

無毒性量は 5 mg/kg 体重/日と考えられた。しかし、いくつかの検査項目のデータ及び一般状態の情報の欠如のため、本試験の信頼性は低いと考えられた。(参照 3)

(5) 3 週間亜急性毒性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 10 匹) を用いた吸入 [原体 (エアロゾール) : 0.1、0.4 及び 1.6% (0、20、80 及び 320 mg/m³ 相当)、6 時間暴露/日] 暴露による 3 週間亜急性吸入毒性試験が実施された。吸入暴露した空気中の検体の実濃度は 0、6、23 及び 96 mg/m³ であった。対照群として、空気のみ、陰性対照群及び 20 mL の溶媒を暴露する溶媒対照群を設定した。

96 mg/m³ 暴露群において、筋肉の震えが暴露 5 及び 6 日後から試験終了時まで認められた。同群において、雄の体重値が減少し、陰性対照群に比して有意に低い値で推移した。雌の体重値も減少し、暴露 3 週時には溶媒対照群に比して有意差が認められた。23 mg/m³ 以上暴露群の雄及び 96 mg/m³ 暴露群の雌で脳 ChE 活性阻害 (20%以上) が認められた。赤血球 ChE 活性阻害 (20%以上) は認められなかった。

本試験において、23 mg/m³ 以上暴露群の雄及び 96 mg/m³ 暴露群の雌で脳 ChE 活性阻害 (20%以上) が認められたので、無毒性量は雄で 6 mg/m³、雌で 23 mg/m³ であると考えられた。(参照 3、6)

(6) 14 日間亜急性経皮毒性試験 (ウサギ) <参考データ>

チンチラウサギ (一群雌雄各 5 匹) を用いた経皮 (原体: 0 及び 500 mg/kg 体重/日) 投与による 14 日間亜急性経皮毒性試験が実施された。

なお、本試験においては ChE 活性は測定されていない。

本試験において、検体投与の影響は認められなかったため、雌雄とも無毒性量は本試験の最高用量 500 mg/kg 体重/日であると考えられた。しかし、病理組織学的検査が実施されていないので、本試験の信頼性は低いと考えられた。(参照 3、6)

(7) 21 日間亜急性経皮毒性試験 (ウサギ) ①

NZW ウサギ (一群雌雄各 5 匹) を用いた経皮 (原体: 0、60、150 及び 375 mg/kg 体重/日、6 時間暴露/日、溶媒: 生理食塩水) 投与による 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 3 に示されている。

赤血球及び脳 ChE 活性測定の結果、検体投与の影響は認められなかった。

本試験において、375 mg/kg 体重/日投与群の雄及び 150 mg/kg 体重/日以上投与群の雌で体重増加抑制及び摂餌量減少が認められたので、無毒性量は雄で 150 mg/kg 体重/日、雌で 60 mg/kg 体重/日と考えられた。(参照 3)

表 3 21 日間亜急性経皮毒性試験 (ウサギ) で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
375 mg/kg 体重/日	・体重増加抑制 ・摂餌量減少	
150 mg/kg 体重/日 以上	150 mg/kg 体重/日以下 毒性所見なし	・体重増加抑制 ・摂餌量減少
60 mg/kg 体重/日		毒性所見なし

(8) 21 日間亜急性経皮毒性試験 (ウサギ) ② <参考データ>

NZW ウサギ (一群雌雄各 5 匹) を用いた経皮 (原体: 0 及び 500 mg/kg 体重/日、6 時間暴露/日、溶媒: 生理食塩水) 投与による 21 日間亜急性経皮毒性試験が実施された。

500 mg/kg 体重/日投与群の雌雄において、体重増加抑制、摂餌量減少、血清中カルシウム及びリン濃度減少が認められた。赤血球及び脳 ChE 活性測定の結果、検体投与の影響は認められなかった。

本試験は、21 日間亜急性経皮毒性試験① [10. (7)] の追加試験として実施されたが、目的は不明瞭であった。(参照 3)

(9) 4 週間亜急性毒性試験 (ラット) ② (原体及び代謝物 D)

SD ラット (一群雌 15 匹) を用いた強制経口 (原体または代謝物 D: 0、0.5 及び 2.0 mg/kg 体重/日、5 日/週、溶媒: Carbowax) 投与による 4 週間亜急性毒性試験が実施された。

代謝物 D の 2.0 mg/kg 体重/日投与群において、投与開始後初めの 5 日間は散在性の振戦が認められたが、5 日以後は認められなかった。

メチオカルブの 2.0 mg/kg 体重/日投与群では、赤血球 ChE 活性阻害 (20%以上) は投与第 1 週時のみに認められた。0.5 mg/kg 体重/日投与群では、赤血球 ChE 阻害は認められなかった。

代謝物 D の 0.5 mg/kg 体重/日以上投与群で、投与 30 分後の赤血球 ChE 活性阻害 (20%以上) が認められた (投与 1、3 及び 4 週時)。投与 4 時間後の赤血球 ChE 活性阻害 (20%以上) は、2.0 mg/kg 体重/日投与群で、投与第 1 及び 2 週時、0.5 mg/kg 体重/日投与群で投与 2 及び 4 週時に認められた。

脳 ChE 活性については測定されていない。

本試験において、メチオカルブの 2.0 mg/kg 体重/日投与群及び代謝物 D の 0.5 mg/kg 体重/日以上投与群において、赤血球 ChE 活性阻害が認められたので、無毒性量はメチオカルブ投与群で 0.5 mg/kg 体重/日、代謝物 D 投与群で 0.5 mg/kg 体重/日未満であると考えられた。(参照 3)

1.1. 慢性毒性試験及び発がん性試験

(1) 6カ月間慢性毒性試験(ラット) <参考データ>

ラット (FB30系、一群雌雄各4匹) を用いた混餌 (原体: 0、3、10及び30 mg/kg 体重/日) 投与による6カ月間 (24週間) 慢性毒性試験が実施された。

30 mg/kg 体重/日投与群の雌雄において、RBCの増加、WBCのわずかな変化、AST及びALTの増加が投与10週後に認められたが、投与24週後の検査では認められず、これらの変化は毒性影響とは考えられなかった。

データが限られ、統計処理も実施されていないので、データの信頼性は低い、他の長期毒性試験のデータの参考になると考えられた。(参照3)

(2) 2年間慢性毒性試験(イヌ) <参考データ>

ビーグル犬 (一群雌雄各2匹) を用いた混餌 (原体: 0、50、100及び250 ppm) 投与による2年間慢性毒性試験が実施された。

250 ppm 投与群において、雌雄で体重増加抑制、肝絶対及び比重量増加 (雌雄不明) が認められた。

本試験においては、一般状態観察データが不足し、データが限られていること及び一群の供試動物数が少ないことから、無毒性量設定根拠資料としては不適切であると考えられた。(参照3)

(3) 2年間慢性毒性試験(イヌ)

ビーグル犬 (一群雌雄各4匹) を用いた混餌 (原体: 0、15/5、60及び240 ppm) 投与による2年間慢性毒性試験が実施された。15 ppm 投与群においては、投与15日後までは15 ppm 添加飼料を与えたが、血漿 ChE 活性阻害が認められたので、投与3週後からは5 ppm 添加飼料を与えた。

赤血球及び脳 ChE 測定の結果、検体投与の影響は認められなかった。

240 ppm 投与群の雌雄及び60 ppm 投与群の雌において、摂餌量の減少が認められたが、体重増加量に影響は認められなかったため、検体投与の影響ではないと考えられた。

本試験において、240 ppm 投与群の雌雄で軽度の後肢麻痺、振戦、片方または両後肢の麻痺、注意力低下及び嘔吐が認められたので、無毒性量は雌雄とも60 ppm (雌雄: 2.4 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照3、6)

(4) 80週間慢性毒性/発がん性併合試験(ラット) <参考データ>

SD ラット (一群雌雄各24匹) を用いた混餌 (原体: 0、25、50及び100 ppm) 投与による80週間慢性毒性/発がん性併合試験が実施された。

100 ppm 投与群の雌において血漿及び顎下腺 ChE 活性阻害 (20%以上) が認められた。

剖検時、対照群の雌以外の試験群において、肺の肝変化及び化膿性肺炎が、水腫及び膿瘍の形成を伴って認められ、病理組織学的に気管支肺炎と判断された。これらは、このラットコロニーに固有のウィルス性肺炎の結果生じた病変であると考えられた。また、100 ppm 投与群の雌以外の対照群及び投与群のほとんどの動物に、間質性腎炎と蛋白円柱が観察された。これらの変化も検体投与の影響とは考えられなかった。

赤血球及び脳 ChE 活性測定の結果、検体投与の影響は認められなかった。

本試験において、100 ppm 投与群の雌で顎下腺 ChE 活性阻害 (20%以上) が認められたので、無毒性量は雌雄とも50 ppm (約5 mg/kg 体重/日) であると考えられた。しかし、本試験については、統計学的比較を実施していないこと、雄の ChE 活性阻害に関連するデータが限られていること、死亡率が高く、試験期間中、呼吸器系及び腎臓の感染症のため、ほとんどの動物が疲弊していると考えられることから、本試験の信頼性は低いと考えられた。(参照3)

(5) 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60匹) を用いた混餌 (原体: 0、67、200及び600 ppm) 投与による2年間慢性毒性/発がん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4に示されている。

200 ppm 以上投与群の雌雄において、赤血球 ChE 活性阻害が認められたが、いずれの検査値も20%未満であった。脳 ChE 活性については、検体投与の影響は認められなかった。

本試験において、200 ppm 以上投与群の雌雄で赤血球数減少及び網状赤血球数増加等が認められたので、無毒性量は雌雄とも67 ppm (雄: 3.27 mg/kg 体重/日、雌: 4.98 mg/kg 体重/日) であると考えられた。発がん性は認められなかった。(参照3)

表4 2年間慢性毒性/発がん性併合試験(ラット)で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
600 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・摂餌量減少 ・GDH 減少 ・脾絶対及び比重量減少 ・精巢比重量増加 	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・T.Bil 減少 ・血清尿素増加 ・脾絶対及び比重量減少
200 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・RBC 減少、網状赤血球数増加 ・T.Bil 減少 	<ul style="list-style-type: none"> ・RBC 減少、網状赤血球数増加
67 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

1 体重比重量を比重量という (以下同じ)。

(6) 2年間発がん性試験 (マウス)

BOR:CFW1 マウス (一群雌雄各 50 匹) を用いた混餌 (原体: 0、67、200 及び 600 ppm) 投与による 2 年間発がん性試験が実施された。

本試験において、試験終了時の雄の死亡率は、用量依存性はないものの、200 及び 67 ppm 投与群で対照群に比して有意に高かった。また、雌においては対照群の死亡率が最も高く、試験終了時には 16% の動物しか生存していなかった。

200 ppm 以上投与群の雌雄で ALT の増加、67 ppm 以上投与群の雌で WBC の増加が認められた。

脳 ChE 活性測定の結果、検体投与の影響は認められなかった。赤血球 ChE 活性は測定されていない。

本試験における無毒性量は、雄で 67 ppm (14.6 mg/kg 体重/日)、雌で 67 ppm (19.8 mg/kg 体重/日) 未満であると考えられた。発がん性は認められなかった。(参照 3)

1 2. 生殖発生毒性試験

(1) 3 世代繁殖試験 (ラット)

FB 30 ラット (一群雄 10 匹、雌 20 匹) を用いた混餌 (原体: 0、30、100 及び 300 ppm) 投与による 3 世代繁殖試験が実施された。

300 ppm 投与群の P 世代及び F₁ 世代で、妊娠率の低下及び産児数の減少、F₁ 世代で哺育 4 週間の哺育児生存率の低下がみられたが、統計学的有意差はなく、生物学的に意義のある変化とは考えられなかった。

本試験において、300 ppm 投与群で親動物及び児動物のいずれにも毒性所見が認められなかったため、無毒性量は親動物及び児動物で、本試験の最高用量 300 ppm (30 mg/kg 体重/日) であると考えられた。繁殖能に対する影響は認められなかった。(参照 3、6)

(2) 発生毒性試験 (ラット)

FB 30 ラット (一群雌 19~20 匹) の妊娠 6~15 日に強制経口 (原体: 0、1、3 及び 10 mg/kg 体重/日、溶媒: 1%トラガカント懸濁液) 投与して、発生毒性試験が実施された。

本試験において、10 mg/kg 体重/日投与群の母動物に体重増加抑制が認められ、胎児に毒性所見は認められなかったため、無毒性量は母動物で 3 mg/kg 体重/日、胎児で本試験の最高用量 10 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 3、6)

(3) 発生毒性試験 (ウサギ) ①<参考データ>

NZW ウサギ (一群雌 17~19 匹) の妊娠 6~18 日に強制経口 (原体: 0、1、

3 及び 10 mg/kg 体重/日、溶媒: 0.5%CMC 及び 0.5%Tween 80 を含む蒸留水) 投与して、発生毒性試験が実施された。

10 mg/kg 体重/日投与群の母動物に、体重増加抑制及び投与後のコリン作動性作用 (呼吸数増加、振戦、流涎/咀嚼行動、縮瞳、落ち着きのなさ、緊張、虚脱) が、同群の胎児に肝臓の退色斑 (9.2%) が認められた。この退色斑の生物学的意義については明らかでないが、発生頻度は対照群の 3.5 倍、背景対照データの 17 倍であった。組織学的検査は実施されていないが、肝障害に伴う変化である可能性も考えられた。胎児の肝葉数及び肝葉の癒着に関するデータは示されていない。

試験期間中切迫と殺または死亡した動物 16 匹 (0、1、3 及び 10 mg/kg 体重/日投与群で、それぞれ 6、4、3 及び 3 匹) のうち、8 匹において、剖検時呼吸器系の感染症、胃腸障害または気管内誤投与が認められた。しかし、検体投与の影響は認められず、繁殖能に関する検査項目においても群間に有意差は認められなかった。

本試験において、10 mg/kg 体重/日投与群の母動物に体重増加抑制等が、胎児に肝臓の退色斑が認められたため、無毒性量は母動物及び胎児で 3 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 3)

(4) 発生毒性試験 (ウサギ) ②

チンチラウサギ (一群雌 17~19 匹) の妊娠 6~18 日に経皮 (原体: 0、10、50 及び 250 mg/kg 体重/日、6 時間暴露/日、溶媒: 1%クレモホア水溶液) 投与して、発生毒性試験が実施された。

250 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た。胎児では、250 mg/kg 体重/日投与群で低体重が、50 mg/kg 体重/日以上投与群で後肢趾節骨の骨化遅延が認められた。

本試験において、250 mg/kg 体重/日投与群の母動物で体重増加抑制等が、50 mg/kg 体重/日以上投与群の胎児で骨化遅延が認められたため、無毒性量は母動物で 50 mg/kg 体重/日、胎児で 10 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 3)

1 3. 遺伝毒性試験

メチオカルブ (原体) の細菌を用いた DNA 修復試験、復帰突然変異試験、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞を用いた染色体異常試験、遺伝子突然変異試験、姉妹染色分体交換試験、ラット肝細胞を用いた不定期 DNA 合成 (UDS) 試験、マウスを用いた小核試験及び優性致死試験が実施された。

試験結果は表 5 に示されているとおり、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞を用いた染色体異常試験以外は陰性であった。チャイニーズハムスター卵巣由来培養細胞を用いた染色体異常試験は陽性であったが、同一の指標を

充分高用量まで試験した小核試験において陰性であるため、メチオカルブに生体にとって問題となる遺伝毒性はないと考えられた。(参照 3、6)

表 5 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> DNA 修復試験	<i>Escherichia coli</i> (W3110, K12p, 3478 株)	625~5,000 µg/7 ⁺ レト (-/+S9)	陰性
復帰突然変異試験	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株)	4~2,500 µg/7 ⁺ レト (-/+S9)	陰性
復帰突然変異試験	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株)	20~12,500 µg/7 ⁺ レト (-/+S9)	陰性
染色体異常試験	チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO-WBL)	9.94~100 µg/mL (+S9) 98.4~508 µg/mL (+S9) 4.92~50.8 µg/mL (-S9)	陽性
遺伝子突然変異試験 (HGPRT 前進突然変異試験)	チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO-K1-BH ₄)	2.5~60 µg/mL (+S9) 1.25~30 µg/mL (-S9)	陰性
姉妹染色分体交換試験	チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO)	4.0~40.0 µg/mL (+S9) 2.0~20.0 µg/mL (-S9)	陰性
UDS 試験	ラット初代培養肝細胞 (SD ラット、雌雄)	0.1~100 µg/mL	陰性
<i>in vivo</i> 小核試験	NMR1 マウス (骨髄細胞) (一群雌雄各 4 または 5 匹)	5、10、20 mg/kg 体重 (2 回経口投与)	陰性
優性致死試験	NMR1 マウス (一群雌雄各 50 匹)	6 mg/kg 体重 (単回経口投与)	陰性

注) +/-S9 : 代謝活性化系非存在下及び存在下

1.4. その他の試験

(1) 30 日間神経毒性試験 (脱髄形成の検討) (ニワトリ)

ニワトリ [系統不明、一群雌 8 羽 (4 羽は投与 30 日後 (試験終了日) に剖検し、4 羽は投与終了後 30 日間の回復期間後剖検。)] を用いた混餌 (原体 : 0、200、400 及び 800 ppm) 投与による 30 日間神経毒性試験が実施され、検体投与により脱髄が生じるか病理組織学的に検討された。

いずれの投与群の動物においても、ミエリンの変性及び ChE 活性阻害による症状も認められなかった。

本試験において、メチオカルブの 800 ppm の 30 日間の混餌投与において、神経に毒性変化は生じないと考えられた。(参照 3)

(2) 免疫毒性試験 (*in vitro*)

マウス T 細胞 (CTLL2、IL2 依存性増殖を示す) を用いて、メチオカルブ

投与による増殖活性阻害を検討する試験が実施された。

CTLL2 細胞を、ヒトリーコンビナント IL2 及びメチオカルブ (原体 : 0、0.5、5.0 及び 50 µM、: 溶媒 0.2M アセトン) の存在下で 16 時間培養し、³H-チミジンの取り込みを指標として、CTLL2 細胞の増殖活性が検討された。

その結果、メチオカルブ 50 µM で 80% の増殖活性阻害が認められた (代謝活性化系非存在下)。他の濃度では増殖活性阻害は認められなかった。(参照 3)

(3) 皮膚刺激性試験 (ヒト)

メチオカルブのヒトに対する皮膚刺激性試験が実施された。

メチオカルブ (原体、用量不明) を含んだ脱脂綿 (乾燥したまま、または油または水で湿らせた状態) が 8 人 (年齢、性別不明) の前腕部に 8 または 24 時間貼付された。

その結果、貼付 8 時間後では、投与部位に刺激による症状が数人に認められた。貼付 24 時間後では、すべてのヒトの投与部位に炎症及び腫脹が認められた。これらの結果から、メチオカルブはヒトの皮膚に対して刺激性を示した。しかし、情報が限られており、刺激の程度または溶媒 (油) の皮膚反応に対する影響について言及できず、本試験の信頼性は低いと考えられた。

(参照 3)