

4. 水中運命試験

(1) 加水分解試験

[dih-¹⁴C] スピロジクロフェンを pH 4 (酢酸緩衝液)、pH 7 (tris 緩衝液) 及び pH 9 (ホウ酸緩衝液) の各滅菌緩衝液に約 0.025 mg/L (水溶解度の約 1/2 に相当) となるように加えた後、25°C の暗条件下で 30 日間インキュベートし、加水分解試験が実施された。

推定半減期は表 14 に示されている。

スピロジクロフェンは、酸性、中性及びアルカリ性のいずれの条件でも加水分解されたが、加水分解速度は pH の上昇に依存し、pH 9 では不安定であった。加水分解物としては M1 のみが認められ、スピロジクロフェンはエステルの開裂によりエノール体を生成する経路で加水分解すると考えられた。(参照：2、4、5、6、8)

表 14 加水分解試験結果概要 (推定半減期)

試験溶液 (pH)	半減期 (日)	
	25°C	20°C ²
4	63.6	120
7	30.8	52.1
9	1.90	2.5

(2) 水中光分解試験① (緩衝液)

[dih-¹⁴C] スピロジクロフェン又は[cyc-¹⁴C]スピロジクロフェンを酢酸緩衝液 (0.01M、pH4) に約 0.025 mg/L の濃度で添加し、25±1°C で 18~19 日間³キセノン光 (光強度：試験 1；925 W/m²、試験 2 及び 3；1,092 W/m²、波長：300~800 nm) を照射し、水中光分解試験が実施された。

推定半減期は表 15 に示されている。

試験 2 では照射 18 日後の光照射区で親化合物は 58.4% TAR、暗所対照区で 87.4% TAR、試験 3 では照射 17 日後の光照射区で親化合物は 91.0% TAR、暗所対照区で 100% TAR であった。光照射区の半減期は暗所対照区よりも短く、光による分解が認められた。(参照：2、8)

² 25°C 及び 50°C (予備試験) の結果をアレニウスの式に代入し、外挿して求めた。

³ 揮発性物質捕集装置のソーダ石灰が溶液中に落下し、pH の上昇による加水分解が認められたため、試験 2 を試験期間 18 日で追加実施した。

表 15 水中光分解試験①結果概要（推定半減期）

試験群	被験物質	光照射区		暗所対照		環境中*
		推定半減期(日)	pH	推定半減期(日)	pH	推定半減期(日)
試験 1	[dih- ¹⁴ C]	28.8	4.46~5.13	—	8.68	約 270
試験 2	スピロジクロフェン	23.1	4.44~4.92	105	4.35	約 260
試験 3	[cyc- ¹⁴ C] スピロジクロフェン	99.4	4.33~4.82	365	4.34	約 1,100

—：揮発性物質捕集装置のソーダ石灰が溶液中に落下し、pH の上昇による加水分解が認められたため

*：東京（4月～6月）における太陽光条件での計算値

（3）水中光分解試験②（緩衝液）

[dih-¹⁴C] スピロジクロフェン又は[cyc-¹⁴C]スピロジクロフェンを酢酸緩衝液（0.02M、pH4）に約 0.025 mg/L の濃度で添加し、25±1°C で 12 日間キセノン光（光強度：668 W/m²、波長：300～800 nm）を照射し、水中光分解試験が実施された。

推定半減期⁴は、光照射区で 10.8 日、暗所対照区で 37 日、自然環境中（東京 4 月～6 月における太陽光条件）換算では約 73 日であった。

照射 12 日後の光照射区で親化合物は 39.5% TAR、10 日後の暗所対照区では 73.0% TAR であったことから、光による分解が認められた。主要分解物は、M1 及び M19 で、最大 10.8 及び 9.8% TAR 認められた。（参照：2、8）

スピロジクロフェンは、水中光分解試験（緩衝液）[4. (2) 及び(3)]において、加水分解により生成された M1 が速やかに光分解され M19 となり、さらに光分解が進み最終産物の CO₂ まで分解されると考えられた。（参照：2、8）

（4）水中光分解試験③（自然水）

[dih-¹⁴C] スピロジクロフェンを pH 8.05 の自然水（河川水、ドイツ）に約 0.025 mg/L の濃度で添加し、25±1°C で 19 日間キセノン光（光強度：試験 1；712 W/m²、試験 2；782 W/m²、波長：300～800 nm）を照射し、スピロジクロフェンの水中光分解試験が実施された。

推定半減期は表 16 に示されている。

試験 1 の 19 日後及び試験 2 の 12 日後の光照射区及び暗所対照区における親化合物量は、52.3～58.8% TAR 及び 48.6～60.8% TAR で顕著な差は認められず、自然水中（pH 7～8）では、光分解よりも pH による影響が高いと考えられた。主要分解物は ¹⁴CO₂ であった。

スピロジクロフェンは、自然水中で光分解され、M1 及び M19 を生成し、最終

⁴ 両標識体の平均値に基づく

的に CO₂ まで分解されると推定された。この代謝経路は、緩衝液中及び自然水中（河川）と同じであると考えられた。（参照：2、8）

表 16 水中光分解試験③結果概要（推定半減期）

試験群	水中光		暗所対照		環境中*
	推定半減期 (日)	pH	推定半減期 (日)	pH	推定半減期 (日)
試験 1	20.7	7.73~8.37	30	7.04	149
試験 2	21.3	6.47~8.42	15	8.53	168

*：東京（4月～6月）における太陽光条件での計算値

（5）水中光分解試験④

スピロジクロフェンの水中光分解試験が実施された（詳細不明）。

推定半減期は、光照射区で 63 日、自然環境中換算（Phoenix 及び Edmonton、米国）で 43.8 及び 61.6 日であった。（参照 5）

5. 土壌残留試験

洪積土・埴壌土（福島）及び火山灰土・軽埴土（茨城）を用いて、スピロジクロフェン並びにスピロジクロフェン及び分解物（M1、M14、M15 及び M18）を分析対象とした土壌残留試験が実施された。

結果は表 17 に示されている。（参照 2、8）

表 17 土壌残留試験成績

試験	濃度*	土壌	推定半減期（日）	
			スピロジクロフェン	スピロジクロフェン +分解物
容器内 試験	畑水分 状態 1.2 g ai/ha	洪積土・埴壌土	5.5	9.0
		火山灰土・軽埴土	4.9	8.7
圃場 試験	畑地 1.2 g ai/ha	洪積土・埴壌土	7.0	13.7
		火山灰土・軽埴土	1.7	3.3

*：フロアブル剤を使用 分解物：親化合物換算値

6. 作物残留試験

果実、野菜、茶等を用いて、スピロジクロフェン並びに代謝物 M9、M12 及び M13（代謝物は国内のみ）を分析対象化合物とした作物残留試験（国内及び海外）が実施された。

結果は別紙 3 及び 4 に示されている。

国内で実施された試験におけるスピロジクロフェンの最高値は、最終散布 14 日後に収穫された茶（荒茶）の 12.0 mg/kg であった。また、代謝物 M9 はいずれも 0.04 mg/kg 未満、M12 及び M13 の合計値の最高値は最終散布 28 日後に収穫された温州

みかん（果皮）の0.76 mg/kgであった。

海外で栽培されている農産物において、登録された使用方法で実施された試験におけるスピロジクロフェンの最高値は、最終散布14日後に収穫されたホップ（毬花）の24 mg/kgであった。（参照2、8、10）

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18に示されている。（参照2、8）

表18 一般薬理試験概要

試験の種類	動物種	動物数 匹/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)	結果の概要
中枢神経系	一般状態 (Irwin 法)	ICR マウス	雌雄 3 0、128、320、 800、2,000、 5,000 (腹腔内)	雄：800 雌：320	雄：2,000 雌：800	2,000 mg/kg 体重以上投与群の雄、800 mg/kg 体重以上投与群の雌で認知力、運動性、運動失調、筋緊張、反射及び自律神経系の項目に抑制性の徴候及び死亡
	一般状態	SD ラット	雄5 0、2,000、 5,000 (経口)	5,000	—	影響なし
	睡眠時間 延長 ヘキサルピピタル 睡眠	ICR マウス	雄8 0、51.2、 128、320、 800、2,000、 5,000 (腹腔内)	800	2,000	2,000 mg/kg 体重群以上で死亡及び睡眠時間の延長
	体温	SD ラット	雄5 0、2,000、 5,000 (経口)	5,000	—	影響なし
呼吸循環器系	血圧、 心拍数	SD ラット	雄5 0、2,000、 5,000 (経口)	5,000	—	影響なし
自律神経系	瞳孔径	SD ラット	雄5 0、2,000、 5,000 (経口)	5,000	—	影響なし
消化器系	小腸炭末 輸送	ICR マウス	雄8 0、51.2、 128、320、 800、2,000、 5,000 (腹腔内)	128	320	320 及び 800mg/kg 体重投与群で促進。 5,000mg/kg 体重投与群で抑制

試験の種類	動物種	動物数 匹/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)	結果の概要
骨格筋	握力	SD ラット	雄 5 0, 2,000, 5,000 (経口)	5,000	—	影響なし
腎臓	腎機能	SD ラット	雄 5 0, 2,000, 5,000 (経口)	5,000	—	影響なし
血液	溶血及び 血液凝固	SD ラット	雄 5 0, 2,000, 5,000 (経口)	5,000	—	影響なし

注：検体は 1%Tween80 に懸濁して用いた。 —：最小作用量は設定できなかった。

8. 急性毒性試験

(1) 急性毒性試験

スピロジクロフェン（原体）を用いた急性毒性試験が実施された。結果は表 19 に示されている。（参照 2、4、6、8）

表 19 急性毒性試験結果概要（原体）

投与経路	動物種	LD ₅₀ (mg/kg 体重)		観察された症状
		雄	雌	
経口	Wistar ラット 雌雄各 3 匹	>2,500	>2,500	症状及び死亡例なし
	ICR マウス 雌雄各 5 匹	>2,000	>2,000	症状及び死亡例なし
経皮	Wistar ラット 雌雄各 5 匹	>2,000	>2,000	症状及び死亡例なし
吸入	Wistar ラット 雌雄各 5 匹	LC ₅₀ (mg/m ³)		症状及び死亡例なし
		>5,030	>5,030	

スピロジクロフェンの代謝物 M1、M9 及び M14 を用いた急性経口毒性試験が実施された。結果は表 20 に示されている。（参照 2、8）

表 20 急性毒性試験結果概要（代謝物）

被験物質	動物種	LD ₅₀ (mg/kg 体重)		観察された症状
		雄	雌	
M1	Wistar ラット 雌雄各 3 匹	500~1,000	300~500	円運動、運動性及び反応性の低下、穴掘り及び身づくろい行動亢進、呼吸困難、流涎の増加並びに歩行失調 雌雄：500 mg/kg 体重以上で死亡例
M9	Wistar ラット 雌雄各 3 匹	>2,500	>2,500	症状及び死亡例なし
M14	Wistar ラット 雌雄各 3 匹	>2,500	>2,500	症状及び死亡例なし

(2) 急性神経毒性試験（ラット）

Wistar ラット（一群雌雄各 12 匹）を用いた強制経口（原体：0、200、500、及び 2,000 mg/kg 体重、溶媒：0.5%MC 及び 0.4%Tween80 水溶液）投与による急性神経毒性試験が実施された。

一般毒性、FOB 及び運動能試験に対する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 2,000 mg/kg 体重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、8）

9. 眼・皮膚に対する刺激性及び皮膚感作性試験

ヒマラヤンウサギを用いた眼及び皮膚刺激性試験が実施された。眼及び皮膚に対する刺激性は認められなかった。（参照 2、8）

DH モルモットを用いた皮膚感作性試験（Maximization 法）が実施され、陽性と判断された。（参照 2、8）

10. 亜急性毒性試験

(1) 90 日間亜急性毒性試験（ラット）

Wistar ラット（一群雌雄各 10 匹）を用いた混餌（原体：0、100、500、2,500 及び 12,500 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、2,500 ppm 以上投与群の雄及び 500 ppm 以上投与群の雌で副腎皮質細胞質の小空胞化等が認められたので、無毒性量は雄で 500 ppm (32.1 mg/kg 体重/日)、雌で 100 ppm (8.1 mg/kg 体重/日) であると考えられた。（参照：2、4、5、6、8）

（副腎皮質の空胞形成に関しては [14. (1)~(13)] を参照）

表 21 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
12,500 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・WBC、PLT 減少 ・ALT 及び AST 増加 ・副腎皮質細胞質の大小不同空胞化 ・副腎比重量増加 	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・WBC 減少 ・ALT、AST 及び RBC 増加 ・Chol、MCV、MCH 減少 ・副腎絶対重量及び比重量増加 ・脾臓絶対重量及び比重量減少
2,500 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・PTT 延長及び ALP 増加 ・Chol 及び TG 減少 ・副腎皮質細胞質の小空胞化 	<ul style="list-style-type: none"> ・PTT 延長及び ALP 増加
500 ppm 以上	500 ppm 以下 毒性所見なし	<ul style="list-style-type: none"> ・副腎皮質細胞質の小空胞化 ・TG 減少
100 ppm		毒性所見なし

(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、1,000、及び 10,000 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 22 に示されている。

本試験において、1,000 ppm 以上投与群の雄でライディツヒ細胞の肥大、雌で副腎皮質の細胞質空胞化が認められたので、無毒性量は雌雄で 100 ppm（雄：15 mg/kg 体重/日、雌：30 mg/kg 体重/日）であると考えられた。（参照：4、5、6、8）

（副腎皮質の空胞形成及び雄生殖器への影響に関しては [14. (1)～(13)] を参照）

表 22 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
10,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・門脈周囲性肝細胞質空胞化 ・副腎皮質細胞質空胞化 ・腎絶対及び比重量減少 	<ul style="list-style-type: none"> ・Chol 低下 ・門脈周囲性肝細胞質空胞化
1,000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ライディツヒ細胞の肥大 	<ul style="list-style-type: none"> ・副腎皮質細胞質空胞化
100 ppm	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、200、630 及び 2,000 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 23 に示されている。

630 ppm 以上投与群の雌雄で RBC、Hb 及び Ht の低下が認められたが、軽微な変化であり、1 年間慢性毒性試験（イヌ） [11. (1)] の 600 ppm 投与群では同様の所見は認められなかったことから、毒性影響とは考えられなかった。

2,000 ppm 投与群の雄で O-DEM 及び P-450 増加、雌で EH 増加、630 ppm

以上投与群の雌雄で N-DEM 増加、雌で P-450 増加、200 ppm 以上投与群の雌雄で ECOD 及び ALD 増加、雌で O-DEM 増加が認められたが、薬物代謝酵素誘導による変化であり毒性影響とは考えられなかった。

本試験において、630 ppm 以上投与群の雄及び 200 ppm 以上投与群の雌で副腎皮質束状帯空胞化等が認められたので、無毒性量は雄で 200 ppm (7.7 mg/kg 体重/日)、雌で 200 ppm 未満 (8.4 mg/kg 体重/日未満) であると考えられた。

(参照：2、4、5、8)

(副腎皮質の空胞形成及び雄生殖器への影響に関しては [14. (1)～(13)] を参照)

表 23 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
2,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ AST、ALT、ALP 及び GDH 増加 ・ 肝比重量増加 ・ 胸腺絶対及び比重量低下 ・ 前立腺の未成熟 ・ 副腎単核細胞浸潤 ・ 精巣上皮細胞変性 (2 例) * ・ 精巣上体無精子症 (2 例) * 	<ul style="list-style-type: none"> ・ AST、ALP 及び EH 増加 ・ 肝細胞質好酸化、炎症性細胞浸潤 ・ 副腎単核細胞浸潤 ・ 肝細胞壊死 (1 例) * ・ 胸腺皮質の萎縮 (1 例) *
630 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制* ・ 副腎皮質束状帯空胞化 ・ 肝臓及び副腎絶対重量増加 ・ 前立腺絶対重量減少* ・ 精巣のライディッヒ細胞空胞化 (2 例) 及び肥大 (2 例) * ・ 精巣上体精子減少症 (2 例) * ・ 前立腺の未成熟 (1 例) * ・ 胸腺皮質の萎縮 (1 例) * 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制* ・ 副腎皮質束状帯空胞化
200 ppm	毒性所見なし	・ 副腎皮質束状帯空胞化* (2 例)

* : 統計学的有意差なし

(4) 90 日間亜急性神経毒性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 12 匹) を用いた混餌 (原体 : 0、100、1,000、及び 12,500 ppm) 投与による亜急性神経毒性試験が実施された。

12,500 ppm 投与群の雌雄で体重増加抑制及び摂餌量低下が認められた。FOB、運動機能、眼科学的検査及び神経病理学的検査で検体投与の影響は認められなかった。

JMPR、EPA 及び EU では、有意差は認められなかったものの 12,500 ppm 投与群の雌における運動能低下及び歩行失調を投与による影響として評価している。

本試験において、12,500 ppm 投与群の雌雄で体重増加抑制等が認められたので、無毒性量は雌雄で 1,000 ppm (雄 : 70.3 mg/kg 体重/日、雌 : 87.3 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、4、5、6、8)

(5) 28日間亜急性経皮毒性試験(ラット) <参考資料>

Wistar ラット(一群雌雄各5匹)を用いた経皮(原体: 0及び1,000 mg/kg 体重/日)投与による28日間亜急性経皮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ため、無毒性量は本試験の最高用量の1,000 mg/kg 体重/日であると考えられた。本試験は本剤の標的臓器(子宮、前立腺等)を含んだ組織学的検査が実施されていないため、参考資料とした。(参照: 4、5)

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、20、50、150、500/600⁵ ppm)投与による1年間慢性毒性試験が実施された。

600 ppm 投与群の雌雄でO-DEMの増加、同群雌でN-DEM及びP450の増加、150 ppm 以上投与群の雄でN-DEMの増加が認められたが、薬物代謝酵素誘導による変化であり毒性影響とは考えられなかった。

150 ppm 投与群の雄で精巣の絶対及び比重量増加が認められたが、同群では病理組織学的変化は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。本試験において、150 ppm 以上投与群の雌雄で副腎皮質束状帯空胞化等が認められたため、無毒性量は雌雄とも50 ppm(雄: 1.38 mg/kg 体重/日、雌: 1.52 mg/kg 体重/日)であると考えられた。(参照: 2、4、5、6、8)

(副腎皮質の空胞形成及び雄生殖器への影響に関しては[14.(1)~(13)]を参照)

表 24 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
600 ppm	・精巣の絶対重量及び比重量の増加 ・ライディッチ細胞空胞化	
150 ppm 以上	・副腎皮質束状帯空胞化	・副腎皮質束状帯空胞化*
50 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

*: 統計学的有意差なし

(2) 2年間慢性毒性/発がん性併合試験(ラット)

Wistar ラット[本試験群: 一群雌雄各50匹、慢性毒性試験群: 一群雌雄各10匹(12か月後に中間と殺)]を用いた混餌(原体: 0、50、100、350及び2,500

⁵ 投与開始時は500 ppmであったが、試験開始4週後に600 ppmに増量した。

ppm) 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。また、本試験群の雌雄各 10 匹 (衛星群) を用い、投与 77 週間後に FOB が実施された。

各投与群で認められた毒性所見 (非腫瘍性病変) を表 25 に、投与に関連して増加した腫瘍の発生頻度を表 26 に示した。

2,500 ppm 投与群の雄で T₄ 増加、同群雌で TSH 増加が認められたが、軽微な変化であり、これらのホルモンに関連すると考えられる異常が甲状腺ろ胞上皮細胞に認められないことから、毒性学的意義は低いものと考えられた。

腫瘍性病変では、2,500 ppm 投与群の雄でライディツヒ細胞腫が、雌で子宮腺癌の統計学的に有意な増加が認められた。

投与 77 週間後の FOB では検体投与の影響は認められなかった。

本試験において 2,500 ppm 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 350 ppm (雄: 14.7 mg/kg 体重/日、雌: 19.9 mg/kg 体重) であると考えられた。(参照: 2、4、5、6、8)

(副腎皮質の空胞形成、雄生殖器への影響及び子宮癌の腫瘍発生メカニズムに関しては [14. (1)~(13)] を参照)

表 25 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
2,500 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・ALP 増加 ・空腸上皮細胞空胞形成 ・副腎皮質の束状帯細胞のびまん性肥大及び空胞化 ・ライディツヒ細胞限局性過形成 	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・ALP 増加 ・TG 減少 ・空腸上皮細胞空胞形成
350 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

表 26 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					
	匹数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
投与群 (ppm)		0	50	100	350	2,500	0	50	100	350	2,500
子宮	腺癌	/	/	/	/	/	4	5	3	2	14**
精巣	ライディツヒ細胞腫	2	1	0	4	10**	/	/	/	/	/
ライディツヒ細胞限局性過形成		4	4	4	7	19*	/	/	/	/	/

Fisher 検定; *p<0.05、**p<0.01

(3) 18 か月間発がん性試験 (マウス)

ICR マウス (一群雌雄各 50 匹) を用いた混餌 (原体: 0、25、3,500 及び 7,000

ppm) 投与による 18 か月間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 (非腫瘍性病変) は表 27 に、腫瘍の発生頻度は表 28 に示されている。

腫瘍性病変では、3,500ppm 以上投与群で肝細胞腺腫及び癌並びにその合計が雄で統計学的に有意に増加し、雌で増加傾向が認められた。

本試験において 3,500ppm 以上投与群の雌雄で副腎絶対及び比重量増加等が認められたので、無毒性量は雌雄とも 25 ppm (雄:4.1 mg/kg 体重/日、雌:5.1 mg/kg 体重) であると考えられた。(参照:2、4、5、6、8)

(副腎皮質の空胞形成、雄生殖器への影響及び肝薬物代謝酵素活性への影響に関しては [14. (1)~(13)] を参照)

表 27 18 か月間発がん性試験 (マウス) で認められた毒性所見 (非腫瘍性病変)

投与群	雄	雌
7,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・精巣絶対重量増加 ・副腎の色素沈着 ・精巣上体の無精子症 	<ul style="list-style-type: none"> ・肝絶対重量及び比重量増加
3,500 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・副腎並びに肝絶対及び比重量増加 ・精巣比重量増加 ・副腎皮質空胞化 ・肝細胞肥大 ・精巣のライディッヒ細胞肥大又は過形成 	<ul style="list-style-type: none"> ・副腎絶対重量及び比重量増加 ・副腎皮質空胞化 ・副腎の色素沈着
25 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

表 28 18 か月間発がん性試験 (マウス) における腫瘍の発生頻度

性別		雄				雌			
投与群 (ppm)		0	25	3,500	7,000	0	25	3,500	7,000
検査動物数		50	50	50	50	50	50	50	50
肝細胞	腺腫	0	0	5*	6*	0	0	3	1
	癌	1	1	3	5*	0	0	2	2
	腺腫/癌の合計	1	1	8*	10*	0	0	5*	3

Fisher 検定; *p<0.05

12. 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 25 匹) を用いた混餌 (原体:0、70、350 及び 1,750 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 29 に示されている。

親動物において、1,750 ppm 投与群で F₁ 雄の 4 例に精巣及び精巣上体の萎縮

が認められ、同世代では精子細胞数及び精子数の減少が認められた。上記4例の雄のうち2例では交尾が成立せず、残り2例では交尾は成立したが雌の妊娠は成立しなかった。

本試験において、親動物では350 ppm以上投与群の雄で体重増加抑制、雌で副腎皮質束状帯空胞化が、児動物では350 ppm以上投与群の雌雄で低体重等が認められたので、一般毒性に対する無毒性量は親動物及び児動物で雌雄とも70 ppm (P雄: 5.2 mg/kg 体重/日、P雌: 5.5 mg/kg 体重/日、F₁雄: 6.4 mg/kg 体重/日、F₁雌: 7.0 mg/kg 体重/日) であると考えられた。また、1,750 ppmにおいて生殖器官の萎縮及び精子数減少が認められたので、繁殖に対する無毒性量は、350 ppm (P雄: 26.2 mg/kg 体重/日、P雌: 27.6 mg/kg 体重/日、F₁雄: 30.2 mg/kg 体重/日、F₁雌: 34.4 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照: 2、4、5、6、8)

(副腎皮質の空胞形成及び雄生殖器への影響に関しては [14. (1)~(13)] を参照)

表 29 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	1,750 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・副腎皮質束状帯空胞化（粗大）* ・空腸絨毛末端部の細胞質空胞化* ・副腎及び精巣比重量増加 	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・副腎比重量増加 	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・ALP 増加 ・UFA 減少 ・精巣上体及び前立腺絶対重量減少 ・精囊、前立腺、精巣上体及び精巣の小型化 ・精巣及び精巣上体のび慢性萎縮*（生殖細胞無形成、ライディッヒ細胞増生） ・精子数及び精子細胞数減少 ・精巣上体で精子減少症 ・副腎比重量増加 ・副腎皮質束状帯空胞化（粗大）* 	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・ALP 増加 ・Chol 及び TG 減少 ・副腎絶対及び比重量増加
	350 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 	<ul style="list-style-type: none"> ・副腎皮質束状帯空胞化（微細）* 	<ul style="list-style-type: none"> ・Chol 及び TG 減少 	<ul style="list-style-type: none"> ・UFA 減少 ・副腎皮質束状帯空胞化（微細）*
	70 ppm	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	1,750 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・包皮分離遅延 		<ul style="list-style-type: none"> ・低体重（新生児） 	<ul style="list-style-type: none"> ・同腹児重量減少（離乳時） ・体重増加抑制
	350 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・低体重（出生時） ・体重増加抑制 	<ul style="list-style-type: none"> ・低体重（出生時） ・体重増加抑制 	<ul style="list-style-type: none"> ・低体重（出生時） 	<ul style="list-style-type: none"> ・低体重（出生時）
	70 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし	毒性所見なし	毒性所見なし

*：有意差なし

(2) 発生毒性試験（ラット）

Wistar ラット（一群雌 28 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：0.5%CMC 水溶液）投与して発生毒性試験が実施された。

母動物及び胎児で検体投与の影響は認められなかったので、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 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、4、5、6、8）

(3) 発生毒性試験（ウサギ）

ヒマラヤンウサギ（一群雌 16 匹）の妊娠 6～28 日に強制経口（原体：0、100、

300 及び 1,000 mg/kg 体重/日、溶媒：0.5%CMC 水溶液) 投与して発生毒性試験が実施された。

母動物では 1,000 mg/kg 体重/日投与群に脱毛、退色尿、飲水量・尿量減少が、また 1 例で流産が認められた。300 mg/kg 体重/日以上投与群で摂餌量低下、糞排泄量減少及び体重増加抑制が認められた。

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、4、5、6、8)

(4) 発達神経毒性試験① (ラット)

Wistar ラット (一群雌 30 匹) の雌動物の妊娠 0 日から児動物の哺育 21 日まで混餌 (原体：0、70、350 及び 1,500 ppm) 投与して出生児について発達神経毒性試験が実施された。

母動物では、1,500 ppm 投与群の哺育期間中で体重増加抑制が認められた。母動物の FOB に検体投与による影響は認められなかった。

児動物では、1,500 ppm 投与群の哺育期間中で体重増加抑制及び摂餌量低下が認められた。児動物の FOB、神経行動学的検査、神経組織の病理組織学的検査等に検体投与による影響は認められなかった。児動物 (各腹雌雄各 1 匹) で実施されたモリス水迷路試験の 70 及び 350 ppm 投与群の雌において、記憶保持段階の基準達成までの試行数が有意に増加したが、用量相関性がなかったことから、偶発的なもので投与による影響とは考えられなかった。

本試験において、1,500 ppm 投与群の母動物及び児動物で哺育期間中の体重増加抑制等が認められたので、無毒性量は母動物及び児動物ともに 350 ppm (32.1 mg/kg 体重/日) であると考えられた。発達神経毒性は認められなかった。

(参照：2、4、5、6、8)

(5) 発達神経毒性試験② (ラット)

Wistar ラット (一群雌 30 匹) の雌動物の妊娠 0 日から児動物の哺育 21 日まで混餌 (原体：0、70、350 及び 1,500 ppm) 投与して出生児について発達神経毒性試験が実施された。本試験は、先に実施された発達神経毒性試験①[12. (4)] において認められた脳の形態変化及び記憶学習能への影響を確認するため実施された。

母動物では、検体投与による影響は認められなかった。

児動物では、1,500 ppm 投与群の雌雄で哺育期間中の体重増加抑制、同群の雄で離乳後の体重増加抑制が認められた。児動物 (各腹雌雄各 1 匹) で、モリス水迷路試験に加えてシンシナティ水迷路試験が実施されたが、検体投与による影響は認められなかった。児動物 (一群雌雄各 10 匹) で脳重量の測定及び脳の計

測（肉眼的及び鏡検的）が実施されたが、検体投与による影響は認められなかった。

本試験において、母動物では検体投与による影響は認められず、1,500 ppm 投与群の児動物で哺育期間中の体重増加抑制等が認められたので、無毒性量は母動物で本試験の最高用量 1,500 ppm (119 mg/kg 体重/日)、児動物で 350 ppm (28.6 mg/kg 体重/日) であると考えられた。発達神経毒性は認められなかった。（参照：2、6、8）

13. 遺伝毒性試験

スピロジクロフェン（原体）の細菌を用いた復帰突然変異試験、チャイニーズハムスター由来 V79 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 30 に示されているとおり、すべて陰性であった。スピロジクロフェンに遺伝毒性はないものと考えられた。（参照：2、4、5、6、8）

表 30 遺伝毒性試験結果概要（原体）

試験	対象	投与量・処理濃度	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> (WP2uvrA/pKM101 株)	313～5,000* µg/7° 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由来 V79 細胞 (<i>Hprt</i> 遺伝子)	4～20 µg/mL (-S9) 10～80 µg/mL (+S9)	陰性
	染色体異常試験 チャイニーズハムスター由来 V79 細胞	0.75～3 µg/mL (-S9) 20～80 µg/mL (+S9)	陰性
<i>in vivo</i>	小核試験 NMRI マウス（骨髄細胞） （一群雌雄各 5 匹）	800 mg/kg 体重 （1 回腹腔内投与）	陰性

+/-S9：代謝活性化系存在下及び非存在下

*：2,500 µg/7° レット以上で針状結晶が析出

代謝物 M1、M9 及び M14 の細菌を用いた復帰突然変異試験が実施された。

結果は表 31 に示されているとおり、試験結果はすべて陰性であった。（参照：2、4、8）

表 31 遺伝毒性試験結果概要（代謝物）

代謝物	試験	対象	処理濃度・投与量	結果
M1	in vitro	復帰突然変異試験 <i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、TA102、 TA1535、TA1537 株)	16～5,000 µg/プレート (+/-S9)	陰性
M9		復帰突然変異試験 <i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、TA102、 TA1535、TA1537 株)	16～5,000 µg/プレート (+/-S9)	陰性
M14		復帰突然変異試験 <i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、TA102、 TA1535、TA1537 株)	5～5,000 µg/プレート (+/-S9)	陰性

+/-S9：代謝活性化系存在下及び非存在下

14. その他の試験

スピロジクロフェンの投与により、ラット、マウス及びイヌの副腎及び精巣等に病理組織学的変化が認められ、ラットを用いた2年間慢性毒性/発がん性併合試験の雄でライディツヒ細胞腫が、雌で子宮腺癌が増加、マウスを用いた18か月発がん性試験の雌雄で肝細胞腺腫及び癌並びにその合計に増加が認められた。スピロジクロフェン及び代謝物のステロイド合成阻害及び肝薬物代謝酵素活性への影響を検討する以下のメカニズム試験が実施された。

(1) 2年間慢性毒性/発がん性併合試験（ラット）におけるスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の血漿中濃度

2年間慢性毒性/発がん性併合試験（ラット）[11.(2)]において各投与群（雌雄10匹）の投与82週間後の血漿が採取され、スピロジクロフェン及びM1の濃度が測定された。

血漿中にスピロジクロフェンは検出されず、M1は用量依存的に0.4～64.2 nmol/mL存在した。スピロジクロフェンは血漿及び肝臓中で容易にM1に分解されると考えられた。（参照：2、8）

(2) ラットにおけるスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の血漿中濃度並びに副腎及び肝臓中の Chol 及び TG 測定

Wistar ラット（一群雄10匹）に4週間混餌（原体：0、1,000及び5,000 ppm）投与し、スピロジクロフェン及びM1の血漿中濃度並びに副腎及び肝臓中のChol及びTGを測定する試験が実施された。

スピロジクロフェンは速やかに代謝されM1に変換されるため、血漿中にスピロジクロフェンは検出されず、M1のみが検出された。

副腎中のChol濃度増加には用量相関性があり、統計学的有意差が認められた。肝臓中のChol及びTG濃度に変化は認められなかった。

ある種のステロイド合成阻害剤により惹起された副腎皮質の病変は、未代謝の

ステロイド前駆体が細胞質に過剰に蓄積し、皮質細胞の肥大を特徴とする⁶と考えられており、本試験における副腎中 Chol 増加と副腎皮質の空胞化との関連が示唆された。(参照：2、8)

(3) 1年間慢性毒性試験(イヌ)におけるスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の血漿及び尿中濃度

1年間慢性毒性試験(イヌ) [11. (1)] において 600 ppm 投与群の投与 20 週間後の血漿(雌雄各 4 匹、投与 0~24 時間後)及び投与 28 週間後の尿(雄 1 匹、雌 3 匹、投与後 5 時間)が採取され、スピロジクロフェン及び M1 の濃度が測定された。

血漿中にスピロジクロフェンは検出されず、M1 は投与 7 及び 24 時間後で 25.0~32.4 nmol/mL で維持され、M1 は血漿中に一定濃度で存在していると考えられた。

尿中のスピロジクロフェンは、尿の容量不足により測定不能であった。尿中に M1 は 0.05~0.46 µmol/mL 認められた。(参照：2、8)

(4) イヌにおける 8 週間混餌投与による Chol、ホルモン等への影響

ビーグル犬(一群雄 5 匹)に 8 週間混餌(原体：0、100 及び 2,000 ppm)投与し、Chol 及びホルモンへの影響を確認する試験が実施された。

2,000 ppm 投与群で AST、ALT、ALP 及び GDH 増加が認められた。投与により、血中テストステロンには有意な変動はみられなかったが、LH 値は 2,000 ppm 投与群で投与期間を通じ対照群の 2 倍程度以上に上昇した。肝臓組織中では 2,000 ppm 投与群で ECOD 及び ALD 増加が認められたほか、テストステロンの水酸化反応では 16 α -水酸化酵素の増加が僅かに認められたが、雄生殖器の病態をテストステロンの水酸化反応の誘導だけでは説明できないと考えられた。

2,000 ppm 投与群では血漿中 Q10 減少並びに血漿中及び肝臓中の α -トコフェロール濃度減少が認められ、HMG-CoA レダクターゼへの作用が考えられたが、非常に僅かであったため、イヌの雄生殖器で認められた所見を説明できるとは考えられなかった。

他に 2,000 ppm 投与群の精巣でライディッヒ細胞の肥大及び空胞化並びに胚上皮変性、100ppm 以上投与群の副腎で副腎皮質空胞化が認められた。

以上より、スピロジクロフェン投与は、テストステロン代謝系よりステロイド合成系に変動を及ぼすことが示唆された。(参照：2、4、8)

(5) ラットにおける 19 週間混餌投与によるホルモン濃度への影響

Wistar ラット(一群雌 15 匹)に 19 週間混餌(原体：0、2,500 及び 10,000 ppm)

⁶ Capen, C.C. *et al.* (1991), Endocrine System, Handbook of Toxicological Pathology, 675-697, Academic Press, Inc.

投与し、ホルモン濃度（テストステロン、E2、LH、PROG、E/P 比、発情間期に測定）等への影響を確認する試験が実施された。

10,000 ppm 投与群では、E2 及び PROG の減少が認められ、スピロジクロフェン投与の影響と考えられた。PROG 減少に伴い投与 13 及び 17 週後で E/P 比が増加した。また、同群では副腎比重量の増加が認められた。試験期間中、E/P 比の増加あるいは増加傾向が 10,000 ppm で認められた。なお、E2 及び PROG の減少はスピロジクロフェン投与終了後には回復が認められた。

E/P 比の持続的な上昇、すなわち相対的な高エストロゲン状態の持続はラット子宮癌の発生を増加させると報告⁷されている。本剤投与による持続発情の発現は確認されていないものの、ラット発がん性試験において膺の角化を示す個体が増加している。これらの結果を考え併せた結果、ラット発がん性試験で観察された子宮癌増加の機序として、投与により生じた相対的な高エストロゲン状態の持続が関連している可能性が示唆された。（参照：2、3、8）

(6) スピロジクロフェン及び代謝物 (M1 及び M4) の ER 結合試験、ER 及び AR 転写活性化試験

スピロジクロフェン投与による副腎及び精巣への組織学的変化が ER 又は AR を介した内分泌かく乱作用によるものか調べるため、ER 結合試験、ER 及び AR 転写活性化試験が実施された。

スピロジクロフェン、M1 及び M4 にヒト ER α 及び β に対する親和性は認められなかった。

スピロジクロフェン、M1 及び M4 には、ヒト乳癌由来細胞 (MCF-7) 及びヒト前立腺癌由来細胞 (PC-3) を用いたルシフェラーゼ遺伝子をレポーターに組み込んだ転写活性化試験において、ER 又は AR を介した転写活性が認められなかったことからホルモン作用はないと考えられた。（参照：2、5、8）

(7) スピロジクロフェン及び代謝物 (M1) のコレステロールエステラーゼ阻害作用 (*in vitro* 試験)

スピロジクロフェン投与によってステロイド産生組織におけるステロイド合成の干渉作用の作用機作にコレステロールエステラーゼへの影響が関与するか検討された。

スピロジクロフェン及び M1 のコレステロールエステラーゼ活性が *Shoupe* らの方法⁸の改良法によって測定され、スピロジクロフェン及び M1 の IC₅₀ 値が測定された。

⁷ Maekawa, A., Ando, J., Takahashi, M., Yoshida, M. (1999). Uterine carcinogenesis by chemicals/hormones in rodents. *J Toxicol Pathol*, 12:1-11.

⁸ Shoupe TS *et al.* (1980) The nature of the inhibition of cholesterol esterase by delta 1-tetrahydrocannabinol. *Mol Pharmacol* 15:633-640

スピロジクロフェンは濃度依存的にコレステロールエステラーゼを阻害し、 IC_{50} は12~43 μM であった。M1のコレステロールエステラーゼ阻害活性は非常に低く、生体中で意味がある阻害活性とは考えられなかった。

スピロジクロフェンは投与された動物の血中では検出されず、血漿中の主な成分はM1であった。したがって、スピロジクロフェンを投与した動物におけるステロイドホルモンの合成に対する干渉はコレステロールエステラーゼの段階では説明がつかず、むしろ別の作用機作であると考えられた。(参照:2、8)

(8) ラット動的精巣細胞組織培養系におけるスピロジクロフェン及び代謝物(M1、M3及びM4)のステロイド産生に対する影響

スピロジクロフェンによるステロイド合成の干渉作用は、スピロジクロフェン及び代謝物(M1及びM4)のER結合試験、ER及びAR転写活性化試験[14.(6)]より核内の性ホルモンレセプターを介した作用ではないことが示されたため、その作用機作を検討するためにラット動的精巣細胞培養系⁹を用いたスピロジクロフェン及び代謝物(M1、M3及びM4)のテストステロン合成への影響が検討された。

スピロジクロフェンのテストステロン合成の抑制作用は変動が大きく、明確に示されなかった。

主要代謝物M1は、ラット動的精巣細胞培養系でテストステロン合成を強く抑制し、M3及びM4には弱い抑制作用が認められた。

スピロジクロフェンを投与した動物の血漿中にスピロジクロフェン、M3及びM4は認められず、主要成分はM1であったことから、M1がミトコンドリアへのコレステロール輸送より下流でステロイド合成を干渉すると考えられた。(参照:2、8)

(9) 精巣ミクロソーム画分におけるスピロジクロフェン及び代謝物(M1、M3及びM4)のデヒドロゲナーゼに対する影響(*in vitro*試験)

スピロジクロフェン及び代謝物(M1、M3及びM4)のチトクロームP-450依存ミクロソームデヒドロゲナーゼへの影響が検討された。

Wistarラット精巣のミクロソーム画分を用いて、スピロジクロフェン及び代謝物(M1、M3及びM4)の 3β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ- $\Delta^4,5$ -イソメラーゼ及び 17β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ活性の阻害率が測定された。

その結果、スピロジクロフェン、M1、M3及びM4の 17β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ活性に対する影響は認められなかった。スピロジクロフェ

⁹ Smith PF *et al.* (1986) Maintenance of adult rat liver slices in dynamic organ culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 22:706-712

ンは、 3β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ- $\Delta^{4,5}$ -イソメラーゼに対して弱い阻害活性を示したが、M1、M3 及び M4 は阻害しなかった。

スピロジクロフェンを投与した動物の血漿中にスピロジクロフェンは検出されないことから、生体内でスピロジクロフェンが 3β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ- $\Delta^{4,5}$ -イソメラーゼを阻害することによって、ステロイド合成を干渉するとは考えられなかった。(参照：2、8)

(10) 精巣ミクロソーム画分におけるスピロジクロフェン及び代謝物 M1 のモノオキシゲナーゼに対する影響 (*in vitro* 試験)

スピロジクロフェン及びM1のチトクロームP-450依存ミクロソームモノオキシゲナーゼ (17α -モノオキシゲナーゼ、C-17 及び 20α -リアーゼ) への影響が検討された。

Wistar ラット精巣のミクロソーム画分を用いて、スピロジクロフェン及びM1の 17α -モノオキシゲナーゼ、C-17 及び 20α -リアーゼ活性の阻害率が測定された。

その結果、スピロジクロフェン及びM1について、 17α -モノオキシゲナーゼ、C-17 及び 20α -リアーゼに対する影響は認められなかったことから、スピロジクロフェン投与ラットの血漿中 PROG 低下は、ミクロソームモノオキシゲナーゼ阻害によるものではないと考えられた。(参照：2、8)

(11) ラット動的精巣細胞組織培養系におけるスピロジクロフェン及び代謝物 (M1、M3 及び M4) のリンゴ酸デヒドロゲナーゼへの影響 (*in vitro* 試験)

精巣ミクロソーム画分におけるスピロジクロフェン及び代謝物 (M1、M3 及び M4) のデヒドロゲナーゼに対する影響 (*in vitro* 試験) [14. (9)] から、主要代謝物 M1 は、ラット精巣細胞のテストステロン合成において、コレステロールのミトコンドリアへの輸送よりも下流を阻害すると考えられた。このことから、スピロジクロフェン及びM1のミトコンドリアにおけるコレステロール側鎖切断への影響について検討された。

Wistar ラット精巣のミトコンドリア画分を用いて、スピロジクロフェン及び代謝物 (M1、M3 及び M4) のコレステロール側鎖切断が検討された結果、M1 のみにコレステロール側鎖切断の抑制が認められた。

スピロジクロフェン及び代謝物 (M1、M3 及び M4) のミクロソームデヒドロゲナーゼに対する影響 (*in vitro* 試験) [14. (9)] の結果から M1 の作用点は、チトクローム P-450 依存ミトコンドリアのコレステロール側鎖切断酵素 ($P-450_{\text{sc}}$) との直接の作用ではないことから、ミトコンドリアのチトクローム $P-450_{\text{sc}}$ に NADPH を供給するミトコンドリアのリンゴ酸デヒドロゲナーゼ及び細胞質のリンゴ酸-クエン酸シャトルの下流のリンゴ酸デヒドロゲナーゼへの影響が検討された。その結果、M1 はミトコンドリア及び細胞質でリンゴ酸デヒドロゲナーゼを阻害すると考えられた。

スピロジクロフェンによるテストステロン合成抑制は、代謝物 M1 によるミトコンドリア及び細胞質におけるリンゴ酸デヒドロゲナーゼアイソザイム阻害によるコレステロール側鎖切断酵素 (P-450_{sc}) への NADPH 供給の抑制と考えられた。(参照：2、8)

(12) 代謝物 M1 のラット精巣ミトコンドリア内の NADH 及び NADPH の量に対する影響

ラット動的精巣細胞組織培養系におけるスピロジクロフェン及び代謝物 (M1、M3 及び M4) のリンゴ酸デヒドロゲナーゼへの影響 (*in vitro* 試験) [14. (11)] から、M1 はミトコンドリア及び細胞質のリンゴ酸デヒドロゲナーゼを阻害し、コレステロール側鎖切断酵素 (P-450_{sc}) へ NADPH の供給を抑制することによって、ステロイド合成を干渉すると考えられたので、代謝物 M1 の NADH 及び NADPH 量に与える影響が検討された。

その結果、M1 はラット精巣ミトコンドリア画分のリンゴ酸デヒドロゲナーゼを競合的に阻害し、NADH 濃度の低下に続き NADPH 濃度を低下させると考えられた。(参照：2、8)

(13) スピロジクロフェン投与マウスにおける肝薬物代謝酵素及びステロイド合成系遺伝子の発現への影響

18 か月間発がん性試験 (マウス) [11. (3)] のマウス肝臓で認められた腫瘍と肝薬物代謝酵素の誘導との関連性を調べるために ICR マウス (一群雌雄各 10 匹) に 2 週間混餌 (原体：0、500、3,500 及び 7,000 ppm) 投与し、投与 2 週間後に肝薬物代謝酵素 (ECOD、EROD、ALD、EH、GST 及び GLUT) 活性が測定された。また、ステロイドホルモン産生組織における病変とステロイド合成系酵素の関連を調べるために、副腎及び精巣におけるステロイド合成系の 9 遺伝子の発現が定量 PCR で測定された。

スピロジクロフェン投与により肝臓の薬物代謝酵素の誘導が認められ、7,000 ppm 投与群の雌で EROD、ALD 及び EH 増加、3,500 ppm 以上投与群の雄で ECOD、EROD 及び ALD 増加、雌で ECOD 及び GST 増加が認められた。7,000 ppm 投与群の雌雄では肝臓の絶対及び比重量増加が認められた。

ステロイド合成系関連の 9 遺伝子の発現抑制は認められなかったが、7,000 ppm 投与群では *Cyp11a1*¹⁰、*cytochrome P450 17-alpha hydroxylase/ C17-20 lyase* (*Mus musculus*)、*Cyp11b2*¹¹ 及び *Cyp21a1*¹² の発現が上昇しており、ステロイド合成阻害に対する代償作用が示唆された。(参照：2、8)

¹⁰ cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1 (*Mus musculus*)

¹¹ cytochrome P450, family 11, subfamily b, polypeptide 2 (*Mus musculus*)

¹² cytochrome P450, family 21, subfamily a, polypeptide 1 (*Mus musculus*)

メカニズム試験のまとめ

スピロジクロフェン及び代謝物のステロイド合成阻害及び肝薬物代謝酵素活性への影響を検討するため実施された多くのメカニズム試験より、スピロジクロフェン及び代謝物は、核内の ER 又は AR を介したホルモン作用を有さず、ステロイド合成阻害を示すと考えられた。動物に投与されたスピロジクロフェンは、速やかに代謝され血中には検出されないことから、作用発現には主要代謝物 M1 が寄与すると考えられた。

スピロジクロフェンによるステロイド合成阻害は、M1 によるミトコンドリア及び細胞質におけるリンゴ酸デヒドロゲナーゼアイソザイム阻害によるコレステロール側鎖切断酵素 (P-450_{scc}) への NADPH 供給減少によるコレステロール利用の低下によると考えられた。

ラット、イヌ及びマウスで認められた精巣毒性は上記のメカニズムによる可能性が高いと考えられた。ラットの精巣ライディッヒ細胞腫の発がんメカニズムにもこのステロイド合成阻害が係わっている可能性もあるが、発がん機序の詳細は明らかにならなかった。ラット子宮癌増加の機序として、相対的な高エストロゲン状態の持続が関連している可能性が示唆された。マウスでは肝薬物代謝酵素が誘導されたが、肝腫瘍増加との関連は明らかにはならなかった。

Ⅲ. 食品健康影響評価

参照に挙げた資料を用いて、農薬「スピロジクロフェン」の食品健康影響評価を実施した。

¹⁴C で標識されたスピロジクロフェンのラットを用いた動物体内運命試験において、尿、胆汁及び胃腸管を除く動物体中の残留放射能から推定された吸収率は、雄で 62.4%であった。投与後 48 時間で 90%TRR 以上が尿及び糞中へ排泄された。低用量投与群の主要排泄経路は尿中であり、高用量投与群では糞中排泄率が尿中よりも高く、高用量では消化管からの吸収が不完全であると考えられた。

¹⁴C で標識したスピロジクロフェンの畜産動物（ヒツジ）を用いた動物体内運命試験の結果、組織中の残留放射能には未変化のスピロジクロフェンは認められず、M1 が 80%TRR 以上（筋肉：0.057 µg/g、脂肪：0.121 µg/g、腎臓 2.78 µg/g、肝臓 0.633 µg/g、乳汁：0.097 µg/g）認められた。

¹⁴C で標識されたスピロジクロフェンを用いた植物体内運命試験の結果、残留放射能の主要成分はスピロジクロフェンであり、配糖体 M13 が 12.2%TRR (0.14 mg/kg) 認められた以外に 10%TRR を超える代謝物は認められなかった。

国内で実施された試験におけるスピロジクロフェンの最高値は、最終散布 14 日後に収穫された茶（荒茶）の 12.0 mg/kg であった。また、代謝物 M9 はいずれも 0.04 mg/kg 未満、M12 及び M13 の合計値の最高値は最終散布 28 日後に収穫された温州みかん（果皮）の 0.76 mg/kg であった。

海外で栽培されている農産物において、スピロジクロフェンの最高値は、最終散布 14 日後に収穫されたホップ（毬花）の 24 mg/kg であった。

各種毒性試験結果から、スピロジクロフェン投与による影響は、主に副腎（皮質空胞化）及び精巣（ライディッヒ細胞肥大等）に認められた。催奇形性、神経毒性、発達神経毒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、ラットの雄でライディッヒ細胞腫が、雌で子宮腺癌が増加、マウスの雄で肝細胞腺腫及び癌が増加したが、遺伝毒性試験ではすべて陰性の結果が得られており、ラット及びマウスで認められた腫瘍発生機序は遺伝毒性によるものとは考え難く、評価に当たり閾値を設定することは可能であると考えられた。2 世代繁殖試験において、F₁ 世代の雄に生殖器官の萎縮及び精子数減少など繁殖への影響が認められた。

各種試験結果から、農産物中の暴露評価対象物質をスピロジクロフェン（親化合物のみ）、畜産物中の暴露評価対象物質をスピロジクロフェン及び M1 と設定した。

各評価機関の評価結果及び各試験における無毒性量等は表 32 に示されている。

イヌを用いた 90 日間亜急性毒性試験の雌で無毒性量が設定できなかったが、より低い用量で長期間検討された 1 年間慢性毒性試験では無毒性量が設定できた（雄 1.38 mg/kg 体重/日、雌 1.52 mg/kg 体重/日）。

食品安全委員会は、各試験の無毒性量のうち最小値がイヌを用いた 1 年間慢性毒性試験の 1.38 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