットアッセイを追加実施した。

追加実施したコメットアッセイで陰性であり、その他の変異原性試験においても陰性であったことから、本剤には遺伝子障害作用のないことが確認された。

ラットにおける 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験[11. (2)]において、前胃腫瘍は雌の 10000 及び 20000 ppm 投与群でのみ認められ、これらの群では前胃粘膜の炎症、