

1,000 mg/kg 体重/日投与群では、全ての動物が多臓器障害を伴い投与開始3日後までに死亡した。2例の死因は、前胃部の壊死及び潰瘍と考えられた。

250 mg/kg 体重/日以上投与群では、流涎、被毛湿潤及び褐色尿の発生率が増加した。

体重については、500 mg/kg 体重/日投与群の雄で投与開始初期に50%の増加抑制がみられた。

RBC、Ht及びHbは、250 mg/kg 体重/日投与群の雌及び500 mg/kg 体重/日投与群の雌雄で約10%減少した。

血液生化学的検査では、雌雄ともに変化(TP、T.Bil、Chol、P、K、Ca及び $\gamma$ -GTPの増加並びにGluの減少)がみられ、250及び500 mg/kg 体重/日投与群の雄でその頻度が高かった。

250 mg/kg 体重/日以上投与群の雌雄で、肝臓の絶対及び相対重量の増加(>40%)がみられた。腎臓の相対重量は、用量相関的に増加(<10%)した。1,000 mg/kg 体重/日以下の投与群では、肉眼的病変は認められなかった。

病理組織学的検査では、50及び250 mg/kg 体重/日投与群の雄並びに500 mg/kg 体重/日投与群の雌雄で、腎臓病変(間質細胞浸潤、尿細管上皮の再生及び尿細管拡張)が認められた。500 mg/kg 体重/日投与群では、肺の出血及び水腫並びに肝細胞肥大の発生頻度が上昇した。(参照5)

、本試験におけるNOAELは設定されなかった。

## (2) 13週間亜急性毒性試験(ラット、強制経口投与)

ラット(SD系、6週齢、雌雄各10匹/群)にエトキシキン(純度:97.6%、溶媒:コーンオイル)を13週間強制経口投与(0、20、40、200又は400 mg/kg 体重/日)し、亜急性毒性試験が実施された。200 mg/kg 体重/日投与群では、67日目にわずかな過剰投与(2~14%)があったが、本試験の結果を損なうものではないと判断された。投与前と投与12週間後に眼検査を実施した。全動物について全身の剖検を行い、肺、肝臓、腎臓及び肉眼的病変について病理組織学的検査を行った。対照群及び最高用量投与群については30以上の組織について検査を行った。

試験期間中に死亡例は認められなかった。

一般状態では、種々の組織部位(特に会陰部)の着色、流涎及び褐色尿が200及び400 mg/kg 体重/日投与群の雌雄でみられ、雌で頻度が高かった。

眼検査では、投与による影響は認められなかった。

体重増加量については、200及び400 mg/kg 体重/日投与群の雄で明らかな減少がみられ、40 mg/kg 体重/日投与群では、減少は軽度(10%)であった。摂餌量は、投与群と対照群でほぼ同じであった。

血液学的及び血液生化学的検査では、400 mg/kg 体重/日投与群の雌雄で変化(RET、T.Bil、BUN、 $\gamma$ -GTP、Chol及びTSHの増加並びにRBC、WBC、プロトロンビン時間(PT)及びGluの減少)がみられ、そのうちの多くは200 mg/kg 体重/日投与群でも有意差がみられた。

尿については、200及び400 mg/kg 体重/日投与群で濃く着色し、400 mg/kg 体重/日投与群では尿量が増加した。比重の変化は認められなかった。

剖検での主な所見は、200 及び 400 mg/kg 体重/日投与群の雌雄における甲状腺の赤色化であった。肝臓の絶対及び相対重量は、用量相関的に 15～70%まで増加し、腎臓については、200 及び 400 mg/kg 体重/日投与群の雌雄で 4～20%まで増加した。脳及び精巣の相対重量の変化は、体重減少に伴う二次的なものと考えられた。

病理組織学的検査により、雌雄ともに腎臓が主要な標的臓器であることが明らかにされた。200 及び 400 mg/kg 体重/日投与群の雄では、尿細管の石灰化、腎乳頭壊死及び細胞質空胞化の発生頻度が増加し、200 及び 400 mg/kg 体重/日投与群の雌では石灰化、腎乳頭壊死及び腎症の頻度が増加した。腎症の頻度は、200 mg/kg 体重/日投与群の雌においても増加した。

また、200 及び 400 mg/kg 体重/日投与群の雄では、副腎の細胞質内空胞化、精巣上体の化膿性炎症、前立腺の非化膿性炎症、肺の石灰化及び肺胞の組織球症の発生頻度が上昇し、同投与群の雌では、食道炎及び胸腺の上皮性細胞過形成の頻度が増加した。（参照 5）

20 及び 40 mg/kg 体重/日投与群では、肉眼的病変、肝臓、肺及び腎臓のみを検査していることに注意すべきであるが、40 mg/kg 体重/日投与群の雄において体重増加抑制がみられたことから、本試験における NOAEL は 20 mg/kg 体重/日と考えられた。

### (3) 13 週間亜急性毒性試験（ラット、混餌投与）

ラット（SD 系、5 週齢、雌雄各 10 匹/群）を用いたエトキシキンの 13 週間混餌投与（0、2,000、3,500、6,000 又は 10,000 ppm）試験が実施された。

試験期間中に死亡例は認められなかった。

投与開始 2 週間後から 6,000 ppm（2 例）及び 10,000 ppm 投与群（5 例）で腹部の脱毛がみられた。投与開始 9 週間後あたりから 10,000 ppm 投与群では雌雄ともに尿の色調が暗褐色化した。

体重は、2,000 ppm 投与群の雄では投与開始 2 週間後から、雌では投与開始 1 週間後から、対照群に比べて有意な減少がみられた。3,500 ppm 以上投与群では雌雄ともに投与開始 1 週間後から減少し、10,000 ppm 投与群では顕著な減少であった。

摂餌量は、投与濃度が高くなるに従い減少した。飲水量も、同様の減少傾向を示した。

血液学的検査では、2,000 ppm 以上投与群の雌及び 10,000 ppm 投与群の雄で、Ht、Hb 及び RBC の減少が認められた。また、2,000、3,500 及び 6,000 ppm 投与群の雌で WBC の減少がみられたが、雄では認められなかった。

血液生化学的検査では、全投与群の雌雄ともに LDH 及び AST が減少し、Chol が増加した。また、高用量群では、BUN の増加並びに Alb 及び TP の減少が認められた。

尿検査では、10,000 ppm 投与群のほとんどの検体で、色調の暗褐色化がみられ、6,000 ppm 以下の投与群よりもウロビリノーゲン及びタンパク質の反応が強かった。

剖検では、6,000 及び 10,000 ppm 投与群のほぼ全例で甲状腺の黒赤色化がみられた。

臓器重量では、全投与群の雌雄で肝臓及び腎臓の相対重量の増加が顕著であった。

病理組織学的検査では、甲状腺におけるろ胞上皮過形成（コロイド減少）（2,000～10,000 ppm 投与群の雄：4～10 例、雌：3～10 例）、肝細胞の肥大（6,000～10,000 ppm 投与群の雄：3～10 例、雌：7～10 例）及び脂肪変性（10,000 ppm 投与群の雄：8 例、雌：7 例）、骨髄の低形成（6,000～10,000 ppm 投与群の雄：3 例、雌：3～7 例）、脾臓のうっ血（6,000

～10,000 ppm 投与群の雄：3～6 例、2,000～10,000 ppm 投与群の雌：9～10 例) 及びヘモジデリン沈着 (6,000 ppm 投与群の雄：3 例、2,000～10,000 ppm 投与群の雌：5～9 例)、腎臓の尿細管拡張 (6,000～10,000 ppm 投与群の雄：4～5 例、雌：2～3 例) 等が認められた。(参照 6、9)

最小用量の 2,000 ppm 投与群で体重増加の抑制などの毒性徴候がみられたため、本試験における NOAEL は設定できなかった。

#### (4) 26 週間亜急性毒性試験 (ラット、混餌投与)

ラット (SD 系、5 週齢、雌雄各 15 匹/群) を用いたエトキシキンの 26 週間混餌投与 (150、300、600 又は 1,200 ppm) 試験が実施された。

試験期間中に死亡例はなく、投与によると考えられる一般状態への影響は認められなかった。

体重、飼料摂取量及び飼料効率については、投与に起因する影響は認められなかった。

血液学的検査では、全投与群の雌及び 300 ppm 以上投与群の雄で WBC の減少、全投与群の雌で PLT の減少並びに 1,200 ppm 投与群の雄で Ht 及び Hb の減少がみられたが、いずれも軽度で正常範囲の変動であった。

血液生化学的検査では、300 ppm 以上投与群の雄で LDH、AST 及び BUN の減少、雌で A/G 比の低下及び TP の増加並びに 300 及び 600 ppm 投与で LDH の増加がみられたが、いずれも軽度で正常範囲の変動であった。

尿検査では、投与に起因する影響は認められなかった。

臓器の絶対重量では、600 及び 1,200 ppm 投与群の雄の腎臓並びに 1,200 ppm 投与群の雌雄の肝臓で軽度の増加が認められ、相対重量についても同様の傾向であった。

剖検及び病理組織学的検査では、投与に起因する影響は認められなかった。(参照 6、9)

600 ppm 投与群の雄で腎臓重量 (絶対及び相対重量) の増加がみられたことから、本試験における NOAEL は、混餌濃度 300 ppm (18.175 mg/kg 体重/日相当、1,200 ppm : 雄 72.7 mg/kg 体重/日相当から計算) と考えられた。

#### (5) 28 日間亜急性毒性試験 (イヌ、経口投与) (参考データ)

イヌ (ビーグル種、雌雄各 1 匹/群) に、エトキシキン (純度 97.6%) を経口投与 (0、25、50、100 又は 200 mg/kg 体重/日、カプセル) し、28 日間亜急性毒性試験が実施された。

100 及び 200 mg/kg 体重/日投与群の全例は、それぞれ投与 17 日後及び 7 日後までに死亡又は剖検された。50 mg/kg 体重/日投与群の雌 (1 例) は 21 日目に剖検された。

試験開始時の動物数及び死亡例が少ないため、主要な一貫性のある変化のみ以下に記載する。

死亡又は生存したイヌの一般状態は、活動性の低下、排便の減少、褐色尿、歯茎の蒼白等であった。

体重増加抑制及び摂餌量の減少は、全投与群でみられた。

肝機能障害を示す酵素の血清中活性は、測定した全ての群（25 及び 50 mg/kg 体重/日）で投与 4 週間後に増加した。また、活性化部分トロンボプラスチン時間<sup>4</sup>（Activated partial thromboplastin time (APTT)）の短縮もみられた。

肝臓及び腎臓の相対重量は、25 及び 50 mg/kg 体重/日投与群で増加した。

剖検では、消化管の赤色調及び肝臓の暗調化が共通して認められた。

病理組織学的検査では、全投与群の動物で肝臓に色素沈着がみられたが、対照群には認められなかった。（参照 5）

例数が少ないため、適切な毒性評価ができないことから NOAEL は設定できなかった。

#### （6）90 日間亜急性毒性試験（イヌ、経口投与）

イヌ（ビーグル種、雌雄各 5 匹/群）を用いた、エトキシキン（純度 97.6%）の 90 日間経口投与（0、2、4、20 又は 40 mg/kg 体重/日、カプセル）試験が実施された。

40 mg/kg 体重/日投与群では、試験当初の 7 週間に明瞭な毒性徴候（体重の減少、体表面の着色、褐色尿、眼球強膜の褐色化、暗色粘性便及び嘔吐）がみられ、この群には試験最後の 6 週間に空のカプセルを与えて事実上の投与回復試験群とした。

40 mg/kg 体重/日投与群の雌（1 例）が、投与 13 日後に切迫殺された。他の所見は雌雄で同様であった。

一般状態では、腹部及び泌尿生殖器周辺での褐色化、褐色尿、糞便の減少、嘔吐等の所見が、20 及び 40 mg/kg 体重/日投与群で共通してみられ、4 mg/kg 体重/日投与群では投与 4 時間間に時々みられた。これらの所見は、40 mg/kg 体重/日投与群の 7～13 週（回復期間）でもみられた。

体重減少は、40 mg/kg 体重/日投与群の投与 1～7 週間後でみられ、投与を中止すると回復した。しかし、試験終了時における雌の平均体重は、対照群より少なかった（12%）。20 mg/kg 体重/日投与群では、試験期間中を通して体重増加抑制がみられた（60%）。

摂餌量は、20 mg/kg 体重/日投与群で 20%、40 mg/kg 体重/日投与群で最大 50%まで減少した。

血液学的検査では、APTT の用量依存的な短縮が唯一の顕著な変化で、4 mg/kg 体重/日以上投与群の雄及び 40 mg/kg 体重/日投与群の雌に認められた。

血液生化学的検査では、肝機能障害の指標である T.Bil、ALP、ALT、AST 及び  $\gamma$ -GTP の顕著な増加が、20 mg/kg 体重/日投与群の投与 4 及び 12（又は 13）週間後並びに 40 mg/kg 体重/日投与群の投与 4 週間後で認められた。また、ALT 及び ALP は、4 mg/kg 体重/日投与群でもわずかな増加が認められた。40 mg/kg 体重/日投与群（投与期間 7 週間、回復期間 6 週間）では、投与 13 週間後までに血清中の値がほぼ対照値に回復した。

臓器の絶対及び相対重量では、有意な変化は認められなかった。

<sup>4</sup> 血液の内因性凝固に関する検査項目：接触因子活性化剤によりフィブリンが形成されるまでの内因性凝固に要する時間を反映する

剖検及び病理組織学的検査では、投与に起因する変化は肝臓に限定されていた。20 及び 40 mg/kg 体重/日投与群での暗調化の所見は、病理組織学的には、色素沈着の増加、肝細胞壊死、細胞質空胞化及び胆管過形成と関連していた。4 mg/kg 体重/日投与群では、時々、軽度～中程度の色素沈着、ごく軽微な肝細胞壊死及び空胞化が認められた。色素は、ほとんどの場合、ポルフィリン及び Bil で、ヘモジデリンも時折認められた。(参照 5)

本試験において、4 mg/kg 体重/日投与群で一般状態の変化及び肝臓への影響がみられたことから、NOAEL は 2 mg/kg 体重/日と考えられた。

#### (7) 6 か月間亜急性毒性試験 (豚、混餌投与①) <参考データ>

子豚 (交雑種(LW)、雌雄各 2 頭/群) を用いたエトキシキンの 6 か月間混餌投与 (0、150、300、500、800、1,000 又は 1,500 ppm) 試験が実施された。

試験期間中に死亡例はなく、一般状態、体重、摂餌量及び飼料要求率については、対照群と比較して著しい差はみられなかった。

血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査では、検査値に若干の変動がみられたが、正常範囲内の変動であり、投与に起因する変化は認められなかった。

剖検においても、投与に起因する変化は認められなかった。

臓器重量では、150 ppm 以上投与群の雌及び 300 ppm 以上投与群の雄で肝臓の絶対重量及び相対重量の増加傾向がみられ、150 ppm 以上投与群の雌では、生殖腺の絶対及び相対重量の減少傾向が認められた。

病理組織学的検査では、肝臓に小円形細胞及び多形核白血球の浸潤が散発的に認められ、腎臓で小円形細胞の浸潤が散見されたが、いずれも軽度で炎症につながるものではなく、対照群の動物においても認められたことから、投与に起因するものとは判断されなかった。(参照 6、9)

例数が少ないため、適切な毒性評価ができないことから NOAEL は設定できなかった。

#### (8) 6 か月間亜急性毒性試験 (豚、混餌投与②) <参考データ>

子豚 (交雑種(LW)、雌雄各 2 頭/群) を用いた 50 %プレミックス製剤によるエトキシキンの 6 か月間混餌投与 (0、2,400、3,800、6,200 又は 10,000 ppm、0、93、136、170 又は 188 mg/kg 体重/日に相当) 試験が実施された。50 %プレミックスの基質として天然ケイ酸が含まれているため、対照群として 0 ppm の他に 1 %天然ケイ酸投与群 (雌雄各 1 頭) が設定された。血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査は、試験開始前、試験開始 13 週間後及び試験終了時に実施された。

試験期間中に、6,200 ppm 投与群の雌 2 頭 (投与開始 15 及び 22 週間後) 及び 10,000 ppm 投与群の雌雄各 2 頭 (雄: 投与開始 10 及び 13 週間後、雌: 投与開始 7 及び 9 週間後) が死亡又は衰弱のため剖検された。

平均体重及び摂餌量は、3,800 ppm 以上投与群で対照群と比較して少なかった。

一般状態では、試験開始直後から 6,200 ppm 以上投与群の雌雄で摂餌量が極めて少なく、徐々に体重が減少した。それに伴い貧血、歩行困難さらに起立不能となり死亡する動物がみ

られた。エトキシキン濃度の増加に伴い、飼料摂取の忌避がみられた。糞の排泄量は極端に少なく、黄緑色を呈した。

血液学的検査では、6,200 ppm 以上投与群で Ht 及び Hb の低下が認められた。

血液生化学的検査では、6,200 ppm 以上投与群で AST 及び ALT の増加並びに ALP、TP 及び Alb の低下傾向が認められた。

尿検査では、著変は認められなかった。

臓器重量では、3,800 ppm 以上投与群のほとんどの臓器において、絶対重量が対照群と比較して減少したが、相対重量では増加した。しかし、肝臓については、2,400 及び 3,800 ppm 投与群で絶対重量が増加し、6,200 ppm 以上投与群では極端な減少が認められた。相対重量では、2,400 ppm 投与群で増加傾向がみられ、3,800 ppm 以上投与群では顕著な増加が認められた。

剖検及び病理組織学的検査では、3,800 ppm 以上投与群で、肝臓及び脾臓におけるヘモジゲリン沈着、諸臓器における水腫、脾臓の腺房細胞分泌顆粒の減少等がみられ、6,200 ppm 以上投与群では、骨髄の血球系細胞の低形成、膠様髄並びに一部の動物に肝細胞の肥大及び脂肪変性が認められた。(参照 6、9)

例数が少ないため、適切な毒性評価ができないことから NOAEL は設定できなかった。

#### (9) 90 日間亜急性毒性試験 (二量体、ラット)

養殖さけにおける、エトキシキンの主要代謝物である二量体<sup>5</sup>の毒性影響評価のためラット (Fischer 344 系、雄、体重約 80 g、8 匹/群) を用いた 90 日間混餌投与 (0 又は 12.5 mg/kg 体重/日) による亜急性毒性試験が実施された。

試験期間中の動物の一般状態では、異常はみられなかった。全ての動物で通常の体重増加がみられ、投与による変化は認められなかった。

投与群の組織には、二量体の蓄積がみられた (脂肪組織、腎臓及び肝臓にそれぞれ 53,319 ± 2,824、1,483 ± 219 及び 1,096 ± 135 mg/kg) が、対照群の組織には認められなかった。エトキシキンは、投与群及び対照群のいずれにも認められなかった。

血液生化学検査では、肝臓機能に関わる ALP、ALT、AST、胆汁酸、Bil、クレアチニン及び TP において、投与群と対照群で有意な差はみられず、肝臓の相対重量においても差はみられなかった。

腎臓機能については、尿中の Alb、クレアチニン、尿素及びタンパク質濃度が測定され、投与群と対照群で有意な差はみられず、腎臓の相対重量についても差は認められなかった。

肝臓における第一相及び第二相の代謝酵素に関わる遺伝子発現及び酵素活性が測定された。投与群では、*Cyp1a1* mRNA の発現が対照群の 3%未満に低下し、*Cyp2b1* 及び *Gstpi1* の mRNA の発現は、それぞれ対照群の 192 及び 144%に増加した。*Cyp3a62* 及び *Ugt1a* については、投与群と対照群の間で差はみられなかった。酵素活性では、投与群の GST 活性が、対照群と比較して低かったが、他のマーカー (UGT 並びに CYP 酵素の活性測定に用い

<sup>5</sup> C-N 結合による二量体

られた EROD、MROD、PROD、BROD 及び BFCOD) では差はみられなかった。以上のように、投与群では、第一相の代謝に関わる *Cyp1a1* mRNA の発現低下及び第二相に関わる *Gstp1* mRNA の増加がみられたが、GST の酵素活性は低下した。

過去に報告されたエトキシキンの代謝に関する知見と本試験における二量体の代謝酵素系に対する影響を比較して、二量体の代謝様式は、同じ酵素系に影響を及ぼすという点で親化合物のエトキシキンと同様である。また、本試験における 12.5 mg/kg 体重/日の用量では、肝臓及び腎臓の機能に異常が認められず、本条件下では二量体は Fischer 344 ラットにおいて毒性影響を示さなかった。(参照 32)

本試験において、肝臓の代謝酵素系への影響以外に二量体の毒性影響は認められなかった。

## 6. 慢性毒性及び発がん性試験

### (1) 53 週間慢性毒性/発がん性併合試験 (マウス、皮下投与) (参考データ)

新生児マウス (Swiss ICR/Ha、低用量群: 57 匹、中用量群: 53 匹、高用量群: 28 匹) を用いて、エトキシキン溶液を 1、7、14 及び 21 日齢時に皮下投与 (10、50 又は 100 (1 日齢時のみ) mg/mL) した。それぞれ 1 日齢時で 500、2,500 又は 5,000 mg/kg 体重、21 日齢時で 250 又は 1,250 mg/kg 体重に相当した。

離乳するまでに、高用量群で 100%、中用量群で 74% 及び低用量群で 2% のマウスが死亡した。対照群では 15% が死亡した。

試験終了 (試験開始 53 週間後) までの各時点で、数匹のマウスを剖検し、組織及び病変の限定部位について、主に腫瘍に関する検査を実施した。肺腫瘍及び肝細胞癌の発生頻度は、投与群と対照群でほぼ同じであった。なお、悪性リンパ腫の発生頻度にわずかな増加 (低用量群: 雌 4 例、中用量群: 2 例、対照群: 0) がみられたが、著者らはこの結果の信頼性は低いと考えた。

以上の結果から、新生児マウスに致死量近傍のエトキシキンを 4 回皮下投与した場合において、1 歳齢までは腫瘍の発生頻度に有意な増加がみられないことが示された。(参照 5)

### (2) 18 か月間慢性毒性/発がん性併合試験 (ラット、混餌投与) (参考データ)

ラット (Fischer 344 系、3 週齢、雌雄各 6~19 匹/群) を用いたエトキシキン (純度不明) の 18 か月間混餌投与 (0 又は 5,000 ppm) による慢性毒性/発がん性併合試験が実施された。

そのうちの 1 群には、エトキシキンを 24 週間混餌投与した後、対照飼料を 34 週間与えた。この試験では腎臓病変の進行を調べるため試験開始 4、12 (又は 14)、24、58 及び 78 週間後に剖検した。

体重増加抑制が、投与群の雌で試験開始後 1~5 週間にみられ、雄では 3 週間後以降に認められた。摂餌量については、試験開始後 4 週間までの雌雄で減少がみられた。

腎臓の病理学的検査では、雌雄で明らかな違いが認められた。雄では、4 及び 14 週間後に明確な腎乳頭の間質の変性がみられ、24 週間後までに腎盂腎炎を伴う壊死及び腎盂の尿路上皮過形成に進行した。雌では、腎乳頭の間質変性 (interstitial degeneration) がごくわずかに 14 週間後にみられたが、進行は認められなかった。

Fischer344 ラットで一般にみられる慢性進行性腎症は、エトキシキン投与群で加速された。Schmorl 染色により、リポフスチンが黄褐色の色素沈着として投与群、特に雌の近位尿細管に認められた。

24 週間後に認められた病変については、引き続き対照飼料を 34 週間給与した後の検査で回復は認められなかった。著者らは前がん病変とみなされる所見はなかったと判断した。

本試験において、エトキシキン（混餌濃度 5,000 ppm、250 mg/kg 体重/日相当）の若齢雄ラットに対する強い腎毒性が示された。（参照 5）

### （3）2 年間慢性毒性/発がん性併合試験（ラット、混餌投与）

ラット（雌雄各約 10 匹/群）を用いた、エトキシキンの 2 年間混餌投与（0、62、125、250、500、1,000、2,000 又は 4,000 ppm）による慢性毒性/発がん性併合試験が実施された。被験動物は、投与開始 200、400、600 及び 715 日後に剖検された。

死亡率は、投与群と対照群の間で有意な差は認められなかった。

有意な体重増加抑制が、2,000 ppm 投与群の雄で投与開始 225 日後に、雌では 21 日後に認められた。

肝臓及び腎臓の相対重量では、250 ppm 投与群の雄及び 1,000 ppm 投与群の雌で投与開始 200 日後に増加が認められた。

Hb は、2,000 及び 4,000 ppm 投与群の雌雄ともに、投与開始 100 日及び 300 日後において正常であった。

腎皮質における組織学的変化が、2,000 及び 4,000 ppm 投与群の雄で投与開始 200 日後にみられたが、雌では認められなかった。他の全ての臓器は、雌雄ともに 200 日後では正常であった。400 日後では、雄にのみ腎臓（腎盂腎炎）、肝臓及び甲状腺に病変がみられた。

717 日までは、雌雄で同様の病変がみられたが、雄で顕著であった。700 日後に偶発的に腫瘍の発生がみられたが、発生頻度に用量相関性はみられず、対照群にも発生がみられた。62 ppm 投与群では明確な影響はみられず、500 ppm 投与群の雄（2 例）で腎臓にわずかな病変が認められたが、700 日以降に検査した群の異常と加齢による変化とを区別することはできなかった。

JMPR は、この試験では 1 群あたりの動物数が少なく、背景レベルが低い腫瘍のような稀な事象の変化を検出するには感度に限度があるため、発がん性についての評価は行っていない。しかし、投与量の用量範囲が広いこと及び経時的にサンプリングされていることから、報告された所見はある程度の信頼性があると考え、NOAEL を 125 ppm（6 mg/kg 体重/日）としている。（参照 3、5）

本試験において、250 ppm 投与群の雄で肝臓及び腎臓の相対重量の増加がみられたことから、NOAEL は 125 ppm（6 mg/kg 体重/日）と考えられた。発がん性については、評価できなかった。

### （4）30 か月間慢性毒性/発がん性併合試験（ラット、混餌投与）

ラット（Fischer344 系、投与群：雌雄各 80 匹/群、対照群：雌雄各 130 匹）を用いた、エトキシキンの 30 か月間混餌投与（0、160、400、1,000 又は 2,500 ppm（雄：0、7.09、17.69、

44.98 又は 115.5 mg/kg 体重/日、雌 : 0、8.38、20.58、52.88 又は 138.8 mg/kg 体重/日) による慢性毒性/発がん性併合試験が実施された。被験動物は、投与開始 26、52、78 及び 130 週間後に剖検された。

一般状態に異常は認められず、死亡率は、投与群と対照群との間で有意な差は認められなかった。

体重増加抑制が、1,000 ppm 以上投与群の雌雄で認められた。

尿検査では、投与に起因する異常はみられなかった。投与群及び対照群ともにタンパク反応がみられ、試験期間が進むとともに反応が強くなる傾向がみられたことから、加齢による変化と考えられた。また、潜血及びケトン体の反応で陽性がみられたが、投与群及び対照群のいずれからも検出されたことから、投与に起因する変化ではなく偶発的なものと考えられた。

血液学的検査では、1,000 ppm 以上投与群の雌雄で 78 週間後まで Ht、Hb 及び RBC の軽度の減少又は減少傾向がみられたが、130 週間後ではみられなかった。

血液生化学的検査では、400 ppm 以上投与群の雌及び 2,500 ppm 投与群の雄で T.Chol の軽度の増加がみられた。また、400 ppm 以上投与群の雌雄で ALT、AST 及び ALP の低下又は低下傾向が 78 週間後までみられたが、130 週間後ではみられなかった。

剖検所見では、1,000 ppm 以上投与群の雄で肝臓の腫大及び腎臓表面の顆粒状化又は粗造化が、雌で腎臓における退色が、並びに雌雄で甲状腺の褐色化がそれぞれみられた。また、2,500 ppm 投与群の雌雄で脾臓の萎縮がみられた。

臓器重量では、1,000 ppm 以上投与群の雌雄で腎臓の絶対及び相対重量の増加又は増加傾向がみられ、2,500 ppm 投与群の雌雄で肝臓の絶対及び相対重量の増加又は増加傾向が、脾臓で絶対及び相対重量の減少又は減少傾向がみられた。

病理組織学的検査では、非腫瘍性病変として、肝臓では 2,500 ppm 投与群の雌雄で小葉中心性肝細胞腫大の増加が、2,500 ppm 投与群の雄で肝細胞泡沫状脂肪化がみられた。腎臓では 2,500 ppm 投与群の雌雄で褐色色素沈着及び腎盂粘膜上皮の過形成の増加がみられた。脾臓では 2,500 ppm 投与群の雌雄で萎縮がみられた。甲状腺では 400 ppm 以上投与群の雄及び 2,500 ppm 投与群の雌でろ胞上皮過形成及びろ胞上皮褐色色素沈着がみられた。膀胱では 400 ppm 以上投与群の雌及び 1,000 ppm 以上投与群の雄で粘膜上皮過形成、1,000 ppm 以上投与群の雌及び 2,500 ppm 投与群の雄で粘膜上皮乳頭状過形成並びに 400 ppm 以上投与群の雌で脂肪浸潤（粘膜下織及び筋層における脂肪組織の増殖）の増加がみられた。

腫瘍性病変としては、エトキシキン投与に起因すると思われる腫瘍の発生が雌の膀胱でみられ、乳頭腫が 400 及び 1,000 ppm 投与群で各 1 例並びに 2,500 ppm 投与群で 8 例、角化棘細胞腫が 1,000 ppm 投与群で 1 例、移行上皮癌が 1,000 ppm で 2 例、2,500 ppm で 4 例みられた。2,500 ppm 投与群の膀胱腫瘍は 16% (12/77 例) であった。これは、試験に供されたラットの系統における当該腫瘍発生率の背景情報 (1%未満~2.5%) と比較して有意に高いものであった。膀胱腫瘍以外には投与に起因すると思われる腫瘍の誘発はなかった。また、腫瘍性病変全体の発生頻度は、対照群に比べ投与群で低い傾向がみられた。(参照 12)

400 ppm 以上投与群で、腎臓、甲状腺及び膀胱に影響がみられたことから、本試験の NOAEL は 160 ppm (雄で 7.09 mg/kg 体重/日、雌で 8.38 mg/kg 体重/日) と考えられた。

エトキシキン膀胱に対して発がん性があることが示唆された。

#### (5) 1年間慢性毒性試験（イヌ、混餌投与）

イヌ（ビーグル種、6～7か月齢、雌雄各4匹/群）を用いたエトキシキンの1年間混餌投与（0、0.9、1.8、2.7又は3.6 mg/kg 体重/日）による慢性毒性試験が実施された。混餌飼料は、食餌（缶入り）の1/3量にエトキシキン溶液（溶媒：プロピレングリコール）を添加して調製し、摂餌を確認した後、残りの2/3量（エトキシキン無添加）を与えた。必要とする動物にはさらに追加分の食餌（エトキシキン無添加）を与えた。

試験期間中に死亡例はみられず、一般状態では投与による影響はみられなかった。

雌雄ともに全ての群の動物で同等の体重増加がみられ、体重では投与による影響はみられなかった。

摂餌量では、対照群を含め数例で食餌（エトキシキン無添加）の食べ残しがみられたが、頻度は低く例外的であり、試験期間を通して雌雄ともに全ての群の動物において与えた食餌の全量が摂取された。

眼検査、血液学的検査、血液生化学検査及び尿検査では、投与による影響はみられなかった。

剖検では、雌雄ともに全ての群の動物で肝臓の蒼白化がみられ、また、対照群の動物を含む数例で肝臓の変色（黄褐色）がみられたが、いずれも病理組織学的検査により食餌と関連していることが示された。その他にみられた変化は、この系統の動物に一般にみられ、また加齢変化に伴うものであり、投与による影響とは考えられなかった。

臓器重量では、3.6 mg/kg 体重/日投与群の雄で副腎の相対重量（脳重量に対する）の増加がみられた。しかし、病理組織学的検査では、この変化に関連する影響はみられず、投与によるものとは考えられなかった。2.7 mg/kg 体重/日以下の投与群でも、他の臓器に統計学的に有意な変化が散見されたが、いずれも用量依存性がなく、また、病理組織学的検査において関連性がみられなかったことから、投与によるものとは考えられなかった。一方、統計学的に有意ではなかったが、3.6 mg/kg 体重/日投与群の雌で卵巣重量の増加がみられた。しかし、これは、1例の卵巣に両側性嚢胞（退縮黄体）がみられたためであり、投与とは無関係で正常な生理学的変化であった。

病理組織学的検査では、3.6 mg/kg 体重/日投与群の雄の肝臓（1/4例）で、少数のクッパー細胞及び肝細胞中に赤褐色異方性（複屈折）の色素がみられたが、この色素の存在と病理組織学的所見との関連はみられなかった。また、3.6 mg/kg 体重/日投与群の雄の副腎（2/4例）で、多巣性のわずかな空胞化がみられたが、毒性影響とは考えられなかった。雌雄ともにその他にみられた変化は、この系統の動物に一般にみられ、また加齢変化に伴うものであり、投与による影響とは考えられなかった。（参照 33）

本試験において、投与に起因する毒性影響はみられなかったことから、NOAELは最高用量の3.6 mg/kg 体重/日と考えられた。

#### (6) 5年間慢性毒性/発がん性併合試験（イヌ、混餌投与）

イヌ（雌雄各 14 頭/群）にエトキシキン<sup>6</sup>を混餌投与（0 又は 300 ppm）し、5 年間慢性毒性/発がん性併合試験が実施された。

血液学的検査、尿検査、血液生化学的検査（AST、BUN、BSP 試験）、臓器重量、相対重量、体重並びに肉眼的及び病理組織学的検査において投与による影響は認められなかった。

（参照 5）

本試験における NOAEL は 300 ppm（7.5 mg/kg 体重/日）と考えられた。

#### （7）33 週間発がん性試験（ラット、混餌投与）〈参考データ〉

*N*nitrosoethyl-*N*ethanolamine イニシエーション処置による腎及び肝腫瘍の研究の一部として、ラットの対照群の 1 つ（Fischer 344 系、8 週齢、雄 25 匹）に、試験終了時（41 週齢）までエトキシキンが混餌投与（8,000 ppm）され、肝臓、腎臓及び肉眼的病変部分の病理組織学的検査が行われた。

肝臓では、 $\gamma$ -GTP 陽性病巣、過形成結節<sup>6</sup>及び肝細胞癌は認められず、腎臓病変については、データが示されていない。（参照 5）

*N*nitrosobutyl-*N*hydroxybutylamine イニシエーション処置による膀胱腫瘍研究の一部として、対照群ラット（Fischer 344 系、雄 25 匹）にエトキシキンが混餌投与（8,000 ppm）された。

投与開始 32 週間後での膀胱における単純過形成並びに乳頭状・結節性過形成の発生率は、アスコルビン酸投与群及びエリソルビン酸ナトリウム投与群よりも高く、単純性過形成の発生率は *N*nitrosobutyl-*N*hydroxybutylamine 単独投与群よりも高かった。無投与の対照群は設定されなかった。エトキシキン投与群では、膀胱の乳頭腫及び癌腫は認められなかった。

（参照 5）

#### （8）24 週間発がん性試験（ラット、混餌投与）〈参考データ〉

上記（6）の試験と同様の膀胱癌の研究が実施され、ラット（Fischer 344 系、雄 15 匹/群）にエトキシキンが 24 週間混餌投与（8,000 ppm、400 mg/kg 体重/日相当）された。

膀胱の乳頭状・結節性過形成及び乳頭腫の誘発は認められなかった。（参照 5）

#### （9）32 週間膀胱二段階発がん性試験（ラット、混餌投与）〈参考データ〉

*N*butyl-*N*(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) でイニシエーション処置された膀胱二段階発がん性試験が実施された。ラット（Fischer 344 系、6 週齢、雄 25 匹/群）に、あらかじめ BBN を 4 週間飲水投与（500 ppm）した後、エトキシキンを混餌投与（8,000 ppm）し、エトキシキン投与 32 週後に膀胱の病理組織学的検査が行われた。

<sup>6</sup> 肝細胞腺腫

BBN 処置後にエトキシキンを投与した群では、単純過形成、乳頭状・結節性過形成、乳頭腫及び癌の発生が認められ、乳頭状・結節性過形成及び乳頭腫の発生頻度は、対照群 (BBN のみの投与群) に比べ有意に増加した。

また、BBN 未処置のエトキシキン 32 週間単独投与群においても乳頭状・結節性過形成の発生が認められたが、腫瘍の発生はみられなかった。(参照 13)

#### (10) 22 週間膀胱二段階発がん性試験 (ラット、混餌投与) (参考データ)

BBN でイニシエーション処置された膀胱二段階発がん性試験が実施された。ラット (Fischer344 系、6 週齢、雄 20 匹/群) に、あらかじめ BBN を 2 週間飲水投与 (500 ppm) した後、エトキシキンを混餌投与 (1,250、2,500 又は 5,000 ppm) し、エトキシキン投与後 22 週後に膀胱の病理組織学的検査が行われた。

BBN 処置後の 5,000 ppm 投与群で乳頭腫が、1,250 及び 2,500 ppm 投与群で乳頭状・結節性過形成及び乳頭腫が認められたが、対照群 (BBN のみの投与群) との間に発生頻度に有意な差は認められなかった。

BBN 未処置のエトキシキン (5,000 ppm) 22 週間単独投与群においては過形成等の増殖性病変の発生は認められなかった。(参照 14)

#### (1.1) エトキシキンの発がん性

ラットを用いた 30 か月間慢性毒性/発がん性併合試験において膀胱への発がん性が示唆された。

ラットを用いた 32 週間の膀胱二段階発がん性試験において、エトキシキン (8,000 ppm) を単独投与した群では、膀胱に単純過形成及び乳頭状・結節性過形成が認められた。一方、22 週間の膀胱二段階発がん性試験では、エトキシキン (5,000 ppm) の単独投与群において、膀胱に過形成を含む増殖性病変は認められていない。

また、32 週間の膀胱二段階発がん性試験において、BBN 処置後のエトキシキン投与群で、乳頭状・結節性過形成及び乳頭腫の発生頻度が、対照群に比べて有意に増加したが、22 週間の試験では、乳頭状・結節性過形成及び乳頭腫の発生頻度について BBN 処置後のエトキシキン投与群と対照群 (BBN のみの投与群) との間に有意差は認められなかった。

BBN によるイニシエーション未処置群での膀胱における単純過形成及び乳頭状・結節性過形成の所見は、プロモーション作用を有する抗酸化剤である L-アスコルビン酸ナトリウムの投与試験においてもみられたという報告がある。(参照 15、16)

以上のことから、32 週間の膀胱二段階発がん性試験でのエトキシキン単独投与群における膀胱の過形成の発生は、イニシエーション作用によるものではなくプロモーション作用によるものであり、その作用には閾値が存在するものと考えられる。

また、ラットを用いた 18 か月間及び 30 か月間慢性毒性/発がん性併合試験において脂肪酸の過酸化に由来するとされるリポフスチン沈着が腎臓でみられていることから、エトキシキンの高濃度暴露によって脂質の過酸化促進 (prooxidant) が生じていると推察される。

エトキシキンは生体内でフェノール性代謝物に変換され、さらに硫酸及びグルクロン酸抱合を受けて、尿及び糞中に排泄される。これらの代謝物にはパーオキシダーゼによるキノン

イミンへの酸化によって prooxidant 作用を示す可能性をもつものが含まれていると考えられる。抗酸化作用を示すビタミン E 誘導体やお茶の成分が、高濃度条件下で prooxidant 作用を示すことが知られており、エトキシキン投与でみられた膀胱粘膜の増殖性病変は、親化合物ではなく、prooxidant 作用を持つ代謝物の持続的刺激によって促進されている可能性が考えられる。(参照 17、18、19、20、21)

これらのことから、ラットを用いた 30 か月間慢性毒性/発がん性併合試験においてみられた膀胱の発がん性については、遺伝毒性によるものではなく、非遺伝毒性機序によるものとみなされ閾値の設定は可能であると考えられた。

エトキシキン以外に、非遺伝性で膀胱に発がん性を示す物質として、ワサビ等のアブラナ科植物に含有しているアリルイソチオシアネート並びに農薬及び食品添加物として殺菌剤等の用途で使用されているオルトフェニルフェノールが知られている。(参照 22、23)

## 7. 生殖発生毒性試験

### (1) 多世代生殖毒性試験 (ラット①、混餌投与)

ラットに、エトキシキンを 40 日間混餌投与 (0、250 又は 500 ppm、トコフェロール微減飼料使用) した後、3 回交配させ出産させた。

第 1 回目の交配により得られた産児を用いて、第 2 世代を得た。

受胎能、産児数及び児の生存率に反映するような繁殖への影響は認められなかった。

交配前の投与期間が短く、純度及び 1 群あたりの動物数が不明であることから、この報告の信頼性はやや低いが、エトキシキンは、500 ppm (25 mg/kg 体重/日相当) の混餌投与では、繁殖成績に顕著な影響を及ぼさないと結論付けられた。(参照 5)

### (2) 多世代生殖毒性試験 (ラット②、混餌投与)

ラット (雌、8~9 匹/群) を用い、交配日にエトキシキンを混餌投与 (0、125、375 又は 1,125 ppm) した。

妊娠期間は全ての群でほぼ同じであったが、375 ppm 以上投与群でわずかに産児数の減少がみられた。また、1,125 ppm 投与群では死産率が増加し、離乳時までの生存率が減少した。

また、妊娠 1~10 日にエトキシキンを混餌投与 (1,125 ppm まで) した試験では、同腹児数、死産数、離乳時生存数及び離乳時体重に影響はみられなかった。(参照 5)

本試験において、375 ppm 以上投与群で同腹児数の減少がみられたことから、NOAEL は、125 ppm (6 mg/kg 体重/日) と考えられた。

### (3) 2 世代生殖毒性試験 (ラット、経口投与)

ラット (SD 系、雌雄各 20 匹/群) にエトキシキンを強制経口投与 (0、75、150 又は 300 mg/kg 体重/日) し、2 世代生殖毒性試験が実施された。動物は 1 週間個別に飼育し、その後 16 週間雌雄で飼育し交尾させた。その期間 (16 週間) 中に、出生した児動物については生後 1 日 (PND1) に検査した。その後 (17 週以降) 出生した児 (F<sub>1</sub>) は母動物に離乳 (PND21) までほ育て、離乳したラットを選択して PND81±10 まで雌雄別に飼育した (F<sub>1</sub>)。これらの F<sub>1</sub> を群ごとに 7 日間同居させ F<sub>2</sub> を作出した。F<sub>2</sub> は出生後に安楽死させた。

親動物では、300 mg/kg 体重/日投与群で F<sub>0</sub> 及び F<sub>1</sub> の雄の体重が減少（対照群より 7～20 % 低値）し、F<sub>0</sub> 及び F<sub>1</sub> 世代のエトキシキン投与群では、肝臓及び腎臓重量が用量相関的に増加（13～56 % 増加）した。

F<sub>0</sub> の受胎率は 300 mg/kg 体重/日投与群で低下し、一組当たりの同腹児数の減少（22 %）、一腹当たりの出生児数の減少（22 %）及び妊娠期間の明らかな延長がみられた。

性別による影響をみるため、投与した雌雄にそれぞれ無処置の動物と交配させる試験（クロスオーバー試験）が実施された。エトキシキン投与雌と無処置雄から生まれた児は対照群と比べて約 20 % 体重が軽かったが、投与雄と無処置雌から生まれた児には影響はみられなかった。

F<sub>1</sub> の雌雄においてエトキシキンの影響はみられなかった。

以上より、エトキシキンは 75 mg/kg 体重/日以上用量で腎臓及び肝臓に影響を及ぼし、300 mg/kg 体重/日の用量で生殖毒性（妊娠期間の延長及びクロスオーバー試験における児動物の体重減少）がみられた。150 mg/kg 体重/日が本試験における生殖毒性及び児動物に対する影響の NOAEL と考えられ、親動物に対する毒性の NOAEL は設定できなかった。（参照 10、24）

#### （4）2 世代生殖毒性試験（イヌ、混餌投与）

エトキシキンは、酸化による劣化防止のため市販のドッグフードに添加されることから、イヌを用いたエトキシキンの 2 世代生殖試験を実施した。

最初の交配（F<sub>0</sub>）では、イヌ（ビーグル種、雄 5 匹及び雌 10 匹/群）を用い、交配前に少なくとも 82 日間のエトキシキン混餌投与（0、100 又は 225 ppm）を行った。次の F<sub>1</sub> 交配に用いる児動物（雄 8 匹及び雌 13 匹）には、離乳時から 10～30 か月（雌では 2 回目の発情周期）の交配までの期間にエトキシキンを混餌投与（0、100 又は 225 ppm）した。

F<sub>0</sub> に関しては、同一群内の体重にかなりのばらつきがみられたが、225 ppm 投与群の親動物（F<sub>0</sub>）で、投与開始から 17 週間後まで及び妊娠後期に体重減少の傾向がみられた。雄は、ほとんどの試験期間中で摂餌量が減少した。妊娠が確認された 225 ppm 投与群の雌 2 匹からは産児が得られなかった。

交尾行動、分娩、出産及び離乳に関する指標、精液パラメータ並びに一般状態については、群間で有意な差は認められなかった。

産児数、児動物の生存率並びに児動物の体重及び発育は、全ての群でほぼ同じであった。

225 ppm 投与群の児動物では、肛門のただれ及び発赤、脱水、鼻汁並びに流涙の症状を示すものが雌雄ともに増加した。鼻汁及び流涙は、100 ppm 投与群でも増加した。

100 及び 225 ppm 投与群の親動物の雌及び 225 ppm 投与群の親動物の雄で、統計的に有意な ALP の増加がみられた。また、雌雄ともに 225 ppm 投与群で、正常範囲内の値であったが、単球数及び部分トロンボプラスチン時間（PTT）の短縮がみられた。尿パラメータへの影響は認められなかった。

最初の交配で交尾しなかった雌（対照群 3 匹、225 ppm 投与群 2 匹）は、再交配では交尾がみられた。

F<sub>1</sub>動物では、100 ppm 投与群の雄（1例）及び225 ppm 投与群の雌（2例）が死亡又は瀕死状態で剖検された。雄は、神経症状が疑われたため剖検された。雌1例の死亡原因として心臓疾患が疑われ、他の1例は肺炎のため剖検された。

一般状態では、過度の流涙、脱水症状、消瘦、歯肉の蒼白等がみられ、毒性徴候を示す雌雄の各動物数及び発生数ともに用量相関的に増加した。

225 ppm 投与群の雄の平均体重は、試験開始後48週まで低かった。

摂餌量は、試験開始当初には、225 ppm 投与群で増加したが、その後（試験開始後8～18週の雄及び8～30週の雌）低下した。

血液学的検査では、投与群及び対照群ともに試験期間を通してかなりの変動がみられた。RBC、Ht及びHbに投与に起因する影響がみられ、投与群の雌雄（試験開始10及び23週間後）で対照群に比べ11%まで減少した。また、PTTへの影響もみられ、225 ppm 投与群の雌（試験開始23及び62週間後）及び低用量群の雌（試験開始23及び36週間後並びに最終分析時点）で減少がみられた。

血液生化学的検査では、225 ppm 投与群（試験開始10、23及び36週間後）で血清中ALP、 $\gamma$ -GTP及びALTの増加並びにA/G比の減少がみられ、その変動は100 ppm 投与群で少なかった。これらの変化は、肝機能障害を示している。尿検査では、顕著な変化は認められなかった。

F<sub>1</sub>においては、精液分析並びに交尾行動、妊娠、出産及び離乳に関して対照群と投与群で明白な違いは認められなかった。成体（F<sub>1</sub>）では、投与に起因する一般状態は過剰な流涙のみであり、全投与群の雄でみられた。

血液学的検査では、投与による影響は観察されなかった。血液生化学的検査では、雌で用量相関性のあるパラメータの変化（Glu、Chol、TP、Alb及びA/G比の低下並びにT.Bil、 $\gamma$ -GTP、ALP及びALTの増加）がみられ、225 ppm 投与群では統計的に有意であった。雄では、ALP、 $\gamma$ -GTP及びALTに用量相関的な増加がみられたが、有意差は認められなかった。

剖検では、225 ppm 投与群の雄1例及び雌2例で肝臓の変色（暗紫色）がみられ、エトキシキン投与群の雌2例では頸部リンパ節に出血がみられた。これらの病変は対照群ではみられないことから、投与によるものと考えられた。

エトキシキン投与群の雄で、脾臓及び精巣の絶対重量及び脳比重量の増加がみられ、相対重量では統計的に有意な増加が認められた。雌では、肝臓（10%）、腎臓（10%）及び脾臓（40%）の絶対及び相対重量の増加がみられたが、統計的に有意ではなかった。

病理組織学的検査では、肝臓、下垂体及び脾臓が標的器官であることが示された。剖検でみられた雌の頸部リンパ節の出血は確認されなかった。プロトポルフィリンIXによる暗赤褐色の色素沈着は、対照群及び100 ppm 投与群の雄の肝臓ではみられなかったが、100 ppm 投与群の雌（7/13例）及び225 ppm 投与群の雌雄（雄：2/7例、雌：10/11例）にみられ、色素沈着の程度は用量相関的であった。脾臓の線維化及び出血の頻度は、225 ppm 投与群の雌で増加し（対照群0/13例に対し3/11例）、下垂体嚢胞の頻度は、225 ppm 投与群の雌雄で増加した（雄：対照群0/8例に対し2/6例、雌：対照群2/12例に対し4/10例）。

エトキシキン投与群の雄の児動物では、灰白色～蒼白色の歯茎、過剰な流涙及び脱水症状の頻度が上昇し、雌の児動物では脱水症状の頻度が増加した。出生時及び妊娠6週までの児

動物では、体重がわずかに減少し（10%未満）、雌の児動物では用量相関性が認められた。100 ppm 投与群の児動物における死亡率の上昇は、225 ppm 投与群ではみられず、100 ppm 投与群では同腹児数が多かったことによるものと考えられた。死亡率は、対照群 7/62（11%）、100 ppm 投与群 24/91（26%）及び 225 ppm 投与群 10/77（13%）であった。

試験期間中、100 ppm 投与群の雄 4 例及び雌 1 例並びに 225 ppm 投与群の雌 2 例で神経障害の徴候が認められた。発症例では、後肢の機能障害、起立不全及び髄鞘変性と関係する頭部と胴体部の不安定性がみられた。一般状態に異常がみられなかった同腹児の検査では、神経学的な障害は認められなかった。影響を受けた動物は、全て対照群の動物にはない共通の雄の祖先を持つ系統であった。影響がみられた児動物の親動物を混餌投与せずに交配した結果、神経障害を示した児の発現率は、1 母体で 17%、他の 1 母体で 25%であった。これらの結果は、神経障害は遺伝的な要因により発現したことを示唆している。

摂餌量は試験期間中に変動し、特に授乳中に増加したが、平均で 25 g/kg 体重/日と考えられ、エトキシキンの平均摂取量は、100 ppm で 2.5 mg/kg 体重/日、225 ppm では 6 mg/kg 体重/日に相当した。

以上の結果から、エトキシキンは 225 ppm までの混餌投与群でイヌの生殖能及び繁殖成績に影響を及ぼさないことが示された。（参照 5）

100 ppm 投与群で過剰な流涙及び脱水症状等の一般状態、血液生化学的変化及び肝臓の色素沈着がみられたことから、この試験全体の NOAEL は得られず、LOAEL は 100 ppm（2.5 mg/kg 体重/日相当）と考えられた。

#### （5）発生毒性試験（ラット①、強制経口投与）

妊娠ラット（SD 系、8 匹/群）を用いて、エトキシキン（純度 97.6%）を妊娠 6～19 日に強制経口投与（0、62、125、250、500 又は 1,000 mg/kg 体重/日、溶媒：コーンオイル）し、催奇形性を調べるための用量設定試験が実施された。

1,000 mg/kg 体重/日投与群は妊娠 9 日までに全て死亡又は切迫殺され、500 mg/kg 体重/日投与群の 3 例は妊娠 10～11 日に死亡した。剖検では、毒性影響はみられなかった。

一般状態では、全投与群で排便の減少、暗色尿及び被毛の褐色化が認められ、症状は用量相関的であった。

摂餌量及び体重の減少が、125 mg/kg 体重/日以上投与群の投与開始時にみられ、妊娠 9 日以降では、体重増加は 500 mg/kg 体重/日以下の全ての群で同等であった。これらの動物では、妊娠 20 日まで体重が対照群と比べて 20%低下した。

胎児の体重は、500 mg/kg 体重/日投与群で減少したが、外表奇形、性比及び頭臀長には投与による影響は認められなかった。（参照 5）

#### （6）発生毒性試験（ラット②、強制経口投与）

妊娠ラット（SD 系、25 匹/群）を用い、エトキシキン（純度 97.6%）の強制経口投与（0、50、150 又は 350 mg/kg 体重/日、溶媒：コーンオイル）による発生毒性試験が実施された。投与は妊娠 6～19 日に行い、妊娠 20 日に剖検し、子宮及び卵巣の検査を行った。

また、全胎児の体重、性別並びに外表及び内臓奇形について調べ、骨格検査を行った。

試験期間中に母動物の死亡例は認められなかった。

最高用量 (350 mg/kg 体重/日) 投与群の母動物で泌尿生殖器の着色がみられ、またこれらの群の動物及び 150 mg/kg 体重/日投与群の数例では、その他の部分でも着色がみられた。

350 mg/kg 体重/日投与群では、母動物の体重が妊娠 6~7 日に減少し、体重増加は 6~20 日に対照群に比べ 13 %減少した。150 mg/kg 体重/日投与群では、体重増加の減少は 6~20 日に 5 %であった。

摂餌量は、150 mg/kg 体重/日投与群で 9 %減少し、350 mg/kg 体重/日投与群では 13%減少した。

剖検では、母動物に特筆すべき所見はなかった。子宮重量、胎児数、吸収胚数、着床前及び着床後胚損失数並びに性比及び胎児重量は、全ての群で同等であった。

胎児における奇形及び異常に関する個々の所見は、正常範囲内であり、投与との関連は認められなかった。変異の発生率は対照群で最も高かったが、個々の変異については有意な増加は認められなかった。(参照 5、8)

本試験において、150 mg/kg 体重/日投与群に体重増加抑制がみられたことから、母動物の NOAEL は 50 mg/kg 体重/日、胎児に対する NOAEL は試験の最高用量である 350 mg/kg 体重/日と考えた。催奇形性は認められなかった。

#### (7) 発生毒性試験 (ラット③、強制経口投与)

妊娠ラット (CD/CRJ、20~22 匹/群) を用いて、エトキシキンを強制経口投与 (0、45、130 又は 400  $\mu$ L/kg 体重/日、溶媒: オリーブ油 (10 mL/kg 体重)) し、発生毒性試験が実施された。投与は妊娠 7~17 日に行い、妊娠 21 日に胎児を検査した。

母動物の一般状態では、全投与群で暗緑青色の糞の排泄がみられ、130  $\mu$ L/kg 体重/日以上投与群では、加えて暗緑青色又は暗青色の尿の排泄がみられた。

体重増加の抑制が 400  $\mu$ L/kg 体重/日投与群でみられ、摂餌量の減少は 130  $\mu$ L/kg 体重/日以上投与群で認められた。

母動物の剖検では異常は認められなかった。対照群と各投与群で黄体数、着床数及び着床率には、投与による影響は認められなかった。胎児死亡率、生存胎児数、胎児重量、胎盤重量、性比等についても影響は認められなかった。

胎児の外表観察では、全ての群で異常は認められなかった。内部観察では、投与群の胎児に水腎症及び輸尿管異常が 1.3~2.5 %の割合で出現した。骨格観察では、頸椎椎弓低形成、肋骨短小、腰椎化、仙椎化等の骨格異常が、投与群において 0.4~1.3 %、対照群では 0.6 %出現した。これらの異常は出現状況及び使用した SD ラットの特性から、偶発的な変化と判定された。(参照 6、9)

本試験において、130  $\mu$ L/kg 体重/日投与群で摂餌量の減少がみられたことから、母動物の NOAEL は 45  $\mu$ L/kg 体重/日、胎児に対する NOAEL は試験の最高用量である 400  $\mu$ L/kg 体重/日と考えた。催奇形性は認められなかった。

#### (8) 発生毒性試験 (ウサギ、強制経口投与)

妊娠ウサギ (JW-Nibs、8~9 匹/群) を用いて、エトキシキンを強制経口投与 (0、5、24 又は 120  $\mu\text{L}/\text{kg}$  体重/日、懸濁用液: 1%CMC (carboxymethyl cellulose) 液 (5 mL/kg 体重)) し、発生毒性試験が実施された。投与を妊娠 6~18 日に行い、妊娠 28 日に胎児を検査した。

120  $\mu\text{L}/\text{kg}$  体重/日投与群の全例 (9 匹) で、投与開始後に体重、摂餌量及び飲水量の減少がみられ、うち 5 例が死亡、1 例が流産、他の 1 例が早産した。24  $\mu\text{L}/\text{kg}$  体重/日投与群の 1 例は流産し、5  $\mu\text{L}/\text{kg}$  体重/日投与群の 1 例は流産後に死亡した。対照群では、1 例が早産であった。1%CMC 液の投与により消化器障害が起こり、流産及び早産の一因となった可能性が考えられた。排卵、着床及び胎児の発育には、投与による影響は認められなかった。

胎児の外表及び内部異常については、5  $\mu\text{L}/\text{kg}$  体重/日投与群の胎児 1 例に小眼球症及び水腎症の合併が認められ、対照群では、小体症、頭蓋欠損、短頭症並びに腹水及び心嚢水の増量がそれぞれ胎児 1 例に認められた。

骨格異常では、6 腰椎が 5  $\mu\text{L}/\text{kg}$  体重/日投与群の胎児 1 例にみられ、軟骨異栄養症及び環椎の椎弓形成不全が対照群の胎児 1 例にみられた。胸骨の部分的癒合、腰椎化、仙椎化及び尾椎骨の側方移動が、対照群及び各投与群に低率に認められた。

これらの異常の型及び出現頻度と投与量には関連が認められず、偶発性の変化と判断された。(参照 6、9)

本試験において、120  $\mu\text{L}/\text{kg}$  体重/日投与群で体重、摂餌量及び飲水量の減少がみられたことから、母動物の NOAEL は 24  $\mu\text{L}/\text{kg}$  体重/日、胎児に対する NOAEL は試験の最高用量である 120  $\mu\text{L}/\text{kg}$  体重/日と考えた。催奇形性は認められなかった。

## 8. 対象動物を用いた安全性試験

### (1) 鶏

#### ①ヒナ

ヒナ (30 羽/群) にエトキシキンを混餌投与 (0、125、250 又は 1,250 ppm) し、10 週間観察した。体重増加量、飼料摂取量、育成率、健康状態等に投与による有意な差は認められなかった。(参照 6)

#### ②肉用鶏

肉用鶏 (25 羽/群) にエトキシキンを混餌投与 (0、125、150、250 又は 1,250 ppm) し、10 週間観察した。死亡率、体重増加量、飼料摂取量、発育、健康状態等に投与による有意な差は認められなかった。(参照 6)

#### ③採卵鶏

採卵鶏 (10 羽/群) にエトキシキンを混餌投与 (125 又は 500 ppm) し、8 週間観察した。体重、卵重、飼料摂取量及び産卵率に投与による有意な差は認められなかった。(参照 6)

#### ④種鶏

親鶏 (70羽/群) 及びヒナ (200羽/群) に、エトキシキンを混餌投与 (7.5、75 又は 750 ppm) し、490日間観察した。親鶏の産卵率、受精率及びふ化率並びにヒナの生存率及び成長率において、投与群と対照群で差は認められなかった。組織学的検査では、親鶏 (雌雄) 及びヒナの肝臓、腎臓、脾臓、卵巣、輸卵管及び甲状腺において異常は認められなかった。(参照6)

## (2) 豚

豚 (6頭/群) にエトキシキンを混餌投与 (1,500 又は 15,000 ppm) し、体重増加量、飼料摂取量及び飼料効率について8週間調べた。15,000 ppm 投与群では、対照群に比べ飼料摂取量及び体重増加日量がやや劣る傾向がみられたが、1,500 ppm 投与群では、有意な差は認められなかった。(参照6)

## (3) 牛

牛 (2~4頭/群) にエトキシキンを混餌投与 (1,500 又は 15,000 ppm) し、16週間観察した。15,000 ppm 投与群では、食下量の低下がみられたが、発育及び飼料摂取量においては投与による有意な差は認められなかった。(参照6)

## (4) 魚類

### ①うなぎ

うなぎ (2年魚、400~600尾/群) にエトキシキンを混餌投与 (0、150 又は 750 ppm) し、約4か月間飼育した。750 ppm 投与群では、摂餌不良となったが、飼料効率及び斃死率については対照群との差は認められなかった。150 ppm 投与群の斃死率では、対照群より良好であった。(参照6)

うなぎ (2年魚、100~600尾/群) にエトキシキンを混餌投与 (0、150 又は 450 ppm) し、32日間飼育した。斃死率、飼料効率等において対照群との明確な差は認められなかった。(参照6)

### ②にじます

にじます (300尾/群) にエトキシキンを混餌投与 (0、150 又は 750 ppm) し、約4か月間飼育した。飼料効率、成長率、斃死率等において対照群との明確な差は認められなかった。(参照6)

にじます (200尾/群) にエトキシキンを混餌投与 (0、150 又は 450 ppm) し、約2か月間飼育した。飼料効率、成長率、斃死率等において対照群との明確な差は認められなかった。(参照6)

### ③あゆ

あゆ (400尾/群) にエトキシキンを混餌投与 (0、150又は450 ppm) し、約2か月間飼育した。450 ppm 投与群では、試験開始後10日頃から摂餌が低下し、飼料効率も対照群に比べて劣ったが、150 ppm 投与群では、対照群との差は認められなかった。(参照6)

#### ④こい

こい (まごい、200尾/群) にエトキシキンを混餌投与 (0、150又は450 ppm) し、76日間飼育した。450 ppm 投与群では、摂餌量及び飼料効率が低下したが、150 ppm 投与群では、対照群より良好な結果であった。(参照6)

### 9. 一般薬理試験

#### (1) 体温

ウサギ (JW種、雌) にエトキシキンが経口投与 (500 mg/kg 体重) された。投与24時間後に0.6~2.1°Cの体温低下が認められ、72時間後には回復した。100 mg/kg 体重以下の投与量では顕著な影響は認められなかった。(参照6)

#### (2) 脳波及び瞳孔

ウサギ (JW種) にエトキシキンが経口投与 (500 mg/kg 体重以下) され、投与による影響を6時間観察したが、特に顕著なものは認められなかった。(参照6)

#### (3) 血圧、心拍及び呼吸

麻酔ウサギ (JW-Nibs) を用いてエトキシキンが経口投与 (500 mg/kg 体重以下) された。投与による顕著な影響は認められなかった。(参照6)

### 10. その他の試験

#### (1) 腎毒性 (ラット)

ラット (Fischer 344系、雄: 3~8週齢、4~8匹/群、雌: 8週齢、8匹) に、エトキシキン (純度90%) を混餌投与 (5,000 ppm、雄: 20、26及び30週間、雌: 30週間) し、エトキシキンにより生じた腎臓病変の年齢及び性別との関連性が調べられた。

腎臓の病理組織学的検査として、ブロモデオキシウリジン (BrdU) 標識、 $\gamma$ -GTPの組織化学的検出、HE染色、アリザリンレッド染色並びに免疫プロット法による尿中Alb及び $\alpha_2$ uグロブリンの検査を行った。

体重増加は、投与群で10~15%減少した。雄では、腎臓の絶対重量が5~50%増加し、結果として相対重量が増加した。雌では、腎臓の相対重量が12%増加した。

全投与群の雄で腎皮質の変化 (尿細管上皮細胞内の好酸性細胞質内封入体、尿細管基底膜 (lamina) 内のタンパク質蓄積) がみられた。3週齢時から投与された雄では、腎乳頭壊死、軽微なCa沈着及び腎盂の尿路上皮の過形成がみられた。

投与群の雌の腎臓の組織学的所見では、高濃度のリポフスチン沈着を除き、対照群と同様であった。

雄における BrdU 標識は、好塩基性の尿細管再生像及び通常の HE 染色像とともに、投与 30 週間後で増加がみられたが、投与 20 週間後では増加は認められなかった。雌での BrdU 標識については記載がなかった。

尿中の  $\alpha_2\text{u}$  グロブリン濃度は、投与群の雄でわずかに低下したが、Alb 濃度は有意に増加した。

以上のように、最初の暴露の時期により、エトキシキン混餌投与 (5,000 ppm、250 mg/kg 体重/日相当) によるラットの腎臓病変のパターンが変化し、3 週齢から暴露した場合は、8 週齢からの暴露でみられた皮質病変に加えて腎乳頭壊死が発生した。(参照 5)

## (2) 神経毒性

ラット及びマウスの急性毒性試験 (経口及び吸入) において、高用量 (単回強制経口投与試験で  $>1,500$  mg/kg 体重) の投与後に運動失調、痙攣、呼吸困難等の毒性徴候がみられた。また、エトキシキン及びその代謝物の血液脳関門への侵入及び中枢神経系への蓄積の可能性が排除されないことから、神経毒性に関しては明らかに不確実な事項が存在している。しかし、単回又は反復投与による神経毒性に限定した試験は実施されていない。したがって、エトキシキンの神経毒性の可能性について最終的な結論を下すことはできない。しかしながら、毒性試験のプロファイル全体及び特に信頼できる短期間投与試験において脳の肉眼的及び病理組織学的所見がみられないことから、消費者、使用者等が暴露されると考えられる用量においてリスクが生じることはないと思われる。遅発性神経毒性に関しては、エトキシキンはそのような影響を起こす可能性のある化学的分類 (有機リン化合物) には属さないことから無関係であると考えられる。(参照 10)

## (3) 皮膚刺激性試験 (ウサギ)

ウサギ (3 匹) を用いて、エトキシキン (原液乳剤 (70%)) を塗布 (露出皮膚) し、24 時間後に除去した。

24 時間後には、全ての動物でわずかな紅斑がみられ、48 時間後では、1 例にごくわずかの赤みが残っていた

エトキシキンは、上記の条件下において軽度の皮膚刺激性物質であると分類された。(参照 3)

エトキシキンは、ウサギ皮膚への半閉塞塗布 (4 時間) により、一過性の軽微な紅斑を生じた。浮腫はなかったが、落屑 (desquamation) が暴露後 7 日までみられた。(参照 5)

## (4) 皮膚刺激性試験 (ウサギ及びモルモット)

エトキシキンをウサギ及びモルモットの皮膚 (直径 2 cm) に 1 日 1 回 2 週間連続塗布したところ、小赤斑、続いて発疹及び痂皮の形成が認められた。しかし、塗布終了後、病変は徐々に消失し、2~3 週間後に回復した。(参照 6)

## (5) 眼刺激性試験 (ウサギ)

エトキシキン、ウサギの結膜に一過性の軽微～軽度の発赤及び浮腫を生じた。これらの全ての影響は、4日以内に完全に消失した。(参照5)

#### (6) 皮膚感作性試験 (モルモット)

モルモット (雌雄各6匹) を用いた皮膚感作性試験において、エトキシキンは非常に弱い紅斑反応を示した。(参照5)

### 1.1. ヒトに関する知見

20年間のエトキシキンの流通及び使用で、皮膚刺激性及び感作性を示す報告はみられなかった。しかし、皮膚炎が、エトキシキン70%溶液で噴霧され濡れた状態のリンゴを取り扱う作業者の間に多く発生した。

ボランティアによるパッチ試験から、これらの皮膚反応は直接の刺激によるものではなく、感作の結果であることが示された。(参照3)

いくつかの報告で、エトキシキンを含む動物用飼料を取り扱う作業者に多くみられる重度の皮膚炎の原因が、エトキシキンである可能性が示された。ワセリン中0.01%程度の低い濃度のエトキシキンで惹起された作業場で、パッチテスト陽性と記録された。(参照5)

## III. 食品健康影響評価

### 1. 国際機関等における評価について

#### (1) JMPR における評価

JMPR は1998年に、イヌを用いた2世代生殖毒性試験における一般状態等のLOAEL (2.5 mg/kg 体重/日) に安全係数500を適用し、エトキシキンのADIを0.005 mg/kg 体重/日と設定している。この安全係数は、LOAELを用いていること並びに遺伝毒性及び長期毒性の試験データが不十分であることによるものである。この試験は、NOAELとして2 mg/kg 体重/日が示された90日間亜急性毒性試験より長期間で、かつ新しい試験であった。

2005年のJMPRでは、長期毒性に関する追加情報はなかったが、エトキシキン及び植物におけるその3種類の代謝物/分解産物 (MEQ、DHEQ 及びDHMEQ) の遺伝毒性に関する情報が提供され、これらの化合物は *in vivo* で遺伝毒性はないと結論付けられた。これらの3種類の代謝物のうちDHEQ 及びDHMEQの急性毒性は、エトキシキンより強くはなかったが、MEQはわずかに強いようであった。しかし、この会合では、安全係数500は、この毒性の違いに対して十分に許容できるものと結論付けられ、1998年のJMPRで設定されたADIの妥当性が、3種類の代謝物/分解産物への適応を含めて確認されている。(参照5、8)

#### (2) EPA における評価

EPAにおける食品摂取による影響評価では、急性参照用量 (Acute Reference Dose: ARfD) 及び慢性参照用量 (Chronic Reference Dose: CRfD) が算出され、発がん性に関しては、

適切な試験が実施されていないことから、癌のリスクがアメリカ人集団の70年暴露推定値に上限推定勾配係数 ( $Q_1$ ) を乗じて計算され、癌の発生確率として表されている。

ARfD は、ウサギの発生毒性試験において最大用量の 3 mg/kg 体重/日で影響がみられなかったことから、安全係数 100 (種差: 10、個体差: 10) を適用して 0.03 mg/kg 体重/日と設定されている。CRfD については、イヌの 90 日間亜急性毒性試験から得た NOAEL (2 mg/kg 体重/日) に安全係数 100 (種差: 10、個体差: 10) を適用して 0.02 mg/kg 体重/日と設定されている。この試験における LOAEL は、肝臓酵素値の上昇及び病理組織学的所見 (細胞質空胞化及び肝細胞壊死) から 4 mg/kg 体重/日であった。

エトキシキンに構造的に近似している 1,2-dihydro-2,2,4-trimethylquinoline では、ラットを用いた 2 年間の試験で腎臓腫瘍の発生がみられ、エトキシキンでは雄のラットに腎毒性がみられた。エトキシキンには発がん性に関する試験がないが、最大許容量 (MTD) と発がん性との間には関係性が高いと結論され、エトキシキンの発がん性の境界推定が行われた。Q 境界推定法及び MTD を用いて、上限推定勾配係数 ( $Q_1$ ) は 0.04 (mg/kg 体重/日)<sup>1</sup> と計算され、生涯における癌発生の確率は  $2 \times 10^{-6}$  未満と推定された。(参照 4)

### (3) EFSA における評価

EFSA では、2010 年に農薬のピアレビューにおける結論 (CONCLUSION ON PESTICIDE PEER REVIEW) を提示している。この報告書では、エトキシキン及びその製剤のなしへの使用申請 (抗酸化剤及び殺菌剤) に対して、主にほ乳動物に対する毒性に焦点を当て評価が行われた。その中で、評価対象物質中の不純物の分析及びほ乳動物を用いた毒性試験等において、評価への適用にあたり問題点が多いことが指摘された。

ほ乳動物を用いた毒性試験については、申請者から提示された長期毒性/発がん性、神経毒性、生殖毒性及び発生毒性などの主要なエンドポイントの試験が、1959 年にまで遡る国際評価機関の評価、抄録及び指定報告担当加盟国 (RMS) で収集された文献等によるもので、基準値の設定及び追加の安全係数を設定するための科学的根拠となるものではないと判断された。その結果、データベースが限定されているため結論が得られず、エトキシキンに対して基準値 (ADI、ARfD 及び許容作業暴露レベル(AOEL)等) を設定することはできなかつたとされている。(参照 25)

## 2. 食品健康影響評価について

エトキシキンの遺伝毒性試験では、CHO 細胞及びヒト末梢血リンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験において陽性であり、CHO 細胞では構造的異常のほか、倍数性細胞や核内倍加の顕著な増加が認められ、代謝活性化の条件下でより強く現れている。マウスリンフォーマ TK 試験での陽性結果は、遺伝子突然変異ではなく染色体異常が誘発されたことを示すものと考えられた。

染色体異常誘発を指標にした *in vivo* 試験では、幼若ラットの肝臓を用いた小核試験において、高用量投与群で小核を有する肝細胞数の有意な増加がみられたが、マウス骨髄を用いた小核試験では陰性であった。エトキシキンは脂溶性が高く、血漿中濃度測定結果からも全身暴露が確認されていることから、マウス骨髄細胞を用いた小核試験が陰性であったことに