

(6) 21 日間亜急性経皮毒性試験 (ラット)

SD ラット (一群雌雄各 8 匹) を用いた経皮 (原体: 0、10、100 及び 1,000 mg/kg 体重/日、8 時間/日、7 日/週) 投与による 21 日間亜急性経皮毒性試験が実施された。

1,000 mg/kg 体重/日投与群の雌 1 例で、投与部分の皮膚の変化 (軽微な紅斑、落屑) が認められた。

1,000 mg/kg 体重/日投与群の雌雄で肝比重量増加が、同群の雌で肝絶対重量増加が認められた。

本試験における無毒性量は、雌雄とも 100 mg/kg 体重/日であると考えられた。

(参照 2~5、7)

(7) 28 日間亜急性毒性試験 (代謝物 C、ラット)

SD ラット (一群雌雄各 10 匹) を用いた混餌 (代謝物 C: 0、150、500、5,000 及び 15,000 ppm) 投与による 28 日間亜急性毒性試験が実施された。

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 15,000 ppm (雄: 1,120 mg/kg 体重/日、雌: 1,270 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 2~5)

1.2. 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 5 匹) を用いた混餌 (原体: 0、240、1,200、12,000 及び 30,000 ppm) 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 16 に示されている。

30,000 ppm 投与群の雄は、体重減少と重篤な貧血症状を示し、全身状態が悪化したため、試験 26 週で全例切迫と殺された。

本試験において、12,000 ppm 以上投与群の雌雄で小葉中心性肝細胞壊死等が認められたので、無毒性量は雌雄とも 1,200 ppm (雄: 45.3 mg/kg 体重/日、雌: 44.8 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 2~5、7)

表 16 1年間慢性毒性試験（イヌ）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
30,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・切迫と殺（全例、26週） ・RBC、Hb、Ht 減少、PLT 増加 	
12,000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・歯茎の蒼白化 ・TP、Alb、A/G 比、カルシウム、T.Bil、Ure 減少、ALP、ALT 増加 ・肝絶対重量増加 ・肝表面脆弱化 ・甲状腺暗色化 ・胆嚢多発性ゼラチン状変化 ・小葉中心性肝細胞腫脹 ・肝細胞染色性異常 ・小葉中心性肝細胞壊死 ・小葉中心性肝細胞線維化 ・肝細胞空胞化 ・小葉中心性グリコーゲン消失 ・甲状腺ろ胞上皮肥大 	<ul style="list-style-type: none"> ・歯茎の蒼白化（12,000 ppm 投与群 1例のみ） ・体重増加抑制 ・RBC、Hb、Ht 減少、PLT 増加 ・TP、Alb、A/G 比、Ure、カルシウム減少、ALP、ALT 増加 ・肝絶対重量増加 ・肝表面脆弱化 ・甲状腺暗色化 ・胆嚢多発性ゼラチン状変化 ・小葉中心性肝細胞腫脹 ・肝細胞染色性異常 ・小葉中心性肝細胞壊死 ・小葉中心性肝細胞線維化 ・肝細胞空胞化 ・小葉中心性グリコーゲン消失 ・甲状腺ろ胞上皮肥大
1,200 ppm 以下	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）

SD ラット（本試験群：一群雌雄各 75 匹、回復試験群：一群雌雄各 20 匹）を用いた混餌（原体：0、0.5、2、20 及び 500 mg/kg 体重/日）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。回復試験群のうち、各群 10 匹は 52 週でと殺され、各群 10 匹は 52 週後 8 週間の回復期間を置いた。

生存率は、最高用量群で対照群より高い値となった（対照群：45～47%、500 mg/kg 体重/日投与群：61～64%）。

各投与群で認められた毒性所見（非腫瘍性病変）は表 17 に、腫瘍の発生頻度は表 18 に示されている。

本試験でみられた多くの変化は、回復期間終了時に対照群とほぼ同等に回復した。

500 mg/kg 体重/日投与群の雌雄で肝細胞腺腫及び肝細胞癌の発生増加が、同群の雄で甲状腺ろ胞細胞腺腫の発生増加が認められた。

本試験において、2 mg/kg 体重/日以上投与群の雄で角膜炎が、20 mg/kg 体重/日投与群の雌で小葉中心性肝細胞肥大等が認められたので、無毒性量は雄で 0.5 mg/kg 体重/日、雌で 2 mg/kg 体重/日であると考えられた。（参照 5、7）

（肝腫瘍の発生機序に関しては[15. (8)]、甲状腺腫瘍の発生機序に関しては[15. (10)]を参照）

表 17 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
500 mg/kg 体重/日	<ul style="list-style-type: none"> ・ 消瘦、異常歩行、後肢運動制限 (limited use of limbs)、眼球混濁 ・ 体重増加抑制、食餌効率減少 ・ 肝腫瘍、肝巣状嚢胞状変性 ・ 角膜実質血管新生 ・ 角膜上皮肥厚化 ・ 角膜上皮表層剥離 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 消瘦、異常歩行、後肢運動制限 (limited use of limbs)、眼球混濁 ・ 体重増加抑制、摂餌量及び食餌効率減少 ・ 肝重量増加 ・ 肝腫瘍 ・ 小葉中間帯泡沫状肝細胞 ・ 変異肝細胞巣 (明細胞、好塩基性) ・ 肝細胞色素沈着 ・ 坐骨神経軸索及びミエリン変性 ・ 大腿筋巣状変性及び炎症 ・ コレステロール肉芽腫 (神経、筋組織)
20 mg/kg 体重/日以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ 肝及び甲状腺重量増加 ・ 角膜混濁 ・ 肝腫大 ・ 甲状腺腫大、暗色化 ・ 小葉中心性肝細胞肥大 ・ 小葉中間帯泡沫状肝細胞 ・ 甲状腺ろ胞上皮の嚢胞状過形成 ・ 坐骨神経軸索及びミエリン変性 ・ 大腿筋巣状変性及び炎症 ・ コレステロール肉芽腫 (神経、筋組織) 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 小葉中心性肝細胞肥大
2 mg/kg 体重/日以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ 角膜炎 	2 mg/kg 体重/日以下 毒性所見なし
0.5 mg/kg 体重/日	毒性所見なし	

表 18 2年間慢性毒性/発がん性併合試験（ラット）で認められた腫瘍性病変

性別	雄					雌				
	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
検査動物数	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
投与群 (mg/kg 体重/日)	0	0.5	2	20	500	0	0.5	2	20	500
肝細胞腺腫	2	3	5	6	14*	4	2	1	0	29*
肝細胞癌	5	1	4	2	17*	0	0	1	0	24*
甲状腺ろ胞細胞腺腫	3	1	5	7	15*	1	0	1	4	3

* : 統計学的有意差あり (解析方法不明)

(3) 18 カ月間発がん性試験 (マウス)

ICR マウス (一群雌雄各 52 匹) を用いた混餌 (原体: 0、25、500 及び 7,000 ppm) 投与による 18 カ月間発がん性試験が実施された。

死亡率に検体投与の影響は認められなかった。各投与群で認められた毒性所見 (非腫瘍性病変) は表 19 に、腫瘍性病変は表 20 に示されている。

7,000 ppm 投与群の雌雄で肝細胞腺腫が、同群の雄で肝細胞癌の発生増加が認められた。

本試験において、500 ppm 以上投与群の雌雄で体重増加抑制等が認められたので、無毒性量は雌雄とも 25 ppm (雄: 3.2 mg/kg 体重/日、雌: 4.0 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 2~5)

(肝腫瘍の発生機序に関しては[15. (9)]を参照)

表 19 18 カ月間発がん性試験 (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"> ・食餌効率減少 ・肝絶対重量増加 ・肝腫瘍 ・肝細胞色素沈着 ・クッパー細胞色素沈着 ・変異肝細胞巣 (好塩基性) ・肝細胞倍数体増加 ・脾髄外造血 	<ul style="list-style-type: none"> ・食餌効率減少 ・肝絶対重量増加 ・肝腫瘍 ・小葉中心性肝細胞肥大 ・肝細胞壊死 ・脾髄外造血
500 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・肝比重量増加 ・肝細胞壊死 	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・肝比重量増加
25 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

表 20 18 カ月間発がん性試験 (マウス) で認められた腫瘍性病変 (発生頻度、%)

性別		雄				雌			
投与群 (ppm)		0	25	500	7,000	0	25	500	7,000
途中死亡、切迫殺	肝細胞腺腫	7	5	7	44*	0	0	0	33
	肝細胞癌	7	14	20	25	0	0	0	17
中間と殺 (52 週)	肝細胞腺腫	17	9	0	58*	0	0	0	0
	肝細胞癌	0	0	8	0	0	0	0	0
最終と殺	肝細胞腺腫	21	29	21	56*	0	3	3	28*
	肝細胞癌	8	6	14	36*	0	0	0	7

*: 統計学的有意差あり (解析方法不明)

13. 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 30 匹）を用いた混餌（原体：0、0.5、2、200 及び 500 mg/kg 体重/日）投与による 2 世代繁殖試験が実施された。

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 21 に示されている。

本試験において、親動物では 200 mg/kg 体重/日以上投与群の雌雄で小葉中心性肝細胞肥大等が、児動物では 200 mg/kg 体重/日以上投与群で 4 日生存率低下等が認められたので、無毒性量は親動物及び児動物で 2 mg/kg 体重/日（実際の検体摂取量、雄：1.76 mg/kg 体重/日、雌：1.79 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 2～5、7）

表 21 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	500 mg/kg 体重/日	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制、摂餌量減少 ・斑状肝 ・肝嚢胞状変性 	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制、摂餌量減少 ・斑状肝 	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制、摂餌量減少 ・角膜炎 ・斑状肝 ・肝細胞空胞化 	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制、摂餌量減少 ・角膜炎 ・斑状肝
	20 mg/kg 体重/日以上	<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 ・肝細胞空胞化 	<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 	<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
	2 mg/kg 体重/日以下	毒性所見なし	毒性所見なし	毒性所見なし	毒性所見なし
児動物	500 mg/kg 体重/日	<ul style="list-style-type: none"> ・死産児増加 ・眼球混濁、暗色化 ・低体重 ・胃内に乳汁を認めない ・腎乳頭発達遅延 		<ul style="list-style-type: none"> ・角膜炎 ・虹彩炎、網膜出血 ・低体重 ・生後 4 日生存率低下 ・胃内に乳汁を認めない ・腎乳頭発達遅延 	
	20 mg/kg 体重/日以上	・4 日生存率低下		・死産児増加	
	2 mg/kg 体重/日以下	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 25 匹）の妊娠 6～15 日に強制経口（原体：0、10、100 及び 500 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。

母動物では、500 mg/kg 体重/日投与群で流産、体重増加抑制及び摂餌量減少が認められた。

胎児では、500 mg/kg 体重/日投与群で皮下浮腫、骨化遅延及び骨格変異（腰肋等）が、100 mg/kg 体重/日以上投与群で低体重が認められた。

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 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 2～5、7）

（3）発生毒性試験（ウサギ）

NZW ウサギ（一群雌 25 匹）の妊娠 6～19 日に強制経口（原体：0、5、20 及び 100 mg/kg 体重/日、溶媒：1%MC 水溶液）投与して発生毒性試験が実施された。

母動物では、対照群及び 20 mg/kg 体重/日投与群で 1 例ずつ死亡が認められた。また、100 mg/kg 体重/日投与群の 1 例で流産が認められた。投与群で認められた死亡は、いずれも検体投与との関連はないものと考えられた。100 mg/kg 体重/日投与群で体重増加抑制、摂餌量及び糞便の減少、着床後胚損失並びに後期胚吸収が認められた。

胎児では、20 mg/kg 体重/日以上投与群で骨格変異（腰肋等）及び骨化遅延が、5 mg/kg 体重/日以上投与群で第 27 前仙椎骨が認められた。

本試験における無毒性量は、母動物で 20 mg/kg 体重/日、胎児で 5 mg/kg 体重/日未満であると考えられた。（参照 2～4）

1.4. 遺伝毒性試験

イソキサフルトールの細菌を用いた復帰突然変異試験、マウスリンパ腫細胞及びチャイニーズハムスター V79 細胞を用いた前進突然変異試験及びヒトリンパ球を用いた染色体異常試験、マウスを用いた小核試験が実施された。

結果は表 22 に示されているとおり、すべて陰性であったので、イソキサフルトールに遺伝毒性はないものと考えられた。（参照 2～5、7）

表 22 遺伝毒性試験結果概要（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, TA1538 株)	25～1,000 µg/7 ^h 経口 (+/-S9)	陰性
	前進突然変異試験	TK+/-マウスリンパ腫細胞	37.5～600 µg/mL (+/-S9)	陰性
	遺伝子突然変異試験	チャイニーズハムスター V79 細胞 (HGPRT 遺伝子)	6.25～100 µg/mL (+/-S9)	陰性
	染色体異常試験	ヒトリンパ球	75～600 µg/mL (+/-S9)	陰性
ヒトリンパ球		75～500 µg/mL (+/-S9)	陰性	
<i>in vivo</i>	小核試験	ICR マウス（骨髄細胞）（一群雄 5 匹）	200, 1,000, 5,000 mg/kg 体重（単回強制経口投与）	陰性

注) +/-S9：代謝活性化系存在下及び非存在下

代謝物 B 及び C の細菌を用いた復帰突然変異試験、C のチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 由来細胞を用いた遺伝子突然変異試験及び染色体異常試験並びにマウスを用いた小核試験が実施された。結果は表 23 に示されており、いずれも陰性であったので、代謝物 B 及び C に遺伝毒性はないものと考えられた。(参照 2~5、7)

表 23 遺伝毒性試験概要 (代謝物)

被験物質	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, TA102 TA1535, TA1537 株)	100~5,000 µg/7 ^h レット (+/-S9)	陰性
代謝物 C	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株)	100~5,000 µg/7 ^h レット (+/-S9)	陰性
	遺伝子突然変異試験	チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 由来培養細胞株 (HGPRT 遺伝子)	①338~2,700 µg/mL (+S9) 84.5~2,700 µg/mL (-S9) ②675~2,700 µg/mL (+S9) 84.5~2,700 µg/mL (-S9)	陰性
	染色体異常試験	チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 由来培養細胞株	①931~2,710 µg/mL (+/-S9) ②924~2,710 µg/mL (+/-S9)	陰性
	小核試験	マウス (雄: 系統、匹数不明) (骨髄細胞)	500, 1,000, 2,000 mg/kg 体重 (単回強制経口投与)	陰性

注) +/-S9: 代謝活性化系存在下及び非存在下

15. その他の試験

(1) イソキサフルトール投与後のチロシン代謝種間比較試験

SD ラット及び ICR マウス (いずれも一群雄 5 匹) に、イソキサフルトールを単回強制経口 (原体: 10 mg/kg 体重、溶媒: 0.75%MC 水溶液) 投与し、1 時間後に ¹⁴C で標識したチロシン (標識位置不明: 以下「¹⁴C-チロシン」という。) を強制経口投与して、チロシン代謝種間比較試験が実施された。

放射能の主要排泄経路は尿及び呼気中であつた。投与後 48 時間の尿中排泄率はラット及びマウスでそれぞれ 15.7 及び 46.8%TAR、呼気中の ¹⁴CO₂ としての排泄率はラット及びマウスでそれぞれ 17.0 及び 6.4%TAR であつた。

尿中には、ラット及びマウスとも 9~10 種類の代謝物が検出された。主要代謝物は両種とも HPLA 及び HPAA であり、また、NAT 及び HBA も検出された。ラット尿中にはチロシンも存在した。HPLA、HPAA はラット尿中よりマウス尿中に多く存在したが、これは尿中排泄率がラットよりマウスで高いことが原因である可能性も考えられた。NAT はマウスよりラット尿中に、HBA はラットよりマウス尿中に多く存在した。抱合体の形で存在する代謝物も検出されたが、HPLA 及び HPAA の抱合体ではなかつた。

本試験より、イソキサフルトール投与後のチロシン排泄に種差があることが示さ

れ、そこから、イソキサフルトールによってチロシン代謝経路が阻害された場合の代替的な代謝経路の利用性に種差があることが示唆された。(参照 4、5)

(2) 血中チロシン濃度と眼毒性の動物種差

SD ラット、Brown Norway (BN) ラット及び ICR マウス (一群雌雄各 5 匹) に、チロシンを 14 日間混餌 (0、2 及び 5%) 投与して、眼科学的検査及び血中チロシン濃度測定を実施し、チロシン血症における種差及び性差について検討された。なお、血中チロシン濃度については、ラット雄は全投与群、マウス雄は 0 及び 5% 投与群、雌は SD ラットの 0 及び 5% 投与群のみを分析対象とした。

5%チロシン投与群では、SD ラットの雄全例に浮腫や血管新生を伴う角膜混濁が観察され、BN ラットの雄 1 例に軽度の角膜混濁が認められた。両系統ラットの雌及びマウスの雌雄には、角膜の変化は観察されなかった。

血漿中チロシン濃度については、表 24 に示されている。SD ラットでは 2 及び 5%投与群でそれぞれ約 3 及び 55 倍の増加がみられたが、雄マウスでは血中チロシン濃度の増加は認められなかった。

以上のことから、血中チロシン濃度と角膜混濁の出現頻度に相関があること、また、その程度に動物種差、系統差、性差があることが支持された。本試験では雄の SD ラットが最も感受性が高いことが示唆された。(参照 4、5)

表 24 血漿中チロシン濃度 (mg/L)

投与群 (チロシン%)		SD ラット			BN ラット			ICR マウス	
		0	2	5	0	2	5	0	5
血漿中 チロシン濃度	雄	21	59	114	12	32	68	13	18
	雌	13	—	62	—	—	—	—	—

(3) イソキサフルトール及び代謝物の 4-HPPD 活性に対する影響

イソキサフルトール及び代謝物 B の 4-HPPD 活性に対する影響を調べるため、雄 SD ラット由来の肝 4-HPPD を、イソキサフルトール、代謝物 B 及び陽性対照 (0、50、100 及び 200 nM) の存在下、30°C、20 分間インキュベートする *in vitro* の試験が実施された。基質としては 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸 (チロシンの代謝産物) が、陽性対照としては 4-HPPD 阻害剤である NTBC が用いられた。

イソキサフルトールは、200 nM においても 4-HPPD 活性阻害を示さなかった。NTBC 及び代謝物 B は用量相関性に 4-HPPD 活性を阻害し、IC₅₀ は NTBC で 59 nM、代謝物 B で 131 nM であった。(参照 5)

(4) イソキサフルトール及びNTBCを用いたチロシン負荷試験

イソキサフルトールの4-HPPD活性に対する影響を調べるため、SDラット（一群雄5匹）にイソキサフルトール（原体：0及10 mg/kg体重、溶媒：0.5%MC水溶液）及びNTBC（10 mg/kg体重）を単回強制経口投与し、2、24、48時間及び8日後にチロシンを単回強制経口（500 mg/kg体重、溶媒：0.5%MC水溶液）投与する試験が実施された。なお、飼料は低チロシン飼料を用いた。

全投与群で体重減少が認められたが、低チロシン飼料が原因と考えられた。

チロシン投与後24時間の尿中代謝物（NAT、HPAA及びHPLA）が分析された。イソキサフルトール投与群では、投与2及び24時間後にチロシンを負荷した群で、尿中の代謝物濃度が最も高かった。投与48時間後チロシン負荷群では代謝物は減少し、8日後負荷群では対照群と同等であった。

NTBC投与群でも同等の結果が得られたが、投与8日後チロシン負荷群でも代謝物濃度が対照群より多く認められたことから、NTBCの4-HPPD阻害作用は、イソキサフルトールより強いことが示唆された。

本試験結果より、イソキサフルトールは*in vivo*においても4-HPPD阻害剤であるNTBCと類似の作用を示すことが認められた。（参照4、5）

(5) 血漿チロシン濃度に対する影響（ラット）

SDラット（一群雄5匹）に、イソキサフルトールを14日間混餌（原体：0、10、100及び400 mg/kg体重/日）して、血漿中チロシン濃度の変化が検討された。

試験終了時（14日間混餌投与後）の0、10、100及び400 mg/kg体重/日投与群における血漿中チロシン濃度は、それぞれ25.7、79.7、92.5及び89.4 mg/Lであり、投与群における血漿中チロシン濃度は対照群の約3倍であった。なお、検体の投与量を増しても、血漿中チロシンの一定濃度以上の増加は認められなかった。

400 mg/kg体重/日投与群における血漿中チロシン濃度は、SDラットにチロシンを14日間5%で混餌投与し、角膜混濁が出現した際の血中濃度（114 mg/L）と近い値であった。（[15. (2)]参照）（参照5）

(6) 血漿チロシン濃度に対する影響（マウス）

ICRマウス（一群雄9～13匹）に、イソキサフルトールを14日間混餌（原体：0、175、600、2,800及び7,000 ppm）投与して、血漿中チロシン濃度の変化が検討された。

試験終了時（14日間混餌投与後）、対照群（0 ppm）における血漿中チロシン濃度は33 mg/Lであったが、投与群ではいずれも142 mg/Lを超えており、イソキサフルトールが血漿チロシン濃度を増加させることが示された。なお、本試験の検体投与群間で血漿チロシン濃度はほぼ同じであり、用量相関性のある値は得られなかった。（参照5）

(7) 血漿チロシン及びアミノ酸濃度に対する影響（イヌ、ラット及びマウス）

ビーグル犬（雌雄各 1 匹）に、イソキサフルトールを 56 日間混餌（原体：0 及び 1,000 mg/kg 体重/日）投与して、血漿中チロシン濃度の変化が検討された。

投与開始前の血漿中チロシン濃度は雌雄いずれも 9 mg/L であったが、投与開始 24 日には雄及び雌でそれぞれ 190 及び 130 mg/L となった。雄では、試験終了時まで血漿中チロシン濃度はほぼ一定（約 200 mg/L）であったが、雌では、投与開始 39 及び 56 日の血漿中チロシン濃度はそれぞれ 140 及び 200 mg/L であった。チロシン以外のアミノ酸については、血漿中濃度の分析は行われなかった。

ラットにイソキサフルトールを 14 日間混餌投与した試験[15. (3)]の血漿を用い、チロシン以外のアミノ酸について分析が行われた。イソキサフルトール 10 及び 400 mg/kg 体重/日投与群で、総アミノ酸濃度はそれぞれ 1.3 及び 1.5 倍のみの増加であった。15 種類のアミノ酸について個別に分析された結果にも、イソキサフルトール投与の影響は認められなかった。

同様に、マウスにイソキサフルトールを 14 日間混餌投与した試験[15. (4)]の血漿を用い、チロシン以外の 15 種類のアミノ酸について個別に分析された結果、イソキサフルトール投与の影響は認められなかった。

ラット、マウス及びイヌを用いたイソキサフルトール投与による試験では、いずれの動物種でも、最低用量群からチロシン濃度増加が認められた。しかし、ラット及びマウスでは、他のアミノ酸濃度にイソキサフルトール投与の影響は認められなかった。この結果から、イソキサフルトールはチロシン代謝にかかわる 4-HPPD を特異的に阻害することが示唆された。4-HPPD 活性が阻害されることにより、チロシン分解経路の一つが阻害され、血漿中チロシン濃度が上昇すると考えられた。（参照 5）

(8) 肝薬物代謝酵素に対する影響（ラット）

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、雌雄で肝腫瘍の発生増加が認められたため、腫瘍発生機序を検討するため、SD ラット（一群雄各 5 匹）に、イソキサフルトールを 14 日間混餌（原体：0、10、100 及び 400 mg/kg 体重/日）投与する試験が実施された。

死亡例はなく、体重及び摂餌量に検体投与の影響は認められなかった。

全投与群で、用量相関性に肝絶対及び比重量増加が認められ、100 mg/kg 体重/日以上投与群で統計学的有意差が認められた。

また、10 mg/kg 体重/日以上投与群でチトクローム P450 の増加が認められた。

ラウリン酸 11 ヒドロキシラーゼ (11-LAOH)、ラウリン酸 12 ヒドロキシラーゼ (12-LAOH) 及び EROD の活性増加は認められたが、これらの活性を全 P450 含量に対する比活性で表すと有意な増加は認められなかった。一方、全投与群で PROD 及び BROD の全 P450 含量に対する比活性は増加していた。

本試験の結果より、イソキサフルトールはラットの肝薬物代謝酵素誘導に関し、10 mg/kg 体重/日以上で PB と類似した酵素誘導作用を有することが示唆された。(参照 4、5、7)

(9) 肝薬物代謝酵素に対する影響 (マウス)

マウスを用いた 18 カ月間発がん性試験[11. (3)]において、雌雄で肝腫瘍の発生増加が認められたため、腫瘍発生機序を検討するため、ICR マウス (一群雄 25 匹) に、イソキサフルトールを 14 日間混餌 (原体:0、175、700、2,800 及び 7,000 ppm) 投与する試験が実施された。

死亡例はなく、体重及び摂餌量に検体投与の影響は認められなかった。

700 ppm 以上投与群で、用量相関性に肝絶対及び比重量増加並びにチトクローム P450 の増加が認められた。

全投与群で PROD 及び BROD の活性増加が認められた。また、PROD 及び BROD の全 P450 含量に対する比活性は、BROD は全投与群で、PROD は 700 ppm 以上投与群で増加した。EROD、11-及び 12-LAOH 並びに MROD の活性増加は認められたが、これらの活性を全 P450 含量に対する比活性で表すと有意な増加は認められなかった。

本試験の結果より、イソキサフルトールはマウスの肝薬物代謝酵素誘導に関し、ラット同様、PB と類似した酵素誘導作用を有することが示唆された。(参照 4、5、7)

(10) 甲状腺に対する影響 (ラット)

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、雄で甲状腺腫瘍の発生増加が認められたため、腫瘍発生機序を検討するため、SD ラット (一群雄 14 匹) に、イソキサフルトールを 14 日間混餌 (原体:0 及び 500 mg/kg 体重/日) 投与する試験が実施された。また、陽性対照群として、PB を 14 日間強制経口 (80 mg/kg 体重/日) 投与する群も設けられた。さらに、投与開始 15 日目 (検体投与期間終了翌日)、各群 6 匹に $^{125}\text{I}\cdot\text{T}_4$ を単回静脈内投与し、投与後 48 時間の血中濃度推移が検討された。

死亡例はなかった。イソキサフルトール投与群では体重及び摂餌量に投与の影響は認められなかった。PB 投与群では、異常歩行及び摂餌量減少が認められたが、体重に投与の影響は認められなかった。

血中 T_4 濃度は対照群に比べ、イソキサフルトール及び PB いずれの投与群でも有意に減少した (対照群 5.7 mg/dL に対し、イソキサフルトール及び PB 投与群でそれぞれ 3.2 及び 4.9 mg/dL)。 T_3 濃度はいずれの投与群でも変化は認められなかった。

イソキサフルトール及び PB 投与群では、肝絶対及び比重量増加が認められた。両投与群で甲状腺絶対重量増加が認められたが、PB 投与群でのみ、統計学的有意

差が認められた。

イソキサフルトール及び PB 投与群で、肝ミクロソームタンパク、CYP 濃度、PROD 及び UGT 増加が認められた。いずれの変化についても、イソキサフルトール投与群で PB 投与群より変化がやや大きいことが認められた。

$^{125}\text{I}\text{-T}_4$ を単回静脈内投与後、全血からの ^{125}I の消失は、両投与群で対照群よりも速やかであった。

本試験の結果より、イソキサフルトール投与により肝 UGT 活性が増加し、その結果 T_4 の抱合化が促進されることで血中 T_4 の消失が促進される可能性が示唆された。血中 T_4 減少から、TSH 産生が誘導され、TSH の持続的産生は甲状腺過形成、さらに甲状腺腫瘍を引き起こすことが知られている。したがって、イソキサフルトールによる甲状腺腫瘍発生機序に、肝酵素誘導が関与している可能性が示唆された。

(参照 4、5、7)

Ⅲ. 食品健康影響評価

参照に挙げた資料を用いて農薬「イソキサフルトール」の食品健康影響評価を実施した。

ラットを用いた動物体内運命試験において、イソキサフルトールの血中 $T_{1/2}$ は、約 60 時間であり、比較的長かった。主要排泄経路は、低用量単回又は反復投与群では尿中、高用量単回投与群では糞中であった。尿及び糞中の主要代謝物は B 及び C であった。

とうもろこし、さとうきび及び小麦を用いた植物体内運命試験において、処理したイソキサフルトールの可食部への移行は少ないと考えられた。未成熟期以外の植物に親化合物は検出されず、主要代謝物はいずれの植物でも B 及び C であった。

各種毒性試験結果から、イソキサフルトール投与による影響は、主に肝臓（肝細胞肥大等）及び眼（角膜混濁等）に認められた。特に角膜混濁は、本検体の 4-HPPD 阻害作用によるチロシン蓄積に起因するものと考えられ、マウス、イヌよりラットで、また、雌より雄で感受性が高かった。繁殖能に対する影響、催奇形性及び遺伝毒性は認められなかった。

発がん性試験において、ラット及びマウスの雌雄で肝細胞腫瘍、ラットの雄で甲状腺腺腫の発生頻度の増加が認められたが、遺伝毒性が認められなかったこと及び腫瘍発生機序に関する試験の結果より、発生機序は遺伝毒性メカニズムとは考え難く、評価にあたり閾値を設定することは可能であると考えられた。

後作物残留試験より、代謝物 B 及び C の長期の残留が認められたが、代謝物 C の毒性は極めて低いことが確認されたことから、食品中の暴露評価対象物質をイソキサフルトール及び代謝物 B と設定した。

各試験における無毒性量等は表 25 に示されている。

ラットを用いた 42 日間亜急性毒性試験において、雄の無毒性量が設定できなかったが（25 mg/kg 体重/日未満）、90 日間亜急性毒性試験において、より低い無毒性量（3 mg/kg 体重/日）が設定されている。

また、マウスを用いた 28 日間亜急性毒性試験において、雄の無毒性量が設定できなかったが（29 mg/kg 体重/日未満）、より低い用量で実施された 90 日間亜急性毒性試験において、無毒性量（7.6 mg/kg 体重/日）が設定されている。

食品安全委員会は、各試験の毒性試験の無毒性量又は最小毒性量から、一日摂取許容量（ADI）を次のように試算した。

各毒性試験のうち、ウサギを用いた発生毒性試験において、胎児の最小毒性量が 5 mg/kg 体重/日であり、無毒性量が設定できなかった。仮に、この試験を基に ADI を設定した場合、この最小毒性量を根拠として安全係数 1,000（種差 10、個体差 10、無毒性量を設定できなかった不確実係数の最大値 10）で除した 0.005 mg/kg 体重/日が試算された。

一方、ラットにおける無毒性量の最小値は、2 年間慢性毒性/発がん性併合試験の 0.5

mg/kg 体重/日であったことから、これを根拠として、安全係数 100 で除した 0.005 mg/kg 体重/日が試算された。

試算の結果得られた値は、両者とも同じであることから、ラットを用いた 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験の無毒性量を根拠とすることにより、安全性は十分確保できると判断した。

以上より、0.005 mg/kg 体重/日を ADI と設定した。

ADI	0.005 mg/kg 体重/日
(ADI 設定根拠資料)	慢性毒性/発がん性併合試験
(動物種)	ラット
(期間)	2 年間
(投与方法)	混餌
(無毒性量)	0.5 mg/kg 体重/日
(安全係数)	100

表 25 各試験における無毒性量の比較

動物種	試験	投与量 (mg/kg 体重/日)	無毒性量 (mg/kg 体重/日) ¹⁾			
			米国	豪州	カナダ	食品安全委員会
ラット	90日間 亜急性 毒性試験	0、1、3、10、100	/	雄：3 雌：10 雌雄：角膜混濁、Lym 減少等	雄：3 雌：10 雌雄：角膜混濁、Lym 減少等	雄：3 雌：10 雌雄：角膜混濁、Lym 減少等
	90日間 亜急性 神経毒性 試験	0、25、250、750	雄：－ 雌：750 雄：後肢握力低下 雌：毒性所見なし	雌雄：250 雄：体重増加抑制 (神経毒性は認められない)	雌雄：250 雄：体重増加抑制 (神経毒性は認められない)	雄：250 雌：750 雄：体重増加抑制 雌：毒性所見なし (神経毒性は認められない)
	42日間 亜急性 毒性試験 (49日間 回復)	0、25、100、400、 1,000	/	雄：－ 雌：25 雌雄：角膜限局性混濁等	雄：－ 雌：25 雌雄：角膜限局性混濁等	雄：－ 雌：25 雌雄：角膜限局性混濁等
	2年間 慢性毒性/ 発がん性 併合試験	0、0.5、2、20、500	雌雄：2 雄：肝絶対及び比重量増加 雌：尿比重増加等 雌雄で肝細胞腺腫及び癌、雄で甲状腺ろ胞細胞腺腫発生増加	雌雄：2 雄：肝絶対及び比重量増加 雌：尿比重増加等 雌雄で肝細胞腺腫及び癌、雄で甲状腺ろ胞細胞腺腫発生増加	雄：0.5 雌：2 雄：角膜炎 雌：小葉中心性肝細胞肥大等 雌雄で肝細胞腺腫及び癌、雄で甲状腺ろ胞細胞腺腫発生増加	雄：0.5 雌：2 雄：角膜炎 雌：小葉中心性肝細胞肥大 雌雄で肝細胞腺腫及び癌、雄で甲状腺ろ胞細胞腺腫発生増加

動物種	試験	投与量 (mg/kg 体重/日)	無毒性量 (mg/kg 体重/日) ¹⁾			
			米国	豪州	カナダ	食品安全委員会
	2世代 繁殖試験	0、0.5、2、20、500 ----- (実際の投与量) 雄：0、0.45、1.76、 17.4、414 雌：0、0.46、1.79、 17.7、437	親動物及び児動物 雄：1.76 雌：1.79 親動物 雌雄：小葉中心性肝細胞 肥大等 児動物 4日生存率低下等 (繁殖能に対する影響 は認められない)	親動物及び児動物 雌雄：2 親動物 雌雄：小葉中心性肝細胞 肥大等 児動物 4日生存率低下等 (繁殖能に対する影響は 認められない)	親動物及び児動物 雄：1.76 雌：1.79 親動物 雌雄：小葉中心性肝細胞 肥大等 児動物 4日生存率低下等 (繁殖能に対する影響 は認められない)	親動物及び児動物 雄：1.76 雌：1.79 親動物 雌雄：小葉中心性肝細胞 肥大等 児動物 4日生存率低下等 (繁殖能に対する影響 は認められない)
	発生毒性 試験	0、10、100、500	母動物：100 胎児：10 母動物：流涎、体重増加 抑制及び摂餌量減少 胎児：低体重 (催奇形性は認められ ない)	母動物：100 胎児：10 母動物：体重増加抑制及 び摂餌量減少 胎児：低体重 (催奇形性は認められ ない)	母動物：100 胎児：10 母動物：体重増加抑制及 び摂餌量減少 胎児：低体重 (催奇形性は認められ ない)	母動物：100 胎児：10 母動物：流涎、体重増 加抑制及び摂餌量減少 胎児：低体重 (催奇形性は認められ ない)

動物種	試験	投与量 (mg/kg 体重/日)	無毒性量 (mg/kg 体重/日) ¹⁾			
			米国	豪州	カナダ	食品安全委員会
マウス	90日間 亜急性 毒性試験	0, 50, 1,000, 2,000 ppm	/	雄：7.6 雌：8.7	雄：7.6 雌：8.7	雄：7.6 雌：8.7
		雄：0, 7.6, 170, 324 雌：0, 8.7, 181, 376		雌雄：小葉中心性肝細胞 肥大等	雌雄：小葉中心性肝細胞 肥大等	雌雄：小葉中心性肝細胞 肥大等
	28日間 亜急性 毒性試験	0, 175, 700, 2,800, 7,000 ppm	/	雌雄：— 雌雄：Cre 減少等	雄：29 雌：35 雌雄：肝腫大、小葉中心 生肝細胞肥大等	雄：— 雌：35 雄：肝絶対重量増加 雌：小葉中心性肝細胞 肥大等
マウス	18カ月間 発がん性 試験	0, 25, 500, 7,000 ppm	雄：3.2 雌：4.0	雄：3.2 雌：4.0	雄：3.2 雌：4.0	雄：3.2 雌：4.0
		雄：0, 3.2, 63.5, 977 雌：0, 4.0, 77.9, 1,160	雌雄：体重増加抑制等 雌雄で肝細胞腺腫、雄で 肝細胞癌発生増加	雌雄：体重増加抑制等 雌雄で肝細胞腺腫、雄で 肝細胞癌発生増加	雌雄：体重増加抑制等 雌雄で肝細胞腺腫、雄で 肝細胞癌発生増加	雌雄：体重増加抑制等 雌雄で肝細胞腺腫、雄 で肝細胞癌発生増加
		0, 5, 20, 100	母動物：20 胎児：—	母動物：20 胎児：5	母動物：20 胎児：5	母動物：20 胎児：—
ウサギ	発生毒性 試験	0, 5, 20, 100	母動物：体重増加抑制等 胎児：27 仙骨前椎骨	母動物：体重増加抑制等 胎児：骨格変異等 (催奇形性は認められ ない)	母動物：体重増加抑制等 胎児：骨格変異等 (催奇形性は認められ ない)	母動物：体重増加抑制 等 胎児：第27 前仙椎骨

動物種	試験	投与量 (mg/kg 体重/日)	無毒性量 (mg/kg 体重/日) ¹⁾			
			米国	豪州	カナダ	食品安全委員会
イヌ	1年間慢性毒性試験	0, 240, 1,200, 12,000, 30,000 ppm 雄：0, 8.41, 45.3, 498, 1,250 雌：0, 8.56, 44.8, 453, 1,270 ²⁾	雄：45.3 雌：44.8 雌雄：肝絶対重量増加等	雄：46 雌：48 雌雄：肝絶対重量増加等	雄：45.3 雌：44.8 雌雄：肝絶対重量増加等	雄：45.3 雌：44.8 雌雄：小葉中心性肝細胞壊死等
ADI (cRfD)			NOEL : 2 NOEL : 1.76 UF : 300 cRfD : 0.0067	NOEL : 2 SF : 100 ADI : 0.02	NOEL : 0.5 SF : 100 ADI : 0.005	NOAEL : 0.5 SF : 100 ADI : 0.005
ADI (cRfD) 設定根拠資料			ラット 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験 ラット 2 世代繁殖試験	ラット 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験 ラット 2 世代繁殖試験	ラット 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験	ラット 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験

注) 斜線：試験記載なし

NOAEL：無毒性量 LOAEL：最小毒性量 LOEL：最小影響量 SF：安全係数 UF：不確実係数 cRfD：慢性参照用量 ADI：一日摂取許容量

<別紙 1 : 代謝物/分解物略称>

記号	略号	化学名
B	RPA202248	2-cyano-3-cyclopropyl-4-(2-methylsulphonyl-4-trifluoromethylphenyl)propan-1,3-dione
C	RPA203328	2-methylsulfonyl-4-trifluoromethylbenzoic acid
D	RPA205834	2-aminomethylene-3-cyclopropyl-4-(2-methylsulphonyl-4-trifluoromethylphenyl)propan-1,3-dione
E	RPA207048	2-hydroxymethylene-3-cyclopropyl-4-(2-methylsulphonyl-4-trifluoromethylphenyl)propan-1,3-dione
F	RPA205568	5-cyclopropyl-3-cyclopropyl-4-(2-methylsulphonyl-4-trifluoromethylphenyl)propan-1,3-dione

<別紙2：検査値等略称>

略称	名称
A/G 比	アルブミン/グロブリン比
ai	有効成分量 (active ingredient)
Alb	アルブミン
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ [=グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)]
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ [=グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)]
BROD	ベンゾキシレゾルフィン- <i>O</i> -デベンジラーゼ
Chol	コレステロール
Cre	クレアチニン
CYP	チトクローム P450
EROD	エトキシレゾルフィン <i>O</i> -デエチラーゼ
FOB	機能観察総合検査
Glu	グルコース (血糖)
Hb	ヘモグロビン (血色素量)
HBA	4-ヒドロキシベンズアルデヒド
HPAA	4-ヒドロキシフェニル酢酸
HPLA	4-ヒドロキシフェニル乳酸
4-HPPD	4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ
Ht	ヘマトクリット値
LAOH	ラウリン酸ヒドロキシラーゼ
IC ₅₀	50%阻害濃度
LC ₅₀	半数致死濃度
LD ₅₀	半数致死量
MC	メチルセルロース
MCHC	平均赤血球ヘモグロビン量
MCH	平均赤血球血色素濃度
MCV	平均赤血球容積
MROD	メトキシレゾルフィン- <i>O</i> -デメチラーゼ
NAT	<i>N</i> -アセチルチロシン
NTBC	2-(2-ニトロ-4-トリフルオロメチルベンゾイル)-1,3-シクロヘキサジオン
PB	フェノバルビタール
PLT	血小板数
PROD	ペントキシレゾルフィン <i>O</i> -デペンチラーゼ
RBC	赤血球数

略称	名称
PT	プロトロンビン時間
T _{1/2}	消失半減期
T ₃	トリヨードサイロニン
T ₄	サイロキシシン
TAR	総投与（処理）放射能
T.Bil	総ビリルビン
TP	総蛋白質
TRR	総残留放射能
TSH	甲状腺刺激ホルモン
UGT	ウリジン二リン酸グルクロニルトランスフェラーゼ
Ure	尿素
WBC	白血球数

<参照>

- 1 食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）の一部を改正する件（平成 17 年 11 月 29 日付、厚生労働省告示第 499 号）
- 2 US EPA : Pesticide Fact Sheet Name of Chemical: Isoxaflutole(1998)
- 3 US EPA : Federal Register/Vol.63,No.184,50773~50784(1998)
- 4 US EPA : Isoxaflutole – 123000:Revised Health Effects Division Risk Characterization Document for the First Food Use of Isoxaflutole in/on Corn(1998)
- 5 Australia NRA : ISOXAFLUTOLE (1997)
- 6 Australia NRA : Residues Evaluation Report ,Isoxaflutole (2001)
- 7 Health Canada : Proposed Regulatory Decision Document, Isoxaflutole
- 8 食品健康影響評価について（平成 19 年 4 月 9 日付、厚生労働省発食安第 0409005 号）