

ミドが NTE と共有的に結合しているものと推察された。

また、ラット脳ホモジネート液に、メタミドホスを加えて 37°C で 30 分間インキュベートして NTE 活性を阻害後、さらにフェントラザミドを加えて同条件でインキュベートした試料についても、フッ化カリウムを加えて同様に賦活化処理された。

メタミドホスの単独処理によって、NTE 活性の十分な阻害が認められた。メタミドホス処理後にフェントラザミド処理した結果、さらに NTE 活性阻害のわずかな増加が認められた。また、フェントラザミドの単独処理では、メタミドホスとフェントラザミドの併用処理により得られたものと同程度で NTE 活性を阻害した。

賦活化処理については、メタミドホスとフェントラザミドの併合処理により NTE 活性を阻害した場合、メタミドホスの単独処理と同様に十分に賦活できたが、その一部は非賦活的であった。加えて、フェントラザミド単独処理による NTE 活性阻害は全く賦活化されなかったことから、フェントラザミドはメタミドホスと同じく NTE の触媒中心部と結合すると考えられた。

d) まとめ

フェントラザミドは、初めから賦活できないような形で NTE 活性を阻害することが示唆され、既知の NTE 阻害剤（特に有機リン剤）と構造的に異なっていることから、遅発性神経障害誘発性の結論は *in vitro* の本試験のデータのみでは得られなかった。フェントラザミドによる *in vitro* の NTE 活性阻害が遅発性神経障害の誘発性を示唆しているかどうかを判断するためには、*in vivo* でのさらなる検証が必要と考えられた。（参照 64）

② 2 週間混餌投与による発生機序解明試験

本試験は、フェントラザミド及び主要代謝物である II の血漿中濃度を評価することに加えて、脳、脊髄及び坐骨神経 NTE 活性と脳 AChE 活性を測定し、ラットでみられた髄鞘変性の病態を明らかにする目的で実施された。また、尿検査を実施し、同じく慢性毒性試験でみられた膀胱病変の発生機序の解明についても検討された。

Wistar ラット（一群雌雄各 5 匹）にフェントラザミドを 2 週間混餌投与（原体：0、50、200、1,000 及び 4,000 ppm：平均検体摂取量は表 39 参照）し、試験終了時における血漿中のフェントラザミド及び II の濃度、脳、脊髄及び坐骨神経 NTE 活性及び脳 AChE 活性の測定、投与 1 週間後における尿の Na⁺、pH 及び尿量が測定された。なお、陽性対照群にはリン酸トリ-*o*-クレジル (TOCP) を 500 mg/kg 体重で 1 回強制経口投与し、NTE 活性の測定のみ実施された。

表 39 2 週間混餌投与による発生機序解明特殊試験（ラット）の平均検体摂取量

投与群 (ppm)		50	200	1,000	4,000
平均検体摂取量 (mg/kg体重/日)	雄	3.5	14.4	74.0	366
	雌	4.1	15.5	88.5	405

すべての群において、死亡、検体投与に起因する行動、外観及び体重の変化は観察されなかった。4,000 ppm 投与群では摂餌量が増加した（雄で 28%、雌で 24%）。

フェントラザミドの血漿中濃度は、4,000 ppm 投与群では極めて低く、雄で 0.52 μM 、雌で 1.10 μM と定量限界 (1 μM) 付近であり、その他の群では検出限界 (0.5 μM) 未満であった。II の濃度は、200 ppm 以上投与群で用量相関的に増加し、4,000 ppm 投与群の雄では 9.8 μM 、雌では 13.9 μM であった。したがって、フェントラザミドは初回通過効果により代謝されることが示唆された。

NTE 活性について、陽性対照群では、投与 1 日後には試験した神経組織のすべてで強い NTE 活性阻害（脳及び脊髄：約 90%、坐骨神経：77%阻害）がみられた。一方、検体投与群では、4,000 ppm 投与群の雄では脳のみ、雌ではすべての神経組織で統計的に有意な阻害（13~29%阻害）が認められたが、有機リン酸エステルでみられるような、神経毒性に関連する程度ではなく、生物学的に有意な阻害ではなかった。他の群の NTE 活性阻害もわずかであり、用量相関性もなく、雌雄いずれかのみの変化であったことから、検体によるものとは考えられなかった。

脳 AChE は、4,000 ppm 投与群の雌でのみ有意な阻害 (47%阻害) が認められ、本試験においても、脳は慢性毒性試験と同等な影響を受けたものと考えられた。

なお、投与開始 1 週間後の尿 (16 時間採取) を用いた尿検査では、全投与群で Na^+ 、pH 及び尿量のいずれも統計的に有意な変化は認められず、これらと慢性毒性試験でみられた膀胱病変との関連は否定できると判断された。

in vivo の本試験では、①の *in vitro* の試験で認められたような強い NTE 活性阻害は認められなかった。さらに、ニワトリを用いた急性及び 28 日間亜急性遅発性神経毒性試験 [8. (4) 及び 10. (5)] においても、遅発性神経毒性を示唆する所見は認められていないことから、ラットでみられた髄鞘変性の増加は、有機リン酸エステルに起因する神経病変とは異なる作用機序によるものと推察された。
(参照 65)

③ 神経細胞に対する影響 (*in vitro*)

ラットで認められた神経障害について、分子レベルでの研究を参考にし、神経細胞内のエネルギー代謝、神経細胞骨格 (神経フィラメント) への影響について検討するため *in vitro* での試験が実施された。さらに、非神経細胞や既知の神経毒性物質も併用し、神経系への影響の機序について検討された。

a) 初代培養神経細胞への影響

神経細胞への影響の指標として、細胞毒性（細胞への Calcein 色素の取込みに伴う蛍光の測定による細胞生存率で判定）、エネルギー代謝（細胞内でのグルコース消費と細胞内 ATP の測定、ローダミン 123 色素の取込みに伴う蛍光の測定によるミトコンドリア内膜電位の測定）及び神経フィラメント（マウス抗体及び抗マウス抗体で処理後に細胞フィラメントに付着した抗体を測定）について検討された。

ラット胎児由来の神経初代培養細胞に、フェントラザミドを 0.1、1、5、10 及び 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （調製可能最大濃度）の処理濃度で添加し、14 日間（うち 7 日間は回復期間）インキュベートされた。各測定は、処理 3 または 7 日後及び試験終了時に実施された。

フェントラザミドは、細胞エネルギーの項目であるグルコース消費、ATP 量及びミトコンドリア活性を著しく減少させた。細胞骨格（神経フィラメント）には、遅延的に試験終了時にわずかに影響がみられた。ATP は最も感受性の高いパラメータであり、50%阻害濃度（ IC_{50} ）は 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。細胞毒性にはあまり強い作用はみられなかった。

これらの結果から、フェントラザミドの作用による ATP 量減少による遅延的な神経フィラメントへの影響が考えられたため、培養液にピルビン酸を添加し、前述と同じ試験系で試験が実施された。その結果、いずれの測定項目にも著明な作用はみられなかったことから、フェントラザミドによるエネルギー項目への影響は、解糖系の代謝物（ピルビン酸）により改善されたものと考えられた。

b) 6 種の継代培養細胞株への影響

a) と同様の試験系において、初代培養細胞の代わりにマウスの N-18 細胞（神経芽細胞腫）株、ラット腎臓 NRK52e 細胞株、ラット骨格筋 L6 細胞株、ラット心筋 H9C2 細胞株、マウス肝臓 Hepa 1-6 細胞株及びマウス線維芽細胞 3T3 細胞株を用いた試験が実施された。

フェントラザミドは、神経芽細胞腫由来の N-18 株のみに初代継代培養神経細胞と同様な作用を示したが、その程度は弱いものであった。その他の非神経系細胞株には、検体の作用は認められなかった。

a) 及び b) の結果から、フェントラザミドの細胞エネルギー系への作用は神経細胞に限定されるものと考えられた。

c) 各種神経毒性物質の初代培養神経細胞への影響

末梢神経障害を誘発することが知られている 7 種の化合物（名称、標的部位及び症状は表 40 参照、処理濃度：0.1、1、5、10 及び 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を用いて、a) 及び b) と同様の条件下で初代培養神経細胞への影響を調べ、フェントラザミドでの結果と比較し、作用機序について検討された。

表 40 試験に用いた末梢神経障害誘発性化合物

化合物	標的部位	症状
2,5-ヘキサンジオン	細胞骨格、解糖系	遠位軸索障害
アクリルアミド	細胞骨格、解糖系、ATP枯渇	遠位軸索障害
パラコート	レドックス循環	振戦麻痺、神経節変性
青酸カリウム	チトクローム C 酸化酵素	遅発性振戦麻痺
ミパホックス	細胞骨格、NTE、AChE	遅発神経毒性
TOCP	細胞骨格、NTE、AChE	遅発神経毒性
パラオキソン	AChE	コリン作動性症状

2,5-ヘキサンジオン及びアクリルアミドは、細胞骨格に直接作用することが特徴であるが、同時に細胞エネルギー供給に対する作用も示した。パラコート及び青酸カリウムは、ミトコンドリアや細胞エネルギー供給に対する強い作用を示したが、ピルビン酸添加条件では明らかな改善はみられなかった。遅発性神経毒性有機リン酸エステルであるミパホックス及び TOCP は、細胞骨格に直接及び選択的な作用を示した。これとは対照的に、パラオキソンではいずれの項目にも影響を及ぼさなかった。

したがって、フェントラザミドのラット神経細胞に対する作用は、細胞エネルギー供給に関わっているという点ではパラコートや青酸カリウムと概ね同じであったが、ピルビン酸添加により改善される点、ならびに作用発現が青酸カリウムに比べ比較的遅発性である点から、作用機序はこれらの物質とは異なったものであることが推察された。

d) 呼吸鎖及びミトコンドリアの機能に対する作用

a) の試験結果から、フェントラザミドはまず神経細胞でのグルコース利用を阻害することが示された。神経細胞内の ATP のエネルギー源はグルコースのみであり、グルコースの利用段階としては、神経細胞内へのグルコースの取込み、解糖系、クエン酸サイクル及び呼吸鎖が考えられる。これらのどの段階での作用が重要であるかを検討するため、ラット肝臓のミトコンドリアを用い、フェントラザミド、2,5-ヘキサンジオン、アクリルアミド、パラコート及び青酸カリウムがグルタミン酸/リンゴ酸誘起呼吸及びコハク酸誘起呼吸時に、ミトコンドリア呼吸とそれに続く ATP 産生を直接阻害するかどうかを検討した。

脱共役活性はいずれの化合物においても認められなかった。

青酸カリウムは、グルタミン酸/リンゴ酸誘起呼吸及びコハク酸誘起呼吸を用量相関的に阻害した。青酸カリウムはチトクローム C オキシダーゼ阻害剤であることから、これは予想される反応であった。フェントラザミドでは、グルタミン/リンゴ酸誘起呼吸をわずかに阻害した。このときの 50%効果濃度 (EC₅₀) は 100 µg/mL 超であり、ミトコンドリア膜活性 (ローダミン) への影響の濃度 (EC₅₀ 値: 9 µg/mL) と比較すると高値であった。したがって、フェントラザミドのミ

トコンドリアに対する作用は、神経細胞へのエネルギー供給不全が主な理由ではないことが示唆された。

e) グルコース利用の中間代謝物への作用

d)に関連して、グルコースの取込みや利用への影響を検討するため、継代神経芽細胞株(神経芽細胞腫株)にフェントラザミドを処理し、処理3及び7日後のグルコースの取込量、細胞内グルコース、ピルビン酸及び乳酸濃度が測定された。

グルコース消費(細胞外グルコース量)は、処理7日後に用量相関的に顕著に減少したが、細胞内のグルコース濃度は逆に増加しており、フェントラザミドが細胞内へのグルコースの取込みに関与していないこと、またグルコースの利用が減少したことが示唆された。

ピルビン酸(解糖系の代謝物)及び乳酸(嫌気的条件下でピルビン酸から生成)の細胞内における測定では、いずれも用量相関的な減少が認められた。フェントラザミドは極めて低濃度で作用し、ATP濃度の抑制を示す濃度よりも明らかに低い濃度で作用した。

これらの結果により、フェントラザミドはピルビン酸と乳酸を同時に減少させるが、これは乳酸濃度を増加させるべき嫌气的解糖系への移行というよりは、むしろ好气的解糖系におけるピルビン酸産生を抑制することが示唆された。また、ピルビン酸のクエン酸回路及び呼吸鎖を經由しての代謝は影響されず、ピルビン酸が徐々に欠乏していくことにより、呼吸鎖に対する基質の供給も減少し、ミトコンドリア膜の機能とATP産生能が低下すると考えられた。

f) 神経細胞への作用の濃度

a)の結果から、初代培養神経細胞でフェントラザミドに対して最も感受性の高い項目はATPの減少であり、0.1 µg/mLという低濃度で影響を受けた。しかし、細胞培養液中の培地成分に検体が結合することが懸念されたことから、培養液中の蛋白と検体の結合を明らかにするため、培養液中の遊離(非結合)検体濃度を限外濾過法により測定された。

フェントラザミドは、細胞培養に使用した培養液成分に約50%結合していた。したがって、*in vitro*における遊離の検体濃度は、最も感受性のATPに対しては、約0.05 µg/mLであったと推定された。

g) まとめ

a)~f)の結果から、*in vivo*における神経細胞のエネルギー需給状態に対するフェントラザミドの作用は、*in vivo*で細胞に到達した量が非常に少ないことを考慮すれば、非常に弱くかつ選択的なものであったことが予測された。ラットの慢性毒性/発がん性併合試験において、髄鞘変性は対照群での老齢のラットにも観察されたが、エージングによるミトコンドリア機能の低下と、それによっておこ

るエネルギー供給の減少ならびに酸化ストレスの増加等が、加齢ラットでの髄鞘変性に関与するという報告がある。また、高用量群で観察された髄鞘変性と老齢ラットで観察された自然発生的な病変との間には、病理組織学的差異は認められなかった。したがって、投与群における髄鞘変性の発生頻度及び程度の増加は、加齢の因子に加えて、検体の神経細胞に対する細胞エネルギー供給の減少により、運動神経細胞の老化が促進されたものと考えられた。

ラットを用いた作用機序解明試験[14. (3)]で示されたように、フェントラザミド 4,000 ppm 投与群雌の血漿中濃度は、最高でも 1 nM と考えられ、これは約 0.4 µg/mL と推定される。さらに、蛋白非結合の遊離検体のみが血液脳関門を通過して神経細胞に作用するものと仮定した場合、血中濃度の約 22% が有効濃度と考えられ、この量は、雌ラットの場合 0.09 µg/mL と考えられる。同様に、雄ラット (慢性毒性/発がん性併合試験) の 3,000 ppm 投与群は 0.03 µg/mL と推定される。これらの量は、本試験の *in vitro* 条件における ATP に作用する最低濃度 0.05 µg/mL と極めて類似し、慢性毒性/発がん性併合試験でみられた髄鞘病変が検体の ATP に対する作用に相関していることが推察された。

ラットにおける本検体の神経に対する作用について、高用量の慢性投与及び老化を考慮すると、作物残留による微量な暴露が想定されるヒトではその危険性が大きくないものと考えられた。(参照 66)

(4) ChE 活性に及ぼす影響 (ラット)

フェントラザミドの ChE 活性に及ぼす影響を調べるとともに、代謝物に ChE 活性阻害作用があるかどうかを調べるため、以下の①～④の試験が実施された。

① 単回経口投与による ChE 活性への影響 (*in vivo*)

SD ラット (一群雄各 4 匹) にフェントラザミドを単回強制経口投与 (0, 1,000 及び 5,000 mg/kg 体重、2% クレモホア EL 含有蒸留水に懸濁) し、*in vivo* における血漿、赤血球及び脳 ChE 活性への影響について検討された。

5,000 mg/kg 体重投与群において、血漿 ChE 活性は投与 2 日後に対照群と比べて 50% の阻害を示したが、投与 3 日後には回復傾向を示し、投与 7 日後には回復した。赤血球 ChE 活性は投与 1 日後に 31% の阻害、投与 2 日後に最大の 43% 阻害がみられた。投与 7 日後にはやや回復を示したが、27% の阻害を示した。脳 ChE 活性は、投与 3 日後に最大の 37% 阻害がみられた。回復は遅く、投与 7 日後で 31%、投与 14 日後にようやく 15% 阻害にまで戻っていた。なお、投与後 14 日間の観察中、ラットに外観の変化及び中毒症状は全く認められなかった。

1,000 mg/kg 体重投与群では、血漿 ChE 活性は投与 1 日後に 22%、血球 ChE 活性は投与 3 日後に 33%、脳 ChE で投与 2 日後に 21% の阻害を示し、最大の活性低下がみられた。いずれも、投与 7 日後にはほぼ回復した。

② フェントラザミド存在下の血球及び脳 ChE 活性 (*in vitro*)

SD ラット (雄 3 匹) の血漿、赤血球及び脳の 5% ホモジネート液に、DMSO に溶解したフェントラザミドを含むリン酸緩衝液 (最終濃度 10^{-6} ~ 10^{-3} M) を加え、一定時間経過後 (暴露 5 分、30 分、1 時間及び 3 時間) の ChE 活性を測定し、*in vitro* における ChE 活性への影響について検討された。なお、陽性対照化合物として、パラオキソン (有機リン化合物) 及びプロポキスル (カーバメイト化合物) が用いられた。

血漿、赤血球及び脳のいずれも、フェントラザミドの暴露時間が長くなるにつれて阻害の程度が高くなるだけでなく、低濃度でも ChE 活性阻害が生じる傾向がみられた。

血漿では、 10^{-4} 及び 10^{-3} M では暴露 5 分、 10^{-5} M では暴露 3 時間で 20% 以上の活性阻害がみられた。赤血球では、 10^{-4} M では暴露 5 分、 10^{-3} M では暴露 30 分、 10^{-5} M では暴露 1 時間で 20% 以上の活性阻害がみられた。脳においても、 10^{-3} M では暴露 5 分、 10^{-4} M では暴露 30 分、 10^{-5} M では暴露 1 時間で 20% 以上の活性阻害がみられた。 10^{-3} M では、いずれの測定時においても 20% 以上の活性阻害はみられなかった。一方、陽性対照のパラオキソン (10^{-7} M) 及びプロポキスル (10^{-5} M) では、血漿、血球及び脳 ChE 活性の明らかな阻害が認められ、その発現もフェントラザミドに比べはるかに早かった。

③ 代謝物存在下の血清及び脳 ChE 活性 (*in vitro*)

SD ラット (雄 1 匹) の血清及び脳 5% ホモジネート液に、フェントラザミド、代謝物 II、X I、X II 及び X IV (いずれも最終濃度 10^{-6} ~ 10^{-3} M) を加え、血清及び脳 ChE 活性を②と同様の手順で測定し、*in vitro* における ChE 活性への影響について検討された。

フェントラザミドでは、血清及び脳 ChE とともに、 10^{-5} M まで 20% 以上の活性阻害がみられたが、II、X II 及び X IV では 10^{-3} M でも阻害作用はみられなかった。X I では、 10^{-3} M でのみ 20~40% の ChE 活性阻害が血清及び脳にみられたが、 10^{-4} M 以下の濃度ではほとんど影響はみられなかった。

④ 代謝物存在下の赤血球 ChE 活性 (*in vitro*)

③の試験では、赤血球 ChE 活性に対する影響を調べられていないことから、本試験は、*in vitro* 条件下における代謝物の赤血球 ChE 活性に対する影響を調べるとともに、フェントラザミドによる作用も再度確認する目的で実施された。

SD ラット (雄 2 匹) から採取した赤血球を、DMSO に溶解したフェントラザミド及び代謝物 II、X I、X II 及び X IV を含むリン酸緩衝液 (いずれも最終濃度 10^{-6} ~ 10^{-3} M) に加え、②及び③と同様の手順で測定し、*in vitro* における赤血球 ChE 活性への影響について検討された。

フェントラザミドでは、 10^{-5} M まで 20% 以上の活性阻害がみられ、阻害の時

間的傾向及び程度は、②の結果とほぼ同じであった。

代謝物Ⅱ、XⅡ及びXⅣでは、阻害作用はみられなかった。XⅠでは、 10^3 Mで極めて弱いChE活性阻害が暴露3時間後にみられたが、 10^4 Mではほとんど影響がみられなかった。

⑤ まとめ

*in vivo*の試験結果から、フェントラザミドはChE活性を緩やかに阻害し、かつその回復が遅いことが示唆された。しかし、明らかなChE活性阻害がみられた用量においても、外観の変化及び中毒症状は全く認められず、これはウサギを用いた一般薬理試験でも同様であった。さらに、ウサギの発生毒性試験[12. (3)]及びラットの慢性毒性/発がん性併合試験[11. (2)]においても血漿及び赤血球ChE活性阻害が認められているが、これらや本試験を含む大多数の試験においても脳ChEの残存活性が50%以上保たれていることから、結果として中毒症状があらわれなかったものと考えられた。

また、代謝物XⅠでもChE活性阻害作用がみられたが、用量的に見て、その作用はフェントラザミドより弱いものであった。したがって、*in vivo*の試験でみられたChE活性の低下は、フェントラザミドそのものによるものと示唆され、フェントラザミドの動物代謝物は親化合物よりも強いChE活性阻害作用を示さないと考えられた。(参照67)

(5) 甲状腺に及ぼす影響 (*in vitro*)

ラットを用いた2年間慢性毒性/発がん性併合試験[11. (2)]の最高用量群において、甲状腺ろ胞のコロイド内鉍質沈着(雌雄)、過形成及び腺腫(雄)の増加が認められた。この機構は、先の試験[14. (3)]でみられたウリジンニリン酸グルクロニルトランスフェラーゼ(UDPGT)の明らかな誘導から、甲状腺ホルモンの代謝的な分解の増加による二次的作用であると推察されたが、甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO)への直接的阻害作用の可能性についても検討する目的で、ブタ甲状腺の可溶化したマイクロゾームを用い、TPOに触媒されるグアヤコール酸化及びヨウ素生成が測定された。

① グアヤコール酸化の測定

グアヤコール(5 mM)、TPO(No. 109、0.1 グアヤコール単位)及びフェントラザミド(DMSOに溶解)を0.1 Mリン酸カリウム緩衝液(総容量; 1 mL, pH 7.4)に加え、1分間室温でプレインキュベーションの後、過酸化水素(200 μ M)を添加して反応を開始した。なお、陽性対照にはアミトロールが用いられた。

陽性対照では、アミトロールにより、TPO触媒のモデル物質であるグアヤコールの酸化が強く、かつ濃度に関連して阻害された。フェントラザミドの調製可能最高濃度である100 μ Mでは、阻害は認められず、また30及び100 μ Mでは

グアヤコール酸化が促進された。

② ヨウ素生成の測定

インキュベーションは①と同様とし、グアヤコールをヨウ化カリウム (10 mM) に置き換え、過酸化水素の濃度を 150 μM として実施された。

陽性対照のアミトロールは、ヨウ化物から TPO によって触媒されるヨウ素生成の初期速度を効率的に、かつ濃度依存性に阻害した。一方、フェントラザミドの 25 μM では影響なく、検体に沈殿が認められた 50 及び 100 μM でもヨウ素生成に影響を及ぼさなかった。

したがって、フェントラザミドが酵素そのものを阻害することもなく、また TPO により生成したヨウ素化物質をトラップしないことが示唆された。

③ まとめ

フェントラザミドによる TPO の直接的阻害作用は認められなかったことから、ラットで認められた甲状腺の前腫瘍性変化及び腫瘍性変化は、肝臓における酵素誘導及び抱合化の増加に伴う甲状腺ホルモンの代謝的分解の増加により、二次的に生じた甲状腺への持続的な刺激によるものと考えられた。(参照 68)

(6) 膀胱上皮過形成及び腫瘍についての解明試験 (ラット)

ラットを用いた 90 日間亜急性毒性試験 [10. (1)] の高用量群 (雄雌: 6,400 ppm) において膀胱上皮の過形成が認められ、さらに 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験 [11. (2)] の高用量群 (雄: 3,000 ppm、雌: 4,000 ppm) 及び中用量群 (雄: 1,000 ppm) では、膀胱上皮過形成の増加とともに 4,000 ppm 群の雌で低頻度ではあるが膀胱腫瘍が観察された。これらの発生機序を解明するため、以下の①～③の試験が実施された。

① 中期発がん性試験

フェントラザミドの膀胱に対する発がんプロモーション作用の有無を調べる目的で、Fischer ラット (一群雄 10~20 匹) を用いた中期発がん性試験 (試験期間: イニシエーション 4 週間、プロモーション 32 週間の合計 36 週間) が実施された。

なお、イニシエーション処置には、*N*-ブチル-*N*-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン (BBN) を 0.05% の濃度で飲料水により投与 (BBN 摂取量は 52.7~55.0 mg/kg 体重/日)、陽性対照群には L-アスコルビン酸ナトリウムを 50,000 ppm の濃度で混餌投与された。試験群構成は表 41 に示されている。

表 41 中期発がん性試験（ラット）の試験群構成

BBN	動物数	32 週間投与化合物	上段：投与量 (ppm)
			下段：平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)
処置	各 20	フェントラザミド	0 (対照群)、20、50、200、3,000 0、0.93、2.28、9.21、174
	20	L-アスコルビン酸 ナトリウム	50,000 2,450
無処置	各 10	フェントラザミド	0 (対照群)、3,000 0、162

投与 134 日に BBN 処置対照群の 1 例が死亡した。剖検所見から、F344 ラットに自然発生する LGL 白血病と考えられたが、本腫瘍発生は BBN イニシエーション処置とは関係しないと考えられた。

BBN 処置の有無を問わず、フェントラザミド 3,000 ppm 投与群において給餌器からの餌の掻き出し及び体重増加抑制が認められた。体重増加抑制は陽性対照群でも認められた。餌の掻き出しは検体に対するラットの忌避が原因と考えられたが、投与開始 23 週以後は全く観察されなかった。

BBN 処置群では、3,000 ppm 投与群及び陽性対照群において、肉眼的な膀胱の単発性ないし多発性の隆起及び結節性病変の発生頻度が統計学的に有意に増加し、膀胱絶対・比重量増加も認められた。さらに、病理組織学的検査では、膀胱上皮の乳頭状ないし結節状過形成、乳頭腫及び移行上皮癌の発生頻度、基底膜 10 cm あたりの膀胱病変の個数についても統計学的有意な増加を示した。

一方、BBN 無処置群では、膀胱の肉眼的病変及び膀胱重量への影響は認められなかったが、3,000 ppm 投与群の全例に単純性過形成が認められ、BBN 無処置対照群と比較して明らかに発生頻度が増加した。

本試験において、フェントラザミドの 3,000 ppm 投与群で膀胱発がんプロモーション作用が確認された。したがって、プロモーション作用に対する無毒性量は 200 ppm (9.21 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 69)

② 初期膀胱病変及び膀胱上皮細胞増殖活性の検索試験

①の中期発がん性試験では、3,000 ppm 投与群で膀胱発がんプロモーション作用が認められた。したがって、検体投与の初期段階における膀胱の病理組織学的変化、ならびにプロモーション作用と関連性が深いとされる細胞増殖活性を、5-ブromo-2'-デオキシウリジン (BrdU) の細胞核内への取り込みにより検討するため、Fischer ラット (一群雄 12 匹) にフェントラザミドを 0、50 及び 3,000 ppm で 3 または 7 日間混餌投与する試験が実施された。

3,000 ppm 投与群では、3 日間投与により軽度の体重増加抑制 (有意差なし) 及び BrdU 標識率の増加傾向 (対照群の 4.4 倍、有意差なし) が認められた。7 日間投与では、統計学的に有意な体重増加抑制、膀胱絶対及び比重量低下ならび