

	ALP、T.Bil 及び GGT 増加 ・ 貧血による結膜蒼白 ・ 肝比重量増加、肝細胞肥大及び肝クッパー細胞色素沈着	加 ・ 肝細胞肥大及び肝クッパー細胞色素沈着
200 mg/kg 体重/日 以上	200 mg/kg 体重/日以下毒性所見なし	・ 血清中 TP、Alb、血清中 Alb 分画及び分画量減少、A/G 比減少 ・ 肝比重量増加
40 mg/kg 体重/日 以下		毒性所見なし

(3) 28 日間亜急性毒性試験(ラット)

Fischer ラット (一群雌雄各 5 匹) を用いた混餌 (原体: 0、50、500、7,000、20,000 及び 50,000 ppm: 平均検体摂取量は表 10 参照) 投与による 28 日間亜急性毒性試験が実施された。

表 10 28 日間亜急性毒性試験 (ラット) の平均検体摂取量

投与群		50 ppm	500 ppm	7,000 ppm	20,000 ppm	50,000 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	4.5	45.1	621	1,870	4,920
	雌	4.6	47.8	656	1,860	4,890

各投与群で認められた毒性所見は表 11 に示されている。

本試験において、7,000 ppm 以上投与群の雌雄で PLT 増加等が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 500 ppm (雄: 45.1 mg/kg 体重/日、雌: 47.8 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 40, 79)

表 11 28 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
50,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ 死亡 (1 例) ・ 体重増加抑制 ・ 血清中 T.Chol、コレステロールエステル及び PL 増加 ・ 甲状腺ろ胞細胞過形成 	<ul style="list-style-type: none"> ・ Ht 及び Hb 減少 ・ 甲状腺ろ胞細胞過形成
20,000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ Hb、MCV、MCH 及び MCHC 減少 ・ 血清中遊離 Chol 増加 ・ 肝肥大、小葉中心性肝細胞肥大、肝細胞単細胞壊死、肝細胞分裂像増加及び肝細胞空胞化 ・ 腎、精巣比重量増加 	<ul style="list-style-type: none"> ・ MCV 減少 ・ TP、GGT、血清中遊離 Chol 増加、T.Chol 及び PL 増加 ・ 肝比重量増加、肝肥大、小葉中心性肝細胞肥大、肝細胞単細胞壊死、肝細胞分裂像増加 ・ 腎比重量増加

7,000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ PLT 増加 ・ 血清中 TP 増加 ・ 肝比重量増加 	<ul style="list-style-type: none"> ・ PLT 増加 ・ コレステロールエステル増加 ・ 遊離脂肪酸減少
500 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

(4) 28 日間亜急性毒性試験 (マウス)

B6C3F1 マウス (一群雌雄各 5 匹) を用いた混餌 (原体: 0、50、500、7,000、20,000 及び 50,000ppm: 平均検体摂取量は表 12 参照) 投与による 28 日間亜急性毒性試験が実施された。

表 12 28 日間亜急性毒性試験 (ラット) の平均検体摂取量

投与群		50 ppm	500 ppm	7,000 ppm	20,000 ppm	50,000 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	10.7	105	1,410	3,970	9,470
	雌	12.7	120	1,610	4,380	10,800

各投与群で認められた毒性所見は表 13 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単細胞壊死等が認められたので、無毒性量は雌雄とも 50 ppm (雄: 10.7 mg/kg 体重/日、雌: 12.7 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 39, 79)

表 13 28 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
50,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ 摂餌量減少、体重増加抑制 ・ MCV 及び MCH 減少 ・ 副腎比重量増加及び副腎皮質/髄質細胞肥大 ・ 胸腺比重量減少及び胸腺萎縮 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 摂餌量減少 ・ RBC、Hb、MCV、MCH、及び MCHC 減少、PLT 増加 ・ 胸腺比重量減少 ・ 副腎比重量増加及び副腎皮質/髄質細胞肥大
20,000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ MCH 減少 ・ 肝比重量増加 	<ul style="list-style-type: none"> ・ Ht 減少 ・ 卵巣比重量減少 ・ 肝細胞分裂像増加、肝細胞核異型化
7,000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ PLT 増加 ・ 小葉中心性肝細胞肥大、肝細胞巣状細胞壊死及び肝細胞核異型化 ・ 前胃角化亢進 ・ 腎比重量減少 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 小葉中心性肝細胞肥大、肝比重量増加及び肝細胞空胞化 ・ 前胃角化亢進
500 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ 肝細胞単細胞壊死、肝細胞巣状細胞壊死、肝細胞空胞化及び肝細胞分裂像増加 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 肝細胞単細胞壊死

50 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし
--------	--------	--------

(5) 28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、2,000 及び 20,000 ppm：平均検体摂取量は表 14 参照）投与による 28 日間亜急性神経毒性試験が実施された。

表 14 28 日間亜急性神経毒性試験（ラット）の平均検体摂取量

投与群		200 ppm	2,000 ppm	20,000 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	17.7	174	1,850
	雌	19.3	186	1,850

本試験において、20,000 ppm 投与群の雄で体重増加抑制及び食餌効率の低下が認められたことから、無毒性量は雄で 2,000 ppm (174 mg/kg 体重/日)、雌で 20,000 ppm (1,850 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 38)

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）を用いたカプセル経口（原体：0、4、40 及び 400 mg/kg 体重/日）投与による 1 年間慢性毒性試験が実施された。

いずれの投与群においても毒性所見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 400 mg/kg 体重/日であると考えられた。(参照 41)

(2) 2年間慢性毒性/発がん性併合試験（ラット）

Fischer ラット（慢性毒性試験群：一群雌雄各 30 (26、52、78 週にて雌雄各 10 匹ずつ計画殺) 匹、発がん性試験群：一群雌雄各 50 匹）を用いた混餌（原体：0、50、200 及び 5,000 及び 10,000 ppm：平均検体摂取量は表 15 参照）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。

表 15 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験（ラット）の平均検体摂取量

投与群		50 ppm	200 ppm	5,000 ppm	10,000 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	2.5	9.9	250	518
	雌	3.2	12.5	318	649

各投与群で認められた毒性所見（非腫瘍性病変）は表 16 に示されている。腫瘍性病変としては、10,000 ppm 投与群の雄で肝細胞腺腫、5,000 ppm 以上

投与群の雌で子宮腺癌の有意な増加が認められた (表 17)。

本試験において、5,000 ppm 以上投与群の雌雄で肝、腎及び副腎比重量増加等が認められたので、無毒性量は雌雄とも 200 ppm (雄: 9.9 mg/kg 体重/日、雌: 12.5 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 42, 80)

表 16 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
10,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ 食餌効率低下及び軟便尾部結節 ・ Ht 及び Hb 減少 ・ 脾臓萎縮 ・ 腎リンパ球浸潤、腎硝子様円柱、腎線維化及び腎移行上皮過形成ハーダー腺腔拡張 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 食餌効率低下及び摂餌量増加 ・ 脾臓萎縮 ・ 腎リンパ球浸潤及び好塩基性尿細管
5,000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ 摂餌量増加 ・ MCV 及び MCH 減少、PLT 増加 ・ 血清中 TP 及び GGT 増加 ・ 肝比重量増加、肝細胞脂肪化、肝細胞肥大、肝海綿性変性及び肝変異細胞巢 ・ 腎及び副腎比重量増加、腎結石、慢性腎症、尿細管拡張、腎硝子滴変性 ・ 甲状腺ろ胞上皮細胞過形成 	<ul style="list-style-type: none"> ・ RBC、PLT、Ht、Hb、MCV 及び MCH 減少 ・ 血清中カルシウム、T.Chol、遊離 Chol、PL、血清中 TP 及び GGT 増加 ・ 肝比重量増加、肝細胞脂肪化、肝細胞肥大及び肝マクロファージ/泡沫細胞集簇 ・ 甲状腺ろ胞上皮細胞過形成 ・ ハーダー腺腔拡張 ・ 腎及び副腎比重量増加、糸球体硬化、腎結石、腎硝子様円柱及び腎褐色色素沈着
200 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

表 17 肝臓及び子宮における腫瘍性病変の発生頻度

投与量	雄					雌				
	0	50	200	5,000	10,000	0	50	200	5,000	10,000
所見/検査動物数	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
肝細胞腺腫	1	2	2	2	8*	4	0	2	1	2
肝細胞腺癌	0	2	0	0	2	0	0	0	1	0
子宮腺腫	-	-	-	-	-	1	0	2	2	0
子宮腺癌	-	-	-	-	-	3	3	4	13*	12*

Fisher の直接確率検定、* : $p \leq 0.05$

検査動物数は、発がん性試験群及び慢性毒性試験群 (52 週、78 週) の合計である。

(3) 2年間発がん性試験 (マウス)

B6C3F1 マウス (発がん性試験群：一群雌雄各 50 匹、衛星群：一群雌雄各 20 匹 (52、78 週にて雌雄各 10 匹ずつ計画殺) を用いた混餌 (原体：0、20、100、2,500 及び 5,000 ppm：平均検体摂取量は表 18 参照) 投与による 2 年間発がん性試験が実施された。

表 18 2 年間発がん性試験 (マウス) の平均検体摂取量

投与群		20 ppm	100 ppm	2,500 ppm	5,000 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	2.7	13.7	358	731
	雌	3.7	18.6	459	928

各投与群で認められた毒性所見 (非腫瘍性病変) は表 19 に示されている。

腫瘍性病変としては、5,000 ppm 投与群の雄で甲状腺ろ胞細胞腺腫が、2,500 ppm 以上投与群の雌雄で肝細胞腺腫が、雄で肝芽細胞腫、肝細胞癌の有意な増加が認められた (表 20)。

本試験において、2,500 ppm 以上投与群の雌雄で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：13.7 mg/kg 体重/日、雌：18.6 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 43)

表 19 2 年間発がん性試験 (マウス) で認められた毒性所見 (非腫瘍性病変)

投与群	雄	雌
5,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ 死亡率増加 ・ 削瘦、立毛、蒼白及び呼吸促迫 ・ 腎尿細管空胞変性減少及び腎褐色色素沈着 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 肝細胞核大小不同性、肝マクロファージ集簇、肝炎症性細胞浸潤、肝細胞巣状壊死及び肝細胞単細胞壊死 ・ 卵巣萎縮
2,500 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制 ・ 食餌効率の低下 ・ PLT 及び骨髓巨核球増加 ・ 前胃潰瘍、前胃リンパ球浸潤及び扁平上皮過形成 ・ 肝比重量増加、肝小葉中間帯肝細胞脂肪化、肝細胞肥大、肝変異細胞巣、肝血管拡張、肝細胞核大小不同性、肝多核肝細胞、肝細胞巣状壊死、肝細胞単細胞壊死、肝マクロファージ集簇、肝炎症性細胞浸潤、肝小肉芽腫、肝細胆管/胆管増生、肝髓外造血、びまん性肝細胞脂肪化減少及び多核肝細胞出現増加 	<ul style="list-style-type: none"> ・ PLT 増加 ・ 肝比重量増加、肝小葉中間帯肝細胞脂肪化、肝細胞肥大及び肝変異細胞巣 ・ 甲状腺ろ胞拡張及びろ胞細胞過形成 ・ 副腎皮質肥大/過形成 ・ 卵巣比重量減少

	<ul style="list-style-type: none"> 甲状腺ろ胞拡張及びろ胞細胞過形成 腎鉍質沈着減少、副腎皮質限局性肥大/過形成及び副腎皮質肥大/過形成 	
100 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

表 20 甲状腺及び肝臓における腫瘍性病変の発生頻度

投与群	雄					雌				
	0	20	100	2,500	5,000	0	20	100	2,500	5,000
所見/検査動物数	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
甲状腺ろ胞細胞腺腫	0	1	0	4	9*	0	0	1	2	2
肝細胞腺腫	21	9*	17	51**	64**	5	3	4	27**	29**
肝芽細胞腫	0	0	0	12**	11**	0	0	0	0	0
肝細胞癌	12	13	12	36**	43**	3	3	3	7	6

Fisher の直接確率検定、* : $p \leq 0.05$ 、** : $p \leq 0.01$

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 25 匹) を用いた混餌 (原体: 0、100、1,000 及び 10,000 ppm : 平均検体摂取量は表 21 参照) 投与による 2 世代繁殖試験が実施された。

表 21 2 世代繁殖試験 (ラット) の平均検体摂取量

投与群		100 ppm	1,000 ppm	10,000 ppm	
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	P 世代	雄	6.9	68.5	702
		雌	7.7	76.0	771
	F ₁ 世代	雄	10.0	99.7	1,060
		雌	9.9	106	1,110

親動物では 10,000 ppm 投与群の雌雄で肝絶対重量増加 (P、F₁)、肝細胞肥大 (P、F₁) が、1,000 ppm 投与群の雄で肝絶対重量増加 (P)、肝細胞肥大 (P、F₁) が認められた。児動物では 10,000 ppm 投与群の雌雄で肝絶対重量増加 (F₁、F₂) が認められた。

本試験において、親動物 (P、F₁) の 1,000 ppm 投与群の雄及び 10,000 ppm 投与群の雌で肝細胞肥大等が認められ、児動物 (F₁、F₂) の 10,000 ppm 投与群の雌雄で肝絶対重量増加が認められたので、無毒性量は親動物の雄で 100ppm (P: 6.9 mg/kg 体重/日、F₁: 10.0 mg/kg 体重/日)、雌で 1,000 ppm (P: 76.0 mg/kg 体重/日、F₁: 106 mg/kg 体重/日)、児動物の雌雄で 1,000 ppm (P 雄: 68.5 mg/kg 体重/日、P 雌: 76.0 mg/kg 体重/日、F₁ 雄: 99.7 mg/kg 体重/日、F₁ 雌: 106 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

44)

(2) 発生毒性試験 (ラット)

SD ラット (一群雌 25 匹) の妊娠 7~19 日に強制経口 (原体 : 0、10、100 及び 1000 mg/kg 体重/日、0.5%CMC·Na 水溶液に懸濁) 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/日投与群で肝比重量増加が、100 mg/kg 体重/日以上投与群で副腎絶対重量及び比重量の増加、肝肥大が認められた。

胎児では投与による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 10 mg/kg 体重/日、胎児で 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 45)

(3) 発生毒性試験 (ウサギ)

NZW ウサギ (一群雌 22 匹) の妊娠 6~28 日に強制経口 (原体 : 0、10、20 及び 40 mg/kg 体重/日、0.5%CMC·Na 水溶液に懸濁) 投与して、発生毒性試験が実施された。

母動物では、40 mg/kg 体重/日投与群で流産 (2 例)、肝肥大、肝比重量の増加が認められた。1 例は妊娠期間の後半に摂餌がみられず、母体の栄養状態悪化に起因したものと考えられた。

胎児の内臓及び骨格所見には投与による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 20 mg/kg 体重/日、胎児で 40 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 46)

13. 遺伝毒性試験

ベンチアバリカルブイソプロピルの細菌を用いた復帰突然変異試験、ラット肝初代培養細胞を用いた *in vitro* 不定期 DNA 合成試験、マウスリンフォーマ TK 試験、チャイニーズハムスター肺線維芽細胞 (CHL) を用いた染色体異常試験、ヒトリンパ球を用いた単細胞ゲル電気泳動法試験 (コメット試験)、BALB/c3T3 細胞を用いた二段階形質転換試験、ラット肝細胞を用いた *in vivo/in vitro* 不定期 DNA 合成試験、マウス肝臓における酸化的 DNA 損傷試験、ラット肝臓・子宮における酸化的 DNA 損傷試験、マウス骨髄細胞を用いた小核試験及びトランスジェニックマウスの肝臓を用いた遺伝子突然変異試験が行われた。細菌を用いた復帰突然変異試験の TA98 株において S9 mix 存在下で 500~1000 µg/プレートの用量で対照の 3~4.8 倍の復帰変異コロニー数の増加が認められたが、その他の試験はすべて陰性であった (表 22)。

TA98 株の S9 mix 存在下で再現性のある陽性反応が認められたが、培養細胞においては DNA 損傷性や遺伝子突然変異の誘発性は見られなかったこと、*in vivo* での評価においてマウス、ラットの肝臓等における酸化的 DNA 損傷性が見られなかったこと、十分高用量まで試験されたラット肝細胞を用いた不定期 DNA 合成試験及び肝臓を標的としたトランスジェニックマウスを用いた遺伝子突然変異試験

の *in vivo* 試験で陰性であったこと、さらに染色体異常の誘発性に関しては *in vitro*、*in vivo* ともに認められないこと、二段階形質転換試験は陰性であったことから、生体にとって特に問題となるような遺伝毒性はないものと考えられた。(参照 47～58)

表 22 遺伝毒性試験概要 (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 株)	1 回目：8～5,000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (+/-S9) 2 回目：32～5,000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (+/-S9)	陽性 TA98 (+S9)
	不定期 DNA 合成試験	ラット肝細胞	実験 1：5～50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 実験 2：15.6～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	陰性
	マウスリンフォーマ TK 試験	マウスリンパ腫細胞 (L5178Y)	3.75～120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (+/-S9)	陰性
	染色体異常試験	チャイニーズハムスター肺由来細胞株 (CHL)	955～3,820 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (+/-S9)	陰性
	単細胞ゲル電気泳動法試験	ヒトリンパ球	62.2～173 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (-S9) 173～800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (+S9)	陰性
	二段階形質転換試験	BALB/c3T3 細胞	10.4～80.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	陰性
<i>in vivo/</i> <i>in vitro</i>	不定期 DNA 合成試験	Fischer ラット(肝細胞) (一群雄 4 匹)	1,000、2,000 mg/kg 体重 (単回経口投与)	陰性
<i>in vivo</i>	酸化的 DNA 損傷試験 (肝臓)	B6C3F1 マウス (一群雌雄各 5 匹)	100、500 ppm (混餌投与) 雄：19.4、1,030 mg/kg 体重 雌：26.1、1,200 mg/kg 体重	陰性
	酸化的 DNA 損傷試験 (肝臓)	Fischer ラット (一群雌雄各 5 匹)	200、10,000 ppm (混餌投与) 雄：17.4、798 mg/kg 体重 雌：17.1、915 mg/kg 体重	陰性
	酸化的 DNA 損傷試験 (肝臓・子宮)	Fischer ラット (雌 10 匹)	200、10,000 ppm (混餌投与) 11.6、576 mg/kg 体重	陰性
	小核試験	ICR マウス (骨髓細胞) (雄 8 匹)	2,000 mg/kg 体重 (1 日 2 回経口投与)	陰性
	遺伝子突然変異試験	トランスジェニックマウス (Muta™ Mouse) 雄 5 匹、肝臓	1,000、2,000 mg/kg 体重 (1 日 1 回 5 日間経口投与)	陰性

注) +/-S9：代謝活性化系存在下及び非存在下、+S9：代謝活性化系存在下

代謝分解物 M-1、M-3、M-4、M-5、M-15、原体混在物 S-L、I-12 の細菌を用いた復帰突然変異試験が実施された。M-4 及び I-12 が TA98 株において S9 mix 存在下で各々対照の 6 倍 (1,250 µg/プレート) 及び 7.8 倍 (320 µg/プレート) の増加が認められ、陽性であった。その他はすべて陰性であった (表 23)。

M-4 は土壌中分解物で、土壌中推定半減期が数時間という極めて短時間であること、また、I-12 は 0.5%以下の低い含有量であることを考えると、これらのものがヒトに健康被害をもたらすとは考え難い。(参照 59~65)

表 23 遺伝毒性試験概要 (代謝分解物・原体混在物)

被験物質	試験	対象	投与量・処理濃度	結果
M-1	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA98, TA1535, TA1537, WP2uvrA 株	156-5,000 µg/mL (-S9) 78.1-5,000 µg/mL (+S9)	陰性
M-3	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA98, TA1535, TA1537, WP2uvrA 株	78.1-5,000 µg/mL (+/-S9)	陰性
M-4	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA98, TA1535, TA1537, WP2uvrA 株	156-5,000 µg/mL (-S9) 78.1~5,000 µg/mL (+S9)	陽性 TA98 (+S9)
M-5	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA98, TA1535, TA1537, WP2uvrA 株	78.1-5,000 µg/mL (+/-S9)	陰性
M-15	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA98, TA1535, TA1537, WP2uvrA 株	156-5,000 µg/mL (+/-S9)	陰性
S-L	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA98, TA1535, TA1537, WP2uvrA 株	156-5,000 µg/mL (+/-S9)	陰性
I-12	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA98, TA1535, TA1537, WP2uvrA 株	本試験 : 0.625-320 µg/mL (-S9) 10.0-1,280 µg/mL (+S9) 追加試験 : 0.625-160 µg/mL (-S9)	陽性 TA98 (+S9)

注) +/-S9 : 代謝活性化系存在下及び非存在下、+S9 : 代謝活性化系存在下

14. その他の毒性試験

(1) 肝腫瘍のメカニズム試験

①ラットを用いた肝2段階発がんイニシエーション試験

Fischer ラット（一群雄 12 匹）を用いた単回経口（原体：2,000 mg/kg 体重）投与による 10 週間の発がんイニシエーション試験（イニシエーター陽性対照物質：DEN、プロモーター：PB）が実施された。

GST-P 陽性細胞巢の数及び面積を指標としたところ、投与群は陽性巢の数及び面積において溶媒投与群との反応に差がなく、DEN 投与群と比較すると統計学的に有意な低値を示した。

本試験条件下では、ベンチアバリカルブイソプロピルは肝臓に対する発がんイニシエーション作用はないと考えられた。（参照 66）

②ラットを用いた肝2段階発がんプロモーション試験

Fischer ラット（一群雄 12 匹）を用いた混餌（原体：10,000 ppm）投与による 8 週間発がんプロモーション試験（イニシエーター：DEN、プロモーター陽性対照物質：PB）が実施された。

DEN+ベンチアバリカルブイソプロピル投与群及びDEN+PB 群で有糸分裂像が増加し、また、GST-P 陽性細胞巢の数及び面積が増加した。

本試験条件下では、ベンチアバリカルブイソプロピルは DEN をイニシエーターとした場合にプロモーション作用を示すと考えられた。（参照 67）

③マウスを用いた薬物代謝酵素誘導及び肝細胞増殖確認試験

B6C3F1 マウス（一群雌雄各 8 匹）を用いた 1 日 1 回 7 日間強制経口（原体：10 及び 1,000 mg/kg 体重/日）投与による薬物代謝酵素誘導及び肝細胞増殖確認試験が実施された。

1,000 mg/kg 体重投与群の雌雄で肝比重量の増加、総 P450 量の増加、P450 分子種の増加（CYP1A2(1A1)、CYP2B1(2B2)、CYP3A2）、肝細胞肥大、雄で肝細胞壊死が認められた。BrdU 免疫組織染色の標識率は投与群と対照群で明らかな差は認められなかった。

ベンチアバリカルブイソプロピル投与によりマウスの肝臓に増加した CYP 分子種は、フェノバルビタール投与による酵素誘導パターンと類似していた。また、細胞増殖活性に対する影響は極めて弱いと考えられた。（参照 68）

④ラットを用いた薬物代謝酵素誘導及び肝細胞増殖確認試験

Fischer ラット（一群雌雄各 8 匹）を用いた 1 日 1 回 7 日間強制経口（原体：10 及び 1,000 mg/kg 体重/日）投与による薬物代謝酵素誘導及び肝細胞増殖確認試験が実施された。

1,000 mg/kg 体重投与群の雌雄で肝比重量の増加、CYP 分子種（CYP2B1(2B2)、CYP3A2）の増加、雄で CYP1A1 (1A2)、総 CYP 量の増加が認められた。BrdU 免疫組織染色の標識率は投与群と対照群で有意な差は認められなかった。（参照 69）

⑤マウスを用いた肝細胞増殖活性測定

(2)①の甲状腺腫瘍メカニズム試験(100または500 ppmで14日間混餌投与)で得られたマウスの肝臓試料を用いてPCNA免疫組織化学検査が実施された。

PCNA標識率に有意な差は認められなかった。(参照70)

⑥ラット及びマウスにおける肝脂質過酸化量測定

Fischerラット(一群雌雄各5匹)及びB6C3F1マウス(一群雌雄各5匹)を用いて7日間混餌(ラット:原体:0、50及び10,000 ppm;雄:0、3.6及び753、雌:0、3.7及び729 mg/kg体重/日に相当、マウス:原体:0、100及び5,000 ppm;雄:0、19.4及び1,070、雌:0、21.4及び1,370 mg/kg体重/日に相当)投与し、過酸化脂質量を蛋白量1 mg当たりのチオバルビツール酸価(TBA価)として算出することにより肝中脂質過酸化量の測定が行われた。

ラットの10,000 ppm投与群の雌雄で肝比重量増加が、雄でTBA価増加が、マウスの5,000 ppm投与群の雌雄で肝比重量増加及びTBA価増加が認められた。

肝脂質過酸化能の程度は、マウス雄>マウス雌・ラット雄であり、酸化ストレスの程度がマウス雄で最も強度であり、マウス雌とラット雄は同程度であった。(参照79)

⑦ラット及びマウス肝臓における肝細胞増殖活性測定

ラット及びマウス28日間反復経口投与試験(10(3)及び10(4))、ラット90日間亜急性毒性試験(10(1))並びにマウス90日間亜急性毒性試験(マウス発がん性試験(11(3))の予備試験)から得られた保存肝臓試料を用いて、肝臓におけるPCNA標識率の測定が行われた。

ラット28日間では、50,000 ppm群に増加傾向がみられたが、有意ではなかった。

ラット90日間では対照群とほぼ同等であった。

マウス28日間では、20,000及び50,000 ppm群でPCNA標識率の有意な増加がみられ、高投与群における細胞増殖活性が認められた。

マウス90日間では、20,000 ppm群に増加傾向がみられたが、有意ではなかった。

以上のことより、肝細胞腫瘍が誘発されたマウスでは、高用量を投与すると肝細胞の増殖活性が増加すると考えられた。(参照71)

(2) 甲状腺腫瘍発生メカニズム試験

①マウスの肝中UDP-GT活性、血清中TSH、T3及びT4の測定

B6C3F1マウス(一群雄各6匹)を用いた混餌(原体:0、100及び5,000 ppm;0、17.0及び855 mg/kg体重/日に相当)投与による7及び14日間の甲状腺腫瘍メカニズム試験が実施された。

5,000 ppm投与群で肝ミクロソーム中のUDP-GT活性の増加、血清中T4の減少、肝比重量の増加、肝肥大、肝臓の暗色化が認められた。血清中TSH及びT3には変化が認められなかった。(参照72)

②マウス血清中 TSH 測定試験

B6C3F1 マウス（一群雄各 12 匹）を用いた混餌（原体：0、100 及び 5,000 ppm；0、15.7 及び 810 mg/kg 体重/日に相当）投与による 16 週間の甲状腺腫瘍メカニズム試験において、5,000 ppm 投与群で血清中 TSH の増加が認められた。14. (2) ①の試験で肝ミクロソーム中の UDP-GT 活性の増加、血清中 T4 の減少が認められたことに加え、本試験で血清中 TSH 濃度の増加が認められたことから、ベンチアバリカルブイソプロピルによる甲状腺腫瘍の発生は、内分泌ホルモンのフィードバック調節の結果に起因することが一因であると考えられた。（参照 73）

③ラットの肝中 UDP-GT 活性、血清中 TSH、T3 及び T4 の測定

Fischer ラット（一群雄各 10 匹）を用いた混餌（原体：0、200 及び 10,000 ppm；0、13.3 及び 661 mg/kg 体重/日に相当）投与による 14 日間の甲状腺機能亢進メカニズム試験が実施された。

10,000 ppm 投与群で摂餌量の増加、肝ミクロソーム中の UDP-GT 活性の増加、血清中 T4 の減少、肝比重量の増加、肝肥大が認められた。血清中 TSH は有意ではないが増加傾向が認められ、血清中 T3 には変化は認められなかった。

ベンチアバリカルブイソプロピルはラット肝臓の UDP-GT を誘導することにより血清中 T4 を減少させ、そのフィードバック機構により甲状腺を刺激した（ろ胞上皮過形成）と考えられた。（参照 74）

(3) 子宮腫瘍発生メカニズム試験

①卵巣摘出ラットを用いた子宮肥大試験

卵巣摘出 Fischer ラット（一群雌各 6 匹）を用いた 1 日 1 回 14 日間の強制経口（原体：0、10、100 及び 1,000 mg/kg 体重）投与による子宮肥大試験が実施された。

子宮重量はいずれの投与群でも溶媒対照群と同程度であり、組織学検査においても萎縮した子宮組織以外に所見は観察されなかった。子宮内膜細胞の BrdU 標識率にも差は認められなかった。

本試験条件下では、ベンチアバリカルブイソプロピルの子宮肥大作用及び子宮の細胞増殖作用は認められず、エストロゲン作用を示唆する変化は認められないと考えられた。（参照 75）

②ラットの卵巣、子宮及び肝中アロマトラーゼ活性、肝のエストロゲン代謝酵素測定及び血清中ホルモン測定

Fischer ラット（一群雌各 10 匹）を用いた混餌（原体：0、200 及び 10,000 ppm；0、11.6 及び 576 mg/kg 体重/日に相当）投与による 8 週間の子宮癌発生メカニズム試験が実施された。

10,000 ppm 投与群で肝臓中の酵素（アロマトラーゼ、エストラジオール-2-ヒドロキシラーゼ及びエストラジオール-4-ヒドロキシラーゼ）活性の増加、肝比重量の増

加、肝臓の暗色化が認められた。卵巣及び子宮中のアロマトラーゼ活性、血清中の黄体形成ホルモン、 17β -エストラジオール及びプロゲステロンの濃度、 17β -エストラジオール/プロゲステロン比、卵巣及び子宮の重量変化は認められなかった。(参照 56、76~77)