

表 14 通常薬量散布後の小麦試料の各部位における放射能分布

試料	青刈り-1	根-1	青刈り-2	根-2	わら-中間	穂	根-3
mg/kg	0.80	0.02	0.65	0.09	0.58	0.02	0.10
試料	わら-成熟	殻	穀粒	根-4			
mg/kg	0.67	0.10	0.005	0.14			

3. 土壌中運命試験

(1) 好氣的土壌中運命試験

[phe-¹⁴C]シフルフェナミドを、火山灰土・埴壤土（長野）に乾土あたり 0.3 mg/kg の用量（300 g ai/ha 相当）で土壌混和し、25±2℃の暗条件下で 180 日間インキュベートし、好氣的土壌中運命試験が実施された。

シフルフェナミドは経時的に分解し、処理直後の 95.5% TAR から処理 180 日後には 2.4% TAR 以下に減少した。主要分解物として C が処理 14 日後に最大 41.9% TAR、D が処理 60 日後に最大 21.5% TAR、E が処理 60 日後に最大 11.2% TAR 及び F が処理 7 日後に最大 15.2% TAR 検出されたが、処理 180 日後には 2.2~15.1% TAR に減少した。

土壌結合残渣については残渣中の 54~61% の残留放射能がヒューミン分画に認められた。その主要分解物として C 及び E が検出され、これらの分解物が土壌に強く結合していることが推定された。

シフルフェナミドの推定半減期は 5.4 日であると考えられた。（参照 2）

(2) 土壌吸着試験

4 種類の国内土壌 [埴壤土（北海道）、重埴土（茨城）、砂質埴壤土（愛知）及び軽埴土（高知）] を用いて土壌吸着試験が実施された。

Freundlich の吸着係数 K_{ads} は 22.2~36.0、有機炭素含有率により補正した吸着係数 K_{oc} は 1,000~2,100 であった。（参照 2）

4. 水中運命試験

(1) 加水分解試験

pH 4（クエン酸緩衝液）、pH 5（クエン酸緩衝液）、pH 7（クエン酸緩衝液）及び pH 9（ホウ酸緩衝液）の各滅菌緩衝液に [phe-¹⁴C]シフルフェナミドを 0.025 µg/mL となるように添加し、恒温槽中で 50±5℃で 5 日間暗条件下でインキュベートして、予備の加水分解試験が実施された。

その結果、シフルフェナミドは、pH 4、5 及び 7 の緩衝液中においてほとんど分解せず、安定であった（91~92% TAR）。pH 9 の緩衝液中においては、徐々に分解した（処理 5 日後に 70.8% TAR）。

したがって、pH 9 の緩衝液を用いて、加水分解試験が実施された。

pH 9 の滅菌緩衝液に[phe-¹⁴C]シフルフェナミドを 0.058、0.025 または 0.026 µg/mL となるように添加し、それぞれ 20°C で 30 日間、35°C で 60 日間または 50°C で 30 日間の暗条件下でインキュベートした。

pH 9 の各温度においてシフルフェナミドは、処理 30 日後に 93.8% TAR (20°C)、67.2% TAR (35°C) 及び 3.4% TAR (50°C)、また、60 日後で 46.5% TAR (35°C) まで減少した。すべての温度での主要分解物は C であり、最大で 6.0% TAR (20°C、処理 30 日後)、56.0% TAR (35°C、処理 60 日後) 及び 101% TAR (50°C、処理 30 日後) であった。その他に同定された分解物として B 及び D が最大 4.9% TAR (50°C、処理 1 日後) 及び 1.3% TAR (50°C、処理 21 日後) に認められた。

シフルフェナミドの pH 9 の緩衝液中における推定半減期は、20°C で 642 日、25°C で 288 日 (アレニウス式より算出)、35°C で 62 日、50°C で 7 日であると考えられた。(参照 2)

(2) 水中光分解試験

[phe-¹⁴C]シフルフェナミドを滅菌蒸留水または自然水 (無滅菌、神奈川、河川水、pH 7.48) に 0.13 µg/mL の用量で添加し、25±1°C で 30 日間キセノンランプ光 (光強度: 600 W/m²、測定波長: 290~800 nm) を連続照射する水中光分解試験が実施された。

蒸留水中の光照射区において、シフルフェナミドの分解はほとんど認められなかった (処理直後に 88.9% TAR、処理 30 日後に 87.1% TAR)。主要分解物として、B が処理 30 日後に最大 8.5% TAR、C が処理 21 日後に最大 1.9% TAR 検出された。暗対照区においても、試験終了時に 95% TAR 以上が親化合物として残存しており、分解はほとんど認められなかった。

河川水中の光照射区において、シフルフェナミドはわずかに分解し、処理直後の 92.0% TAR から処理 30 日後には 86.3% TAR に減少した。主要分解物として、B が処理 14 日後に最大 10.9% TAR 検出された。その他に C (処理 30 日後に最大 2.0% TAR) 及び D (処理 21 日後に最大 1.2% TAR) が検出された。暗対照区においては、試験終了時に 95% TAR 以上が親化合物として残存しており、分解はほとんど認められなかった。

シフルフェナミドの蒸留水中における推定半減期は 594 日、自然太陽光 [北緯 35 度 (東京)、春] 換算で 3,604 日、河川水中の推定半減期は 288 日、自然太陽光 [北緯 35 度 (東京)、春] 換算で 1,748 日であった。(参照 2)

5. 土壌残留試験

洪積土・埴土 (石川) 及び火山灰土・埴壤土 (長野) を用い、シフルフェナミド及び分解物 (C、D、E 及び F) を分析対象化合物とした土壌残留試験 (容器内及び圃場試験) が実施された。結果は表 15 に示されている。(参照 2)

表 15 土壌残留試験成績

試験	濃度*	土壌	推定半減期 (日)	
			シフルフェナミド	シフルフェナミド+ 分解物 (C、D、E、F)
容器内試験	0.25 mg/kg	洪積土・埴土	約 8	約 19
		火山灰土・軽埴土	約 17	約 24
圃場試験	25 g ai/ha	洪積土・埴土	約 33	約 38
		火山灰土・軽埴土	約 60	約 73

*：容器内試験では標準品、圃場試験では10%水和剤を使用。

6. 作物残留試験

小麦、大麦、野菜及び果物を用い、シフルフェナミドを分析対象化合物とした作物残留試験が実施された。

結果は別紙3に示されている。シフルフェナミドの最高値は最終散布7日後に収穫したもも（果皮）の3.00 mg/kgであり、可食部では最終散布1日後に収穫したはおうとう（果実）の1.85 mg/kgであった。（参照2）

7. 一般薬理試験

マウス及びラットを用いた一般薬理試験が実施された。結果は表16に示されている。（参照2）

表 16 一般薬理試験概要

試験の種類	動物種	動物数/群	投与量* (mg/kg 体重) (投与経路)	最大無作用量 (mg/kg 体重)	最小作用量 (mg/kg 体重)	結果概要
中枢神経系	一般状態 (Irwin 法)	ICR マウス	雄 4 0、500、1,000、 2,000、5,000 (経口)	5,000	—	影響なし
	自発運動量	ICR マウス	雄 10 0、500、 1,000、2,000 (経口)	—	500	全投与群で自発運動低下
	自発運動量 (追加試験)	ICR マウス	雄 8 0、250、500、 1,000 (経口)	500	1,000	自発運動の低下
	ヘキソバル ピタール 睡眠	ICR マウス	雄 10 0、500、 1,000、2,000 (経口)	2,000	—	影響なし

循環器系	血圧、心拍数	Wistarラット	雄 3	0、2,000 (十二指腸内投与)	2,000	—	影響なし
骨格筋	握力	ICRマウス	雄 5	0、500、 1,000、2,000 (経口)	2,000	—	影響なし
腎機能	尿量、浸透圧、蛋白質、比重	SDラット	雄 5	0、500、 1,000、2,000 (経口)	—	500	全投与群で尿量の減少
	尿量 (追加試験)	SDラット	雄 8	0、50、150、 500 (経口)	50	150	150 mg/kg 体重以上投与群で尿量減少

*：溶媒として 1.0%CMC 溶液を用いた。

—：最大無作用量及び最小作用量は設定できなかった。

8. 急性毒性試験

シフルフェナミド原体を用いた急性毒性試験が実施された。結果は表 17 に示されている。(参照 2)

表 17 急性毒性試験結果概要 (原体)

投与経路	動物種 性別・匹数	LD ₅₀ (mg/kg 体重)		観察された症状
		雄	雌	
経口*	SDラット 雌雄各 5 匹	>5,000	>5,000	立毛、うずくまり、よろめき歩行、反応性低下、異常呼吸、四肢の蒼白、つま先立ち、閉眼、接触反応の増加、身繕いの頻度低下 死亡例なし
経皮	SDラット 雌雄各 5 匹	>2,000	>2,000	投与部位の皮膚に紅斑 死亡例なし
吸入	SDラット 雌雄各 5 匹	LC ₅₀ (mg/L)		呼吸促迫 死亡例なし
		>4.76	>4.76	

*：溶媒として 1%MC 水溶液を用いた。

代謝物 B、C、F 及び G ならびに原体混在物のラットを用いた急性経口毒性試験が実施された。

結果は表 18 に示されている。(参照 2)

表 18 急性毒性試験結果概要 (代謝物及び原体混在物)

化合物	投与経路	動物種 性別・匹数	LD ₅₀ (mg/kg 体重)		観察された症状
			雄	雌	
代謝物 B	経口 ¹⁾	SD ラット 雌雄各 5 匹	>5,000	>5,000	立毛、うずくまり 死亡例なし
代謝物 C	経口 ¹⁾	SD ラット 雌雄各 5 匹	2,697	2,993	立毛、うずくまり、よろめき歩行、 反応性低下、異常呼吸、四肢蒼白、 つま先立ち、閉眼、流涎、流涙、 接触反応増加、身繕い頻度低下、 振戦、痙攣 2,500 mg/kg 体重以上で死亡
代謝物 F	経口 ¹⁾	SD ラット 雌雄各 5 匹	1,123	1,360	立毛、うずくまり、よろめき歩行、 反応性低下、異常呼吸、四肢蒼白、 つま先立ち、閉眼、流涎、流涙、 接触反応増加、身繕い頻度低下、 振戦、痙攣 1,000 mg/kg 体重以上で死亡
代謝物 G	経口 ²⁾	SD ラット 雌雄各 5 匹	>2,000	>2,000	立毛、うずくまり 死亡例なし
原体混在物 I	経口 ³⁾	SD ラット 雌雄各 5 匹	3,281	>3,000	喘鳴、開口呼吸、呼吸促迫、深く 遅い呼吸、鼻・口周囲及び眼周囲 の赤色付着物、脱力、尿道周囲の 尿付着、軟便、自発運動低下、う ずくまり、腹部膨満 雄 1,000 mg/kg 体重、雌 1,500 mg/kg 体重以上で死亡
原体混在物 II	経口 ²⁾	SD ラット 雌雄各 5 匹	>2,000	>2,000	症状及び死亡例なし
原体混在物 III	経口 ²⁾	SD ラット 雌雄各 5 匹	>2,000	>2,000	症状及び死亡例なし
原体混在物 IV	経口 ²⁾	SD ラット 雌雄各 5 匹	>2,000	>2,000	症状及び死亡例なし
原体混在物 V	経口 ²⁾	SD ラット 雌雄各 5 匹	>2,000	>2,000	うずくまり、下痢、呼吸数低下、 呼吸緩徐、立毛、閉眼及び歩行失 調 死亡例なし
原体混在物 VI	経口 ²⁾	SD ラット 雌雄各 5 匹	>2,000	>2,000	症状及び死亡例なし
原体混在物 VII	経口 ²⁾	SD ラット 雌雄各 5 匹	>2,000	>2,000	症状及び死亡例なし
原体混在物 VIII	経口 ²⁾	SD ラット 雌雄各 5 匹	>2,000	>2,000	症状及び死亡例なし

注：溶媒として 1)1%MC 水溶液、2)らっかせい油、3)5%アラビアゴムを用いた。

9. 眼・皮膚に対する刺激性及び皮膚感作性試験

NZW ウサギを用いた眼及び皮膚刺激性試験が実施された。眼に対しては軽度の刺激性が認められ、皮膚に対する刺激性は認められなかった。

Hartley モルモットを用いた皮膚感作性試験 (Maximization 法) が実施された。皮膚感作性は陰性であった。(参照 2)

1.0. 亜急性毒性試験

(1) 90 日間亜急性毒性試験 (ラット)

SD ラット (一群雌雄各 10 匹) を用いた混餌 (原体: 0、50、300、1,800 及び 10,800 ppm) 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 19 に示されている。

本試験において、1,800 ppm 以上投与群の雌雄で甲状腺絶対及び比重量²増加、小葉中心性肝細胞肥大等が認められたので、無毒性量は雌雄とも 300 ppm (雄: 20.1 mg/kg 体重/日、雌: 24.7 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 2)

(間細胞過形成の発生機序に関しては[14. (3)]を参照)

表 19 90 日間亜急性毒性試験 (ラット) で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
10,800 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制 ・ 摂餌量減少 ・ PLT 増加 ・ BUN、TP、カリウム、無機リン、T.Chol 及び GGT 増加、Glu 減少 ・ 脳比重量増加、肝絶対及び比重量増加、腎絶対重量増加、精巣及び盲腸比重量増加 ・ 肝小葉像明瞭、腹腔内脂肪組織減少 ・ 心筋炎 ・ 肝胆管肥大 ・ 甲状腺ろ胞上皮細胞肥大 ・ 精巣間細胞過形成 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 摂餌量減少 ・ Ht、Hb、MCV 及び MCH 減少、PLT 増加 ・ TP、無機リン、T.Chol 及び GGT 増加、Glu 及び ChE 減少 ・ 肝絶対重量増加、盲腸絶対及び比重量増加 ・ 肝小葉像明瞭、腹腔内脂肪組織減少、皮下脂肪減少 ・ 心筋空胞形成 ・ 肝胆管肥大 ・ 腎尿細管空胞形成 ・ 甲状腺ろ胞上皮細胞肥大
1,800 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ 腎比重量増加、甲状腺絶対及び比重量増加 ・ 小葉中心性肝細胞肥大 ・ 腎尿細管上皮硝子滴沈着 (α-2u グロブリン沈着) 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制 ・ BUN 及びカリウム増加、T.Bil 減少、TG 減少 ・ 尿中ケトン体増加 ・ 脳、肝及び腎比重量増加、甲状腺絶対及び比重量増加 ・ 小葉中心性肝細胞肥大
300 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

² 体重比重量を比重量という (以下、同じ)。

(2) 90日間亜急性毒性試験 (マウス)

ICR マウス (一群雌雄各 10 匹) を用いた混餌 (原体: 0、100、400、1,600 及び 7,000 ppm) 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。

本試験において、1,600 ppm 以上投与群の雌雄で肝絶対及び比重量増加、小葉中心性肝細胞肥大等が認められたので、無毒性量は雌雄とも 400 ppm (雄: 50.7 mg/kg 体重/日、雌: 70.8 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 2)

表 20 90日間亜急性毒性試験 (マウス) で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
7,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ Ht 減少 ・ A/G 比減少、T.Chol、ALT 及び AST 増加 ・ 肝暗褐色化 ・ 肝巣状壊死、肝細胞核小体肥大、肝細胞脂肪滴減少、クッパー細胞黄色色素沈着 ・ 心筋空胞化 ・ 顎下腺分泌顆粒減少 ・ 精巣間細胞過形成 	<ul style="list-style-type: none"> ・ BUN、TP 及び T.Chol 増加 ・ 尿中ケトン体増加 ・ 脳絶対重量減少 ・ 肝巣状壊死、クッパー細胞黄色色素沈着 ・ 心筋空胞化
1,600 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ 肝絶対及び比重量増加 ・ 小葉中心性肝細胞肥大 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 肝絶対及び比重量増加 ・ 小葉中心性肝細胞肥大
400 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

(3) 90日間亜急性毒性試験 (イヌ)

ビーグル犬 (一群雌雄各 4 匹) を用いた混餌 (原体: 0、150、500 及び 1,500 ppm) 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 21 に示されている。

本試験において、500 ppm 以上投与群の雌雄で肝細胞空胞化及び肥大等が認められたので、無毒性量は雌雄とも 150 ppm (雄: 6.5 mg/kg 体重/日、雌: 7.5 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 2)

(大脳の空胞化の発生機序に関しては[14. (1)]、ALP の由来及び活性に関しては[14. (4)]を参照)

表 21 90 日間亜急性毒性試験（イヌ）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
1,500 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・Neu 減少 ・ALP 及びカリウム増加 ・尿量増加 ・胸腺退縮/萎縮 ・精巣上体精子数減少 ・大脳（視床近傍神経網、皮質表層、白質）空胞化 	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・摂餌量減少 ・BUN、カリウム及び T.Chol 増加、A/G 比減少 ・大脳（視床近傍神経網、皮質表層、白質）空胞化 ・胸腺退縮/萎縮
500 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・BUN 及び T.Chol 増加 ・肝比重量増加 ・肝細胞空胞化(脂肪沈着による)及び肥大 	<ul style="list-style-type: none"> ・APTT 延長 ・ALP 増加 ・肝絶対及び比重量増加 ・肝細胞空胞化(脂肪沈着による)及び肥大
150 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

(4) 90 日間亜急性神経毒性試験（ラット）

SD ラット（一群雌雄各 10 匹）を用いた混餌（原体：0、200、1,000 及び 5,000 ppm）投与による 90 日間亜急性神経毒性試験が実施された。

5,000 ppm 投与群の雌雄で体重増加抑制及び同群の雌で食餌効率の減少が認められた。

その他の検査項目（機能観察総合評価（FOB）、脳の形態学的計測、神経病理組織学的検査を含む）に検体投与の影響は認められなかった。

本試験における無毒性量は、雌雄とも 1,000 ppm（雄：88 mg/kg 体重/日、雌：98 mg/kg 体重/日）であると考えられた。神経毒性は認められなかった。

（参照 2）

(5) 28 日間亜急性経皮毒性試験（ラット）

SD ラット（一群雌雄各 5 匹）を用いた経皮（原体：0、100、300 及び 1,000 mg/kg 体重/日、6~7 時間/日暴露、溶媒：0.01%Tween80 を含む 5%アラビアゴム水溶液）投与による 28 日間亜急性経皮毒性試験が実施された。

いずれの検査項目にも検体投与の影響は認められなかった。

本試験における無毒性量は、雌雄とも本試験の最高用量 1,000 mg/kg 体重/日と考えられた。（参照 2）

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) を用いた混餌 (原体: 0、30、120 及び 480 ppm) 投与による 1 年間慢性毒性試験が実施された。

血液生化学的検査において、480 ppm 投与群の雌雄で ALP の増加が認められた。

その他の検査項目において検体投与の影響は認められなかった。

本試験における無毒性量は、雌雄とも 120 ppm (雄: 4.1 mg/kg 体重/日、雌: 4.4 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 2)

(ALP の由来及び活性に関しては[14. (4)]を参照)

(2) 2年間慢性毒性/発がん性併合試験 (ラット)

SD ラット (一群雌雄各 80 匹) を用いた混餌 [原体: 0、100、500 及び 2,000 (雌) /5,000 (雄)] 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。

各投与群で認められた毒性所見は表 22 に、雄ラットの甲状腺ろ胞細胞に認められた病変の発生頻度は表 23 に示されている。

腫瘍性病変において、5,000 ppm 投与群の雄で甲状腺ろ胞細胞腺腫の発生頻度が有意に増加した。

本試験において、500 ppm 以上投与群の雄で腎皮質尿細管色素沈着及び硝子滴等、雌で甲状腺/上皮小体の比重量増加、小葉中心性肝細胞肥大等が認められたので、無毒性量は雌雄とも 100 ppm (雄: 4.4 mg/kg 体重/日、雌: 5.5 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 2)

(甲状腺腫瘍の発生機序に関しては[14. (3)]、心筋病変の発生機序に関しては[14. (5)]を参照)

表 22 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 (非腫瘍性病変)

投与群	雄	雌
2,000(雌)/ 5,000(雄) ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・生殖器周囲の黄色着色、削瘦 ・体重増加抑制 ・摂餌量減少、食餌効率減少 ・RBC 及び WBC 増加、MCH 及び MCHC 減少 ・ALT、T.Bil 及び A/G 比減少、GGT 及び Alb 増加 ・尿比重減少、尿量増加 ・肝及び甲状腺/上皮小体絶対及び比重量増加、腎比重量増加 ・肝腫大 ・小葉中心性肝細胞肥大、小葉周辺 	<ul style="list-style-type: none"> ・生殖器周囲黄色着色、削瘦 ・体重増加抑制 ・摂餌量減少、食餌効率減少 ・MCH 減少、PLT 増加 ・GGT、T.Chol 及び TP 増加、T.Bil 減少 ・肝絶対及び比重量増加 ・腎比重量増加 ・肝腫大 ・び慢性肝細胞脂肪化 ・慢性心筋炎 ・腎皮質尿細管色素沈着、腎皮質尿

	性/び慢性肝細胞肥大及びび慢性肝細胞脂肪化 ・甲状腺ろ胞細胞肥大	細管円柱 ・甲状腺ろ胞細胞肥大 ・脾慢性炎症及び腺房萎縮 ・大腿筋慢性炎症
500 ppm 以上	・TP 増加 ・腎皮質尿細管色素沈着、腎皮質尿細管硝子滴	・MCHC 減少 ・A/G 比減少 ・甲状腺/上皮小体比重量増加 ・肝腫大 ・小葉中心性肝細胞肥大
100 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

表 23 雄ラットの甲状腺ろ胞細胞に認められた病変の発生頻度

投与群 (ppm)	0	100	500	5,000
検査動物数	60	60	60	60
ろ胞細胞肥大	4	6	9	10
ろ胞細胞嚢胞状過形成	3	6	8	10
ろ胞細胞腺腫	0	2	3	5↑
ろ胞細胞癌	0	0	0	2

↑: Fisher の直接確率法、 $p < 0.05$

(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、60、500 及び 4,000/2,000 ppm) 投与による 18 カ月間発がん性試験が実施された。なお、4,000 ppm 投与群では死亡率が増加したため、投与開始 20 週後より 2,000 ppm に濃度を下げた。死因は心筋脂肪沈着によると考えられた。

各投与群で認められた毒性所見は表 24、雄マウスの肝細胞腺腫及び腺癌の発生頻度は表 25 に示されている。

腫瘍性病変において、4,000/2,000 ppm 投与群の雄で肝細胞腺腫の発生頻度が増加した。その他の腫瘍性病変に検体投与の影響は認められなかった。

本試験において、4,000/2,000 ppm 投与群の雄でび慢性肝細胞脂肪沈着等、500 ppm 以上投与群の雌で肝絶対及び比重量増加が認められたため、無毒性量は雄で 500 ppm (62.8 mg/kg 体重/日)、雌で 60 ppm (9.0 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 2)

(肝細胞腫瘍の発生機序に関しては[14. (2)]、心筋病変の発生機序に関しては[14. (5)]を参照)

表 24 18 カ月間発がん性試験 (マウス) で認められた毒性所見 (非腫瘍性病変)

投与群	雄	雌
4,000/2,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・食餌効率低下 ・肝比重量増加 ・肝変色領域 (暗調化あるいは退色領域) 及び腫瘍 ・び慢性肝細胞脂肪沈着、び慢性肝細胞微細空胞、肝細胞の消失及び血液貯留 	<ul style="list-style-type: none"> ・消瘦、反応/活動不良、体温低下、立毛、脱毛、退色、閉眼、背湾/虚脱姿勢、呼吸困難 ・死亡例増加 ・体重増加抑制 ・子宮 (及び頸管) 絶対重量減少 ・脾斑点 ・胆嚢拡張減少 ・心筋細胞微細脂肪沈着及び心筋細胞微細空胞化 ・小葉周辺性/中心性肝細胞脂肪沈着 ・腎皮質尿細管上皮微細空胞及び皮質尿細管上皮脂肪沈着
500 ppm 以上	500 ppm 以下毒性所見なし	・肝絶対及び比重量増加
60 ppm		毒性所見なし

表 25 雄マウスの肝細胞腺腫及び腺癌の発生頻度

投与群 (ppm)	0	60	500	4,000/2,000
検査動物数	50	50	50	50
肝細胞腺腫	6	8	12	17 [†]
肝細胞腺癌	1	1	1	1

†: Fisher の直接確率法、 $p < 0.01$

12. 生殖発生毒性試験

(1) 2 世代繁殖試験 (ラット)

SD ラット (一群雌雄各 32 匹) を用いた混餌 (原体: 0、80、250 及び 800 ppm) 投与による 2 世代繁殖試験が実施された。

各投与群で認められた毒性所見は表 26 に示されている。

親動物においては、800 ppm 投与群の P 雄で甲状腺比重量増加、P 雌で甲状腺ならびに肝絶対及び比重量が増加し、検体投与に関連した変化と考えられたが、この変化に対応する肉眼学的変化は認められず、F₁ 世代においても明らかな影響は認められなかった。親動物ではその他の検査項目に検体投与の影響は認められなかった。

児動物において、F₁ 雄で生後 14~21 日の体重増加量が 80 及び 250 ppm 投与群においても有意に低かったが、80 ppm 投与群では用量相関性が認められず、また、80 及び 250 ppm 投与群とも生後 1~21 日の体重増加量に有意差はなく、F₁ では雌には認められず、F₂ では雌雄ともに認められなかったため、検体投与による影響ではないと考えられた。

本試験において、親動物では 800 ppm 投与群の雌雄で甲状腺比重量増加等

が、児動物では同群の雌雄で体重増加抑制等が認められたので、無毒性量は親動物及び児動物の雌雄とも 250 ppm (P 雄 : 18.0 mg/kg 体重/日、P 雌 : 19.9 mg/kg 体重/日、F₁ 雄 : 23.0 mg/kg 体重/日、F₁ 雌 : 24.1 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 2)

表 26 2 世代繁殖試験 (ラット) で認められた毒性所見

	投与群	親 : P、児 : F ₁		親 : F ₁ 、児 : F ₂	
		雄	雌	雄	雌
親動物	800 ppm	・甲状腺比重量増加	・肝ならびに甲状腺絶対及び比重量増加	毒性所見なし	毒性所見なし
	250 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし		
児動物	800 ppm	・体重増加抑制 ・肝比重量増加	・体重増加抑制 ・肝比重量増加	・体重増加抑制	・体重増加抑制 ・肝比重量増加
	250 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし	毒性所見なし	毒性所見なし

(2) 発生毒性試験 (ラット)

SD 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 1,000 mg/kg 体重/日、溶媒 : 0.01% Tween80 添加 5% アラビアゴム水溶液) 投与する発生毒性試験が実施された。

母動物においては、1,000 mg/kg 体重/日投与群で被毛汚れの発生頻度が増加した。300 mg/kg 体重/日以上投与群で流涎の発生頻度の増加ならびに肝絶対及び比重量増加が認められた。

胎児では、検体投与の影響は認められなかった。

本試験における無毒性量は、母動物で 100 mg/kg 体重/日、胎児で本試験の最高用量 1,000 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 2)

(3) 発生毒性試験 (ウサギ) ①

NZW ウサギ (一群雌 26 匹) の妊娠 6~28 日に強制経口 (原体 : 0、10、60 及び 300 mg/kg 体重/日、溶媒 : 0.01% Tween80 添加 5% アラビアゴム水溶液) 投与する発生毒性試験が実施された。

母動物において、300 mg/kg 体重/日投与群では、7 例流産し、このうち 4 例に初期及び後期の胎児吸収が認められた。

60 mg/kg 体重/日投与群では 1 例に全胎児の吸収が認められた。また、60 mg/kg 体重/日以上投与群において軟便や少量の便及び腹部脱毛が認められた。

10 mg/kg 体重/日以上投与群において、摂餌量、体重増加量及び妊娠子宮

重量で補正した体重増加量が対照群に比して有意に減少した。

その他の検査項目については、検体投与の影響は認められなかった。

胎児では、60 mg/kg 体重/日以上投与群の雌及び 300 mg/kg 体重/日投与群雄の胎児に低体重が認められた。300 mg/kg 体重/日投与群では外表異常、内臓異常、骨格異常及び骨化遅延の発生頻度が増加し、異常胎児数の合計が増加（対照群 1.1%に対して 4.7%）した。

60 mg/kg 体重/日投与群においても骨端/中手骨/指節骨の不完全化骨が増加した。

300 及び 60 mg/kg 体重/日投与群で認められた異常所見は、胎児の低体重とともに認められることから胎児の発育遅延が示唆され、母動物においても摂餌量及び体重増加量減少が認められることから、母動物への毒性による二次的な影響の可能性も考えられた。

本試験における無毒性量は、母動物で 10 mg/kg 体重/日未満、胎児で 10 mg/kg 体重/日であると考えられた。（参照 2）

（4）発生毒性試験（ウサギ）②

NZW ウサギ（一群雌 24 匹）の妊娠 6~28 日に強制経口（原体：0、5 及び 10 mg/kg 体重/日、溶媒：0.01% Tween80 添加 5% アラビアゴム水溶液）投与する発生毒性試験が実施された。

母動物及び胎児において、検体投与の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。なお、発生毒性試験①[12. (3)]においては、10 mg/kg 体重/日投与群においても母動物に体重増加抑制及び摂餌量減少が認められたが、本試験においては影響が認められず、再現性が確認できなかった。（参照 2）

13. 遺伝毒性試験

シフルフェナミド（原体）の細菌を用いた復帰突然変異試験、マウスリンパ腫細胞を用いた遺伝子突然変異試験、ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験、ラットを用いた不定期 DNA 合成（UDS）試験及びマウスを用いた小核試験が実施された。

試験結果は表 27 に示されているとおり、すべての試験において陰性であり、シフルフェナミドに遺伝毒性はないと考えられた。（参照 2）

表 27 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	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株) <i>Escherichia coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> /pkM101)	5~5,000 µg/7° レート (+/-S9) ¹⁾ 15~5,000 µg/7° レート (+/-S9) ¹⁾	陰性
	遺伝子突然変異試験	マウスリンパ腫細胞 (L5178Y)	12.5~200 µg/mL (+/-S9)	陰性
	染色体異常試験	ヒトリンパ球	3 時間処理 : 250~1,000 µg/mL (+/-S9) 21 時間処理 : 31.3~125 µg/mL (-S9) 250~1,000 µg/mL (+S9)	陰性
<i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	UDS 試験	SD ラット (肝細胞) (一群雄 4 匹)	600, 2,000 mg/kg 体重 (単回経口投与)	陰性
<i>in vivo</i>	小核試験	ICR マウス (骨髓細胞) (一群雌雄各 5 匹)	500, 1,000, 2,000 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) 代謝活性化系非存在下及び存在下で、試験 1 回目は 1,500 µg/7° レート以上、試験 2 回目は 5,000 µg/7° レートで生育阻害及び検体の析出を認めた。

シフルフェナミドの代謝物 B、C、F 及び G ならびに原体混在物の細菌を用いた復帰突然変異試験及びマウスを用いた小核試験が実施された。

結果は表 28 に示されている。原体混在物 I の細菌を用いた復帰突然変異試験では、代謝活性化系存在下 TA1537 株においてのみ陽性が認められたが、弱いものであった。他の菌株及びマウスを用いた小核試験では陰性であった。その他の代謝物及び原体混在物においてはすべて陰性であった。（参照 2）

表 28 遺伝毒性試験概要 (代謝物及び原体混在物)

被検物質	試験	対象	処理濃度・投与量	結果
代謝物 B	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> /pKM101 株)	50~5,000 µg/7 [°] V-ト (+/-S9) ¹⁾	陰性
代謝物 C			5~5,000 µg/7 [°] V-ト (+/-S9) ²⁾	陰性
代謝物 F			5~5,000 µg/7 [°] V-ト (+/-S9)	陰性
代謝物 G			10~5,000 µg/7 [°] V-ト (+/-S9) ³⁾	陰性
原体混在物 I	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> 株)	313~5,000 µg/7 [°] V-ト (+/-S9)	陽性 (TA1537 株、+S9)
	小核試験	ICR マウス (赤血球) (一群雄 5 匹)	250、500、1,000 mg/kg 体重 (単回経口投与) 投与 48、72 時間後	陰性
原体混在物 II	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> 株)	10~1,250 µg/7 [°] V-ト (-S9) ⁴⁾ 20~313 µg/7 [°] V-ト (+S9)	陰性
原体混在物 III			20~1,250 µg/7 [°] V-ト (-S9) ⁵⁾ 78~1,250 µg/7 [°] V-ト (+S9)	陰性
原体混在物 IV			10~1,250 µg/7 [°] V-ト (-S9) ³⁾ 39~1,250 µg/7 [°] V-ト (+S9) ³⁾	陰性
原体混在物 V			10~1,250 µg/7 [°] V-ト (-S9) ³⁾ 39~1,250 µg/7 [°] V-ト (+S9) ³⁾	陰性
原体混在物 VI			10~1,250 µg/7 [°] V-ト (-S9) ³⁾ 39~5,000 µg/7 [°] V-ト (+S9) ³⁾	陰性
原体混在物 VII			10~313 µg/7 [°] V-ト (-S9) ⁶⁾ 78~1,250 µg/7 [°] V-ト (+S9)	陰性
原体混在物 VIII			10~5,000 µg/7 [°] V-ト (-S9) ⁷⁾ 156~5,000 µg/7 [°] V-ト (+S9) ⁷⁾	陰性

注) +/-S9 : 代謝活性化系存在下及び非存在下

- 1) 代謝活性化系非存在下及び存在下で、5,000 µg/7[°] V-トで検体の析出を認めた。
- 2) 代謝活性化系非存在下及び存在下で、菌株によって 1,500 µg/7[°] V-ト上で菌の生育阻害を認めた。
- 3) 代謝活性化系非存在下及び存在下で、菌株によって 156 µg/7[°] V-ト以上で菌の生育阻害を認めた。
- 4) 代謝活性化系非存在下で、菌株によって 313 µg/7[°] V-ト以上で菌の生育阻害を認めた。
- 5) 代謝活性化系非存在下で、菌株によって 625 µg/7[°] V-ト以上で菌の生育阻害を認めた。
- 6) 代謝活性化系非存在下で、菌株によって 156 µg/7[°] V-ト以上で菌の生育阻害を認めた。
- 7) 代謝活性化系非存在下及び存在下で、菌株によって 313 µg/7[°] V-ト以上で菌の生育阻害を認めた。

1.4. その他の試験

(1) イヌの脳に認められた空胞化に関する検討

イヌを用いた 90 日間亜急性毒性試験 [10. (3)] において、脳に空胞変性 (ミエリン水腫) が認められた。

この変化について、代表的な GABA トランスアミナーゼ (GABA-T) 阻害剤 (ビガバトリン)、ATPase 阻害 (脱共役) 剤 (ヘキサクロロフェン) 及びモノアミンオキシダーゼ (MAO) 阻害剤 (イソニアジド) による病変と比較検討した。その結果、GABA-T 阻害剤であるビガバトリンと多くの類似性が認められた。

ビガバトリンではミエリン水腫に明瞭な回復性があり、イヌの 3 及び 6 カ月間投与で認められた水腫は、1 年間の慢性投与でも病変に質的变化はなく、脱髄には至らないと報告されている。シフルフェナミド高用量 (1,500 ppm) 投与のみに認められた水腫は、形態的にビガバトリンの水腫と同様であった。したがって、シフルフェナミドの長期投与により脱髄が生じる可能性は低いものと考えられた。また、電子顕微鏡学的観察により、神経細胞や軸索への障害が認められないことから、神経機能に影響がなく、症状が認められなかったものと考えられた。(参照 2)

① 雌ビーグル犬を用いた 13 週間亜急性毒性試験及び 13 週間回復性試験

ビーグル犬 (雌、対照群 4 匹、150 ppm 投与群 3 匹、1,500 ppm 投与群 6 匹) を用いた混餌 (原体: 0、150 及び 1,500 ppm: 平均検体摂取量は表 29 を参照) 投与による 13 週間亜急性毒性試験が実施された。また、対照群 2 匹及び 1,500 ppm 投与群 3 匹は 13 週間投与後 13 週間の回復群に割り当てた。

表 29 雌ビーグル犬を用いた 13 週間亜急性毒性試験及び 13 週間回復試験の平均検体摂取量

投与群	150 ppm	1,500 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	6.3	65.1

一般状態、死亡率、体重、摂餌量、神経学的検査 (脳神経反応、体節脊髄反射、姿勢反応、一般観察) 及び心電図検査に検体投与の影響は認められなかった。脳の組織について実施した病理組織学的検査において、1,500 ppm 投与群では 3 匹中 2 匹の脳及び視床に空胞化が認められた。同じ病変が 13 週間の回復群の 3 匹中 3 匹に認められたが、病変の程度はより軽度であった。脳病変の認められた動物について実施した電子顕微鏡検査では、病変のほとんどがミエリン膜の薄化を伴うミエリン水腫あるいはミエリン膜上の無数の小さな水腫であることが確認された。

以上の結果から、イヌの脳に認められた変化は神経症状を発生するものではなく、13週間の回復期間後に回復傾向を示すと考えられた。(参照2)

② 雌ビーグル犬を用いた13週間亜急性毒性試験及び26週間回復性試験

ビーグル犬(雌、対照群4匹、150 ppm 投与群3匹、1,500 ppm 投与群6匹)を用いた混餌(原体:0、150及び1,500 ppm:平均検体摂取量は表30を参照)投与による13週間亜急性毒性試験が実施された。13週間投与群の動物は①の試験と共通の動物を使用した。また、対照群2匹及び1,500 ppm 投与群3匹は13週間投与後26週間の回復群に割り当てた。

表30 雌ビーグル犬を用いた13週間亜急性毒性試験及び26週間回復試験の平均検体摂取量

投与群	150 ppm	1,500 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	6.3	64.5

一般状態、死亡率、体重、摂餌量、神経学的検査(脳神経反応、体節脊髄反射、姿勢反応、一般観察)及び心電図検査に検体投与の影響は認められなかった。脳の組織について実施した病理組織学的検査において、1,500 ppm 投与群では3匹中2匹の脳及び視床に空胞化が認められた。しかし、26週間回復期間後の動物の脳及び視床に病変は認められなかった。

以上の結果から、イヌの脳に認められた変化は神経症状を発生するものではなく、26週間の回復期間後に回復することが示唆された。(参照2)

③ イヌ GABA-T に対する影響

イヌの脳の GABA-T に対する影響を *in vitro* で検討した。

イヌの脳(間脳:乳頭体のレベルで厚さ1 cmの横断切片)からミトコンドリア分画を採取し、超音波処理、透析等の操作を経てイヌ GABA-T 酵素液とした。この酵素液とコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素、 α -ケトグルタル酸、NADP⁺、50 mM トリス緩衝液、被験物質(シフルフェナミド:0.1及び0.3 mM)、対照物質(アミノオキシ酢酸)または溶媒、GABAを37°Cで1分間反応させ、生成した NADPH をモニターすることによって、阻害率を算出した。

その結果、シフルフェナミドは0.3 mMにおいても GABA-T 阻害は認められなかった。(参照2)

④ ミトコンドリア機能に対する影響(脱共役作用)

ラット肝臓ミトコンドリアを用いて、酸素電極法により酸素消費パターンを比較して、ミトコンドリア機能に対する影響(脱共役作用)を検討した。

ラットを放血と殺後肝臓をホモジナイズし呼吸活性のあるミトコンドリアを採取した。このミトコンドリアと基質のコハク酸を入れた酸素電極反応容器内に、DMSO に溶解した被験物質（最終濃度： 1.0×10^{-5} 及び 1.0×10^{-4} M）または対照物質 2,4-ジニトロフェノール（最終濃度： 1.0×10^{-5} 及び 1.0×10^{-4} M）を添加し、オキシグラフを描画した。

その結果、シフルフェナミドを添加しても、オキシグラフの傾きは対照の 85% であり、脱共役作用は認められなかった。（参照 2）

⑤ イヌ脳の MAO に対する影響

イヌの脳の MAO を測定することにより、MAO に対する影響を検討した。

イヌの脳（間脳：乳頭体のレベルで厚さ 1 cm の横断切片）からミトコンドリア分画を採取し、酵素液、基質のキヌラミン、被験物質（シフルフェナミド： 0.01 、 0.1 、 1 mM）、対照物質（リン酸イプロニアジド）あるいは DMSO を添加し 37°C 、30 分でインキュベートした。その後、2M 水酸化ナトリウムを加え生成した 4-ヒドロキシキノリンを測定した。

その結果、シフルフェナミド 1 mM においても MAO の阻害は認められなかった。（参照 2）

(2) マウスの肝細胞腫瘍発生に関する検討

マウスを用いた 18 カ月間発がん性試験 [11. (3)] において、雄の高用量群で肝細胞腺腫が増加した。この発生増加についてその機序を検討するために種々の試験が実施された（試験概要は表 31 参照）。

一連の遺伝毒性試験 [13.] の結果が陰性であることから、シフルフェナミドにイニシエーション作用はないと判断された。発がんメカニズムを検討するため、肝薬物酵素誘導試験及び細胞増殖活性の検討試験を実施した。その結果、高用量投与により、肝臓の酵素誘導及び肝細胞の増殖活性が認められた。したがって、マウスで認められた肝細胞腺腫の増加は、シフルフェナミドによるプロモーション作用によるものと考えられた。腫瘍発生増加が雄のみで、雌には認められなかったのは、試験に用いた系統のマウスの肝腫瘍の自然発生率が雄で高く、雌で低いため、プロモーション作用が同等に働いても結果的に雄のみに肝腫瘍が増加したと考えられた。なお、ラットを用いた中期肝発がん性試験が実施され、シフルフェナミドはラットの肝細胞に対してもプロモーション作用を示す結果が得られたが、ラットを用いた 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験 [11. (2)] においても肝腫瘍が発生しなかったことから、その作用は弱いと考えられた。（参照 2）

表 31 マウスの肝細胞腫瘍発生に関する検討試験概要

試験の種類 (試験期間)	動物種	動物数/ 群	投与量 (投与経路)	無作用量	結果概要
肝薬物酵素誘 導試験 (2週間)	ICR マウス	雄 5	0、60、2,000 ppm (混餌)	60 ppm (9.1 mg/kg 体重/日)	P450 量の有意な増加
肝細胞増殖及 び薬物酵素誘 導試験 (3週間)	ICR マウス	雌雄 各 5	0、60、2,000、 4,000 ppm (混餌)	60 ppm (雄: 10.0 mg/kg 体重/日、 雌: 13.5 mg/kg 体重/日)	2,000 ppm 以上投与群の雄で 肝絶対重量増加。 4,000 ppm 投与群の雌雄で肝 比重量増加、小葉中心性肝細胞 肥大、PCNA 標識率増加。 2,000 ppm 以上投与群の雌雄 で P450 量増加。
【参考】 中期肝発が ん性試験 (2カ月間)	Fischer ラット	雄 10~15	0、100、5,000 ppm (混餌)	100 ppm	5,000 ppm 投与群で肝絶対及 び比重量増加、GST-P 陽性細 胞巢(数)の増加。発がんプロ モーション作用を有する。

(3) ラットの甲状腺腫瘍発生及び精巣間細胞過形成に関する検討

ラットを用いた 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験 [11. (2)] において、甲状腺のろ胞上皮細胞肥大及び腫瘍の発生頻度が増加した。また、ラットを用いた 90 日間亜急性毒性試験 [10. (1)] において精巣間細胞過形成が認められた。これらの発生機序を解明するために、以下の試験を実施した (試験概要は表 32 参照)。

甲状腺ろ胞細胞腺腫の発生機序に関して：一連の遺伝毒性試験が陰性であることから、シフルフェナミドにイニシエーション作用はないと判断された。シフルフェナミド投与により肝臓の UDPGT 活性の増加と、それに伴う甲状腺ホルモンの代謝及び排泄の亢進 (T_3 及び T_4 の減少) ならびにネガティブフィードバックによると考えられる TSH の上昇及びろ胞上皮細胞肥大といった一連の変化が認められた。また、シフルフェナミドはブタ甲状腺ペルオキシダーゼ活性に対する阻害を示さず、ラットにおいても甲状腺ホルモンの合成を阻害する可能性が低いこと、ラットの甲状腺に対する DNA 損傷性も陰性であったことから、ラットで認められた甲状腺腺腫の発生は、検体の高用量投与における肝薬物代謝酵素誘導による二次的変化と判断された。

精巣間細胞過形成に関して：5,000 及び 10,800 ppm 投与群では、肝細胞肥大を伴ってステロイドホルモンの代謝に関与するヒドロキシステロイドスルフォトランスフェラーゼ (HST) の活性増加が認められた。10,800 ppm 投与群では血中黄体形成ホルモン (LH) 濃度が増加し、精巣間細胞の肥大が認められた。血中テストステロン及び精巣中の P450 量に変化は認められなかった。これらのことから、血中 LH 濃度増加及び精巣間細胞肥大は投与

により誘導された肝臓の薬物代謝酵素によるテストステロンの代謝及び排泄亢進に対するネガティブフィードバックの結果と考えられた。ラットを用いた2年間慢性毒性/発がん性併合試験[11. (2)]で精巣に組織学的変化は認められなかったことから、ラットを用いた90日間亜急性毒性試験[10. (1)]において認められた精巣間細胞過形成は、高用量投与条件下における肝薬物代謝酵素誘導による二次的変化と判断された。(参照2)

表 32 ラットの甲状腺腫瘍発生及び精巣間細胞過形成に関する検討試験概要

試験の種類 (試験期間)	動物種/ 対象	動物数/ 群	投与量(投与経路) または処理濃度	無作用量	結果概要
雄ラットの甲状腺及び生殖腺に及ぼす影響検討試験 (3カ月間)	SD ラット	雄 試験群:5 予備群:5	0、100、5,000、 10,800 ppm (混餌)	100 ppm	5,000 ppm 以上投与群で T ₃ 、T ₄ の減少、TSH 及び HST 増加、肝細胞肥大、甲状腺ろ胞細胞肥大。 10,800 ppm 投与群で LH 及び UDPGT 増加、精巣間細胞肥大。
ブタ甲状腺ペルオキシダーゼ活性に及ぼす影響検討試験	ブタ 甲状腺 ミクロ ソーム	—	0、10 ⁻⁵ 、5×10 ⁻⁵ 、 10 ⁻⁴ 、5×10 ⁻⁴ 、 10 ⁻³ M (<i>in vitro</i>)	10 ⁻³ M	ブタ甲状腺ペルオキシダーゼを阻害しない。
コメットアッセイ (DNA 損傷性の 検討)	SD ラット 甲状腺	雄 3	0、2,000 mg/kg 体重 (単回強制経口)	2,000 mg/kg 体 重	陰性

—: 該当なし

(4) シフルフェナミドを投与したイヌで増加した血清 ALP の同定と活性測定

シフルフェナミドを投与したイヌ(90日間亜急性毒性試験[10. (3)]及び1年間慢性毒性試験[11. (1)])において血清 ALP の増加が認められたため、ALP の由来を検討するために実施した。

ビーグル犬(一群雄3匹)に14日間混餌[原体:0及び4,000 ppm(112.3 mg/kg 体重/日)]投与し、体重及び摂餌量測定、血清総 ALP 活性の測定と血清 ALP アイソザイムの分析を行った。

体重及び摂餌量に有意な変化は認められなかった。

血清総 ALP 活性値に検体投与の影響は認められなかったが、投与群の総増加量では対照群に比して有意な増加が認められた。血清 ALP アイソザイムの分析において、投与群の肝由来 ALP(非副腎皮質ホルモン誘導型)活性値に有意な増加が認められた。骨由来 ALP や肝由来の ALP(副腎皮質ホルモン誘導型)活性値に有意な変化は認められず、骨及び肝以外に由来する ALP は検出されなかった。

本試験において、シフルフェナミドを投与したイヌで増加した血清 ALP は、肝由来の非副腎皮質ホルモン誘導型 ALP の増加によることが示唆され

た。

また、この ALP の増加は、特にイヌを用いた 90 日間亜急性毒性試験で明瞭に認められたように、肝臓の脂肪沈着と関連があると考えられた。(参照 2)

(5) カルニチン依存性パルミトイル基転移酵素に対する影響

ラットの 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験[11. (2)]及びマウスの発がん性試験[11. (3)]における心筋病変の発生機序解明の一環として、カルニチン依存性パルミトイル基転移酵素 (CPT) への影響の有無を *in vitro* で検討した。

雄ラット及び雄マウスの心臓からミトコンドリア分画を採取し酵素液とした。

本試験において、シフルフェナミドは 1 mM の濃度でラット及びマウスの CPT を約 50% 阻害した。

CPT は長鎖脂肪酸をミトコンドリアに運搬する酵素であり、この酵素の阻害は心筋における代謝全般 (脂肪酸酸化、クエン酸回路、呼吸鎖等) に抑制的な影響を及ぼすと考えられている。また、CPT 阻害を介した脂肪酸酸化阻害によって心筋の脂肪沈着が起こることが報告されていることから、本剤投与において認められた心筋脂肪沈着及び空胞は、CPT 阻害による長鎖脂肪酸利用低下に関連した変化と考えられた。(参照 2)

(6) シフルフェナミドのエストロジェン様作用に関する検討

シフルフェナミドのエストロジェン様作用に関して検討するために、以下の試験を実施した (表 33 参照)。その結果、いずれの試験においても、シフルフェナミドにエストロジェン様作用は認められなかった。(参照 2)

表 33 シフルフェナミドのエストロジェン様作用に関する検討試験概要

試験の種類	試験系/動物種	動物数/群	投与量	結果概要
エストロジェン様作用性試験	ヒト乳癌由来細胞 (MCF-7)	—	1 ng/mL ~ 10 µg/mL (<i>in vitro</i>)	エストロジェン様作用なし (細胞増殖なし)
卵巣摘出ラットに対する影響 (4 日間)	ラット	雌 10	0、10、100、 1,000 mg/kg 体重 (経口)	エストロジェン様作用なし (子宮重量に影響なし)
遺伝子組換え酵母を用いた試験	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> hER*	—	50 µg/L ~ 100 mg/L (<i>in vitro</i>)	エストロジェン様作用なし

*: ヒトのエストロジェン受容体遺伝子を導入した組換え酵母

—: 該当なし

(7) ラットの尿量減少の作用機序に関する検討

ラットの一般薬理試験において、シフルフェナミド投与により、150 mg/kg 体重以上の用量で尿量減少が認められたので、その作用機序を検討する目的で以下の試験を実施した。その結果、シフルフェナミド投与により腎のシクロオキシゲナーゼ (COX) I 及び COX II の阻害により、プロスタグランジンの産生が低下したことで、腎の血流量が減少したために生じたと考えられた。(参照 2)

① ラット腎血流量に対する影響試験

麻酔下で腎動脈に電磁血流計プローブをセットした SD ラット (一群雄 3 匹) の十二指腸内にシフルフェナミド (原体: 0、50、150 及び 1,000 mg/kg 体重) を針付シリンジで投与し、腎血流量及び尿量を測定した。

150 及び 1,000 mg/kg 体重投与群において、用量相関性をもって腎血流量が減少した。血流量の減少は投与 70 分後まで続き、測定終了の投与 4 時間後までほぼ横ばいで推移した。尿量は投与 1~2 時間後で減少し、その後は回復した。投与 120 分以降において腎血流量の回復が認められないにもかかわらず、尿量が回復したことについては、投与後腎の血流量が減少し、これにより一旦尿量が減少するが、この後血行性のフィードバックにより抗利尿ホルモンが減少し、そのため尿細管の再吸収が抑制されて尿量が回復するものと推察された。以上のことから、シフルフェナミド投与による尿量減少は腎血流量減少により生じ、その無影響量は 50 mg/kg 体重であると考えられた。(参照 2)

② COX 活性に対する影響

シフルフェナミド (原体: 0、0.2、2 及び 20 μ M) を COX I または COX II に添加することにより、COX I あるいは COX II 活性に対する影響を検討した。

その結果、20 μ M の濃度で COX I 及び COX II に対して約 39~47% の阻害作用を示した。

20 μ M の濃度は動物代謝試験において 200 mg/kg 体重を経口投与した時の 1~2 時間後の血漿中濃度とほぼ同等である。したがって、150 mg/kg 体重単回投与による腎血流量減少は吸収されたシフルフェナミドが腎に移行し、投与 1~2 時間後に 20 μ M 前後の血中濃度に達した段階で COX I 及び II を抑制することにより引き起こされたものと考えられた。(参照 2)