

種：MoneyMaker) に散布し、植物体内運命試験が実施された。1回の散布量は 120 g ai/ha (散布濃度 120 ppm) で、7日間隔で3回散布した。最終散布直後及び最終散布3日後に果実が、7日後(収穫期)に果実及び葉が採取された。

[ind-¹⁴C]アミスルブロム及び[tri-¹⁴C]アミスルブロムを散布した果実の残留放射能濃度は、アミスルブロム換算で最終散布当日にはそれぞれ 0.300 及び 0.302 mg/kg であったが、7日後に 0.241 及び 0.182 mg/kg に減少した。

[ind-¹⁴C]アミスルブロム及び[tri-¹⁴C]アミスルブロムを散布した収穫期の果実の残留放射能は 91.5~92.0%TRR が表面洗浄液中に、6.0~6.6%TRR が洗浄後の抽出液中に、1.4~2.5%TRR が残渣中に分布した。収穫期の果実中の残留放射能の化学形態は、アミスルブロムが 91.3~91.9%TRR を占めた。代謝物は B、C、D、F、G、H、I、L 及び M、その他未同定の 10 種類以上の代謝物が検出されたが、いずれも <0.05~1.1%TRR (<0.0005~0.003 mg/kg) であった。

[ind-¹⁴C]アミスルブロム及び[tri-¹⁴C]アミスルブロムを散布した茎葉の残留放射能濃度は、アミスルブロム換算で最終散布当日にそれぞれ 5.58 及び 5.91 mg/kg であった。

[ind-¹⁴C]アミスルブロム及び[tri-¹⁴C]アミスルブロムを散布した茎葉の残留放射能は 85.3~88.1%TRR が表面洗浄液中に、8.1~8.9%TRR が洗浄後の抽出液中に、3.8~5.8%TRR が残渣中に分布した。収穫期の茎葉中の残留放射能の化学形態は、アミスルブロムが 86.3~90.1%TRR を占めた。代謝物は B、C、D、F、G、H、I、L 及び M、その他未同定の 10 種類以上の代謝物が検出されたが、いずれも <0.05~1.1%TRR (≤0.0005~0.066 mg/kg) であった。

アミスルブロムの植物における主な代謝反応は、①トリアゾール環のスルホニルアミノ基の脱離、②脱臭素、③酸化/水酸化、④インドール環及びトリアゾール環のスルホニル架橋の開裂、⑤インドール環の開裂であり、多数の代謝物が生成した。(参照 7)

3. 土壌中運命試験

(1) 好氣的土壌中運命試験

森林土壌(砂壤土、米国ノースダコタ州)を用いて好氣的土壌中運命試験が実施された。試験土壌をガラス容器に取り、土壌の水分を圃場含水量(0.33 バール)の 75%に調整された。この土壌の表面に[ind-¹⁴C]アミスルブロムまたは[tri-¹⁴C]アミスルブロムを 0.5 mg/kg(乾土換算)の用量で均一に添加し、25±2°Cの暗所で 365 日間インキュベートされた。

アミスルブロムの試験土壌における放射能濃度は 365 日後に 1.8%TRR に減少した。[ind-¹⁴C]アミスルブロム及び[tri-¹⁴C]アミスルブロム処理土壌中

で分解物 D が、31 日後に最大 30.8~33.3%TAR に達し、365 日後に 10.9~14.2%TAR に減衰した。E は、273 日後に最大 4.9~5.7%TAR に達した後、365 日後にやや減衰して 4.7~5.0%TAR となった。K は 365 日後に 7.7~8.2%TAR に達した。その他、B、F、G、H 及び I の生成量は 5%TAR 以下であった。極性分解物及び 4 個の未同定分解物を検出したが、その生成量は 1.2%TAR 以下であった。

365 日間の累積 $^{14}\text{CO}_2$ 発生量は、[ind- ^{14}C]アミスルブロム及び[tri- ^{14}C]アミスルブロムで異なり、それぞれ 3.4 及び 0.6%TAR であった。

土壌から抽出された放射能は時間の経過とともに減少し、結合性残留放射能が増加して 365 日後には[ind- ^{14}C]アミスルブロムで 69.4%TAR、[tri- ^{14}C]アミスルブロムで 54.8%TAR となった。

アミスルブロムの推定半減期及び 90%減衰期はそれぞれ 17 及び 56 日であり、D ではそれぞれ 34 及び 114 日であった。

アミスルブロムの主要分解経路は、トリアゾール環上のスルホニルアミノ側鎖の開裂による D の生成であった。それに加え、脱臭素、酸化、メチル化及びインドール環の開裂等の反応の組み合わせの結果、その他の低濃度分解物が生成した。(参照 8)

(2) 土壌表面光分解試験

[ind- ^{14}C]アミスルブロムまたは[tri- ^{14}C]アミスルブロムを用い、砂壤土(米国ノースダコタ州)における土壌表面光分解試験が実施された。土壌 5 g (乾土換算)をガラス製シャーレに入れ、土壌水分を調節し(最大容水量の 24.9%に相当)、[ind- ^{14}C]アミスルブロムまたは[tri- ^{14}C]アミスルブロムのアセトニトリル溶液の 500 g ai/ha 相当量を均一に処理した。照射区用試料には、キセノンランプ(光強度: 425 W/m²、測定波長: 290~800 nm)の光を 25 ± 2°C で 15 日間照射した。

[ind- ^{14}C]アミスルブロム又は[tri- ^{14}C]アミスルブロムを添加した土壌中のアミスルブロムは、処理直後にはそれぞれ 93.9%TAR (0.505 mg/kg) 及び 93.8%TAR (0.505 mg/kg) が回収され、分解物 D は処理 15 日後に照射区で最大 21.4~30.7%TAR、暗所区で 33.0~35.9%TAR に達した。その他、照射区から B、E、G、I、Q 及び数種類の未知分解物、暗所区から B、E、G、I、K 及び 2 種類の未知分解物が検出されたが、生成量はいずれも 10%TAR 未満であった。照射によって G 及び I の生成率が若干高くなった。

アミスルブロムの推定半減期は、照射区で 12.5 日、暗所区で 10.9 日であり、光照射による消失速度への影響は小さかった。

分解物 D の生成は光分解に起因しないことが示唆された。光分解経路は脱臭素、酸化/水酸化、インドール環の開裂及び両環の開裂であった。これらの代謝物の更なる分解の結果、フルボ酸、腐植酸及びヒューミン画分への結合、

そして少量（15日間の累積で1.2～2.0% TAR）の $^{14}\text{CO}_2$ が発生した。（参照9）

（3） 土壤吸着試験（アミスルブロム）

アミスルブロムの土壤吸着試験が5種類の土壤〔砂壤土（米国）、壤土（日本）、壤質砂土（英国）、埴壤土（英国）及び埴土（スペイン）〕を用いて実施された。

Freundlichの吸着係数 K_{ads} は147～378、有機炭素含有率により補正した吸着係数 K_{oc} は8,160～44,200であった。アミスルブロムは5種類すべての土壤において非移動性と判断された。（参照10）

（4） 土壤吸着試験（土壤中分解物D）

土壤中分解物Dの土壤吸着試験が4種類の土壤〔埴壤土（英国）、砂壤土（米国）、壤土（日本）及び壤質砂土（英国）〕を用いて実施された。

Freundlichの吸着温等式による吸着係数 K_{ads} は25.5～108、有機炭素含有率による補正吸着係数 K_{oc} は821～11,400であった。移動性区分は低移動性～非移動性であった。（参照11）

4. 水中運命試験

（1） 加水分解試験

[ind- ^{14}C]アミスルブロムまたは[tri- ^{14}C]アミスルブロムを50 $\mu\text{g/L}$ の濃度でpH 4（0.01 M 酢酸緩衝液）、7（0.01 M ホウ酸緩衝液）及び9（0.01 M ホウ酸緩衝液）の各緩衝液に添加し、25°C暗所条件下で、30日間（pH 9においては20日間）インキュベートする加水分解試験が実施された。

30日後のpH 4及び7の緩衝液、20日後のpH 9の緩衝液におけるアミスルブロムの残存率は、[ind- ^{14}C]アミスルブロムにおいてはそれぞれ75.3、69.9及び5.9% TARであり、[tri- ^{14}C]アミスルブロムにおいてはそれぞれ72.6、75.0及び6.9% TARであった。アミスルブロムの推定半減期はpH 4、7及び9の緩衝液において、それぞれ78.5、76.5及び5.0日であった。pH 4及び7における主要分解物はDであった。pH 9において10%以上検出された分解物はD、L及びQであった。以上の結果、pH 4及び7ではトリアゾール環側鎖の開裂によるDの生成が主要であり、pH 7及び9ではDの生成に加え、インドール環とトリアゾール環の間のスルホニル結合の開裂（L及びQの生成）が生じた。pH 9ではL及びQの生成速度はDの生成速度よりも高くなり、アミスルブロムの推定半減期がpH 4及び7に比べると著しく短くなった。（参照12）

(2) 水中光分解試験 (滅菌緩衝液)

[ind-¹⁴C]アミスルブロムまたは[tri-¹⁴C]アミスルブロムを 50 µg/L の濃度で pH 4 (0.01 M 酢酸緩衝液) の滅菌緩衝液に添加した後、25±2°C でキセノンランプ (光強度: 425 W/m²、測定波長: 290~800 nm) を 48 時間照射する水中光分解試験が実施された。

滅菌緩衝液中において、アミスルブロムは光照射時間の経過とともに速やかに減少し、照射 48 時間後には検出されなかった。10%TAR 以上の主要分解物として、M、O、P、U 及び Q が検出された。M は照射 48 時間後に 52.2%TAR に増加した。O は照射 48 時間後に 19.6%TAR に増加した。P は照射 6 時間後に 21.3%TAR に増加し、48 時間後には 2.8%TAR に減少した。U は照射 6 時間後に 26.8%TAR に増加し、48 時間後には 3.7%TAR に減少した。Q は照射 48 時間後に 67.1%TAR に増加した。少量の分解物として I、J、L、S、T 及び少なくとも 6 個の未知分解物が検出された。¹⁴CO₂ の 48 時間の累積発生量は[ind-¹⁴C]アミスルブロムの場合 4.5%TAR、[tri-¹⁴C]アミスルブロムの場合 0.4%TAR であった。一方、暗所ではアミスルブロムは安定であり、分解物は検出されなかった。

以上より、アミスルブロムの光分解により、脱臭素と酸化/水酸化による I の生成、転位による J の生成、2 種類の環の間の開裂による置換インドール及び置換トリアゾール系化合物の生成が認められた。L は酸化/水酸化及び二量化により P を生成した他、インドール環が開裂して M 及び O を生成した。また、トリアゾール環上の側鎖は転位や脱離を受け、U 及び Q を経由して S と T が生成し、これらはさらに分解されて極性物質及び ¹⁴CO₂ を生成した。

アミスルブロム、P 及び U の推定半減期はそれぞれ 6.1、14.1 及び 14.6 時間であり、90%減衰期はそれぞれ 20.4、46.8 及び 48.5 時間であった。また、自然太陽光 (東京、春) 換算値による半減期はそれぞれ 26.2、60.6 及び 62.8 時間と推定された。(参照 13)

(3) 水中光分解試験 (滅菌自然水)

[ind-¹⁴C]アミスルブロムまたは[tri-¹⁴C]アミスルブロムを 50 µg/L の濃度で滅菌自然水 (河川水、茨城) に添加した後、25±2°C でキセノンランプ (光強度: 425 W/m²、測定波長: 290~800 nm) を 48 時間照射する、水中光分解試験が実施された。

滅菌自然水中において、アミスルブロムは光照射時間の経過とともに速やかに減少し、照射 48 時間後には検出されなかった。10%TAR 以上の主要分解物として M、Q、S 及び T が検出された。M は照射 24 時間後に 51.7%TAR に増加し、次いで 48 時間後には 44.0%TAR に減少した。Q は照射 9 時間後に 22.8%TAR に増加し、48 時間後には 13.3%TAR に減少した。S は照射 48 時間後に 50.6%TAR に増加した。T は照射 24 時間後に 15.2%TAR に増加し、

48時間後には12.8%TARに減少した。その他の分解物として、D、I、J、L、N、R及び少なくとも3個の未知分解物が検出された。¹⁴CO₂の48時間の累積発生量は[*ind*-¹⁴C]アミスルブロムの場合2.9%TAR、[*tri*-¹⁴C]アミスルブロムの場合0.1%TARであった。暗所下ではアミスルブロムが分解し、分解物としてD、I、L、Q及びS（いずれも6%TAR未満）が検出された。

アミスルブロムへの光照射により、主に2種類の環の間の開裂によるL及びQが生成した。また、インドール環の脱臭素と酸化/水酸化によりIが、トリアゾール環の分子内転位によりJが、スルファモイル基が脱離してDが生成した。LはI-5（推定される分解物）を經由してMへ変換された。Mは加水分解反応によりNへ変換された。Qはスルホニル基あるいはスルファモイル基の脱離により、R、S及びTへ変換された。最終的にはいずれの分解物も極性化合物及び二酸化炭素へ変換された。

アミスルブロム、M、Q及びTの推定半減期は、それぞれ4.7、103、52.3及び97.8時間であり、自然太陽光（東京、春）の換算値による半減期は、それぞれ20.2、442、225及び420時間であった。（参照14）

5. 土壌残留試験

火山灰土・埴土（茨城）、沖積土・埴壤土（高知）及び沖積土・砂壤土（埼玉）を用いて、アミスルブロム及び分解物Dを分析対象とした土壌残留試験（容器内及び圃場試験）が実施された。

推定半減期は表12に示されている。（参照15）

表12 土壌残留試験成績

試験	濃度*	土壌	推定半減期（日）	
			アミスルブロム	アミスルブロム +分解物D
容器内試験	0.27 mg/kg	火山灰土・埴土	32.6	146
		沖積土・埴壤土	78.0	210
	1.4 mg/kg	沖積土・砂壤土	7.3	23.4
圃場試験	531 g ai/ha	火山灰土・埴土	28.2	43.8
		沖積土・埴壤土	24.5	32.6

*：容器内試験で原体、圃場試験で17.7%フロアブル剤を使用

6. 作物残留試験

野菜及び果実等を用いて、アミスルブロム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。アミスルブロムの最高値は、最終散布7日後に収穫したほうれんそうの22.5 mg/kgであった。（参照16、78）

別紙 3 の作物残留試験の分析値を用いて、アミスルブロムを暴露評価対象化合物として農産物から摂取される推定摂取量が表 13 に示されている（別紙 4 参照）。

なお、本推定摂取量の算定は、申請された使用方法からアミスルブロムが最大の残留を示す使用条件で、すべての適用作物に使用され、加工・調理による残留農薬の増減が全くないとの仮定のもとに行った。

表 13 食品中より摂取されるアミスルブロムの推定摂取量

	国民平均 (体重：53.3kg)	小児（1～6歳） (体重：15.8kg)	妊婦 (体重：55.6kg)	高齢者(65歳以上) (体重：54.2kg)
摂取量 ($\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$)	803	416	667	1,290

7. 一般薬理試験

ラット及びイヌを用いた一般薬理試験が実施された。結果は表 14 に示されている。（参照 17）

表 14 一般薬理試験

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)	ラット	雄 5	0, 200, 600, 2,000 (経口)	2,000	—	投与による影 響なし
呼吸・ 循環器系	呼吸数・ 血圧・ 心拍数・ 心電図	イヌ	雄 3*	0, 200, 600, 2,000 (経口)	2,000	—	投与による影 響なし

*：最初に 0 及び 200 mg/kg 体重投与群の検査を実施した後、1 週間以上の休薬期間を設けて、同じ動物を 600 及び 2,000 mg/kg 体重投与群として使用した。

8. 急性毒性試験

アミスルブロムのラットを用いた急性経口毒性試験、急性経皮毒性試験及び急性吸入毒性試験が実施された。

各試験の結果は表 15 に示されている。（参照 18～20）

表 15 急性毒性試験概要（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 3 匹	>5,000	>5,000	死亡例及び症状なし
経皮	SD ラット 雌雄各 5 匹	>5,000	>5,000	死亡例及び症状なし
吸入	SD ラット 雌雄各 5 匹	LC ₅₀ (mg/L)		雌雄：過呼吸、鼻/顎周囲の汚れ (褐色)
		>2.85	>2.85	

分解物 D 及び代謝物 G のラットを用いた急性経口毒性試験が実施された。各試験の結果は表 16 に示されている。（参照 21、22）

表 16 急性毒性試験概要（代謝物）

投与経路	化合物	動物種 性別・匹数	LD ₅₀ (mg/kg 体重)		観察された症状
			雄	雌	
経口	D	Wistar ラット 雌各 3 匹	—	50~300	50 mg/kg 体重で全動物生存、300 mg/kg 体重で全動物死亡、死亡例のみ軟便、腹側部陥凹、運動失調、呼吸困難
経口	G	Wistar ラット 雌各 6 匹	—	>2,000	1 匹に嗜眠及び円背位

9. 眼・皮膚に対する刺激性及び皮膚感作性試験

NZW 雄ウサギを用いた眼刺激性及び皮膚刺激性試験が実施された。その結果、軽度の眼刺激性が認められたが、皮膚刺激性は認められなかった。（参照 23、24）

Hartley 雌モルモットを用いた皮膚感作性試験（Maximization 法）が実施された。その結果、皮膚感作性は陰性であった。（参照 25）

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、2,000、6,300 及び 20,000 ppm：平均検体摂取量は表 17 参照）投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

表 17 90 日間亜急性毒性試験（ラット）の平均検体摂取量

投与群		2,000 ppm	6,300 ppm	20,000 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	171	525	1,720
	雌	187	587	1,880

各投与群で認められた毒性所見は表 18 に示されている。

眼科学的検査において、20,000 ppm 投与群の雄でゴースト血管の発生数が増加したが、ゴースト血管は血管新生の名残であり、毒性学的意義はないと判断された。

血液学的検査において雄で認められた Hb 及び MCHC の低下及び雌で認められた WBC 及び Lym の増加、血液生化学的検査において雄で認められたナトリウム、塩素、カルシウムの減少、A/G 比の増加、雌で認められた塩素の増加については、その変化が軽微であり、用量あるいは雌雄間で一貫性が認められなかったことから、検体投与による影響ではないと判断された。リンについては、20,000 ppm 投与群の雌雄の他、2,000 及び 6,300 ppm 投与群の雌においても増加したが、用量相関性がないことから検体投与による影響ではないと判断された。

臓器重量測定において、6,300 及び 20,000 ppm 投与群の雌で、肝比重量²が増加した。しかし、血液生化学的及び病理組織学的検査等においては肝毒性を示唆する変化が認められないため、これらの変化は検体投与による毒性影響ではないと考えられた。

本試験において、6,300 ppm 以上投与群の雄及び 20,000 ppm 投与群の雌で体重増加抑制、摂餌量減少等が認められたことから、無毒性量は雄で 2,000 ppm (171 mg/kg 体重/日)、雌で 6,300 ppm (587 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 26)

表 18 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
20,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ PLT 増加 ・ ALP、AST、GGT、Ure、リン増加、TP 低下 ・ 肝比重量増加 ・ 小葉中心性肝細胞肥大、下顎リンパ節洞赤血球増加/赤血球貪食、腸間膜リンパ節洞血球増加/赤血球貪食 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制 ・ 摂餌量減少、食餌効率低下 ・ PLT 増加 ・ TG 低下、リン増加、Ure 増加
6,300 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制 ・ 摂餌量減少、食餌効率低下 	6,300 ppm 以下毒性所見なし
2,000 ppm	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 (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、100、300 及び 1,000 mg/kg 体重/日) 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。

血液生化学的検査において、投与 6 週に全投与群の雌雄で T.Bil が有意に増加した。しかし、対照群を含む全動物が背景データを超える異常な高値を示しており、RBC 及び尿中ビリルビンには影響がなかったこと、投与 13 週に同様の変化が認められなかったことから、検体投与による影響とは考えられなかった。その他の血液生化学的及び血液学的検査において有意な変化が認められたが、いずれの変化も軽微であり、用量あるいは雌雄間で一貫性が認められなかったことから、検体投与の影響ではないと考えられた。

尿検査において、1,000 mg/kg 体重/日投与群の雌で尿量の有意な減少が投与 6 及び 13 週に認められたが、投与開始前の傾向を反映しており、検体投与の影響ではないと判断された。

本試験において、1,000 mg/kg 体重/日投与群の雌雄で体重増加抑制、摂餌量減少等が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 300 mg/kg 体重/日であると考えられた。(参照 28)

表 19 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
1,000 mg/kg 体重/日	<ul style="list-style-type: none">・ 体重増加抑制・ 摂餌量減少(投与4週まで)	<ul style="list-style-type: none">・ 体重増加抑制・ 摂餌量減少(投与4週まで)・ ALP 増加
300 mg/kg 体重/日 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

(3) 21日間亜急性経皮毒性試験 (ラット)

SD ラット (一群雌雄各 10 匹) を用いた経皮 (原体 : 0、100、300 及び 1,000 mg/kg 体重/日) 投与 (1 日 1 回 6 時間、閉塞貼付) による 21 日間亜急性経皮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。

血液学的及び血液生化学的検査において、いくつかの項目で統計学的に有意な変化が認められたが、いずれの変化も軽微であり、投与量あるいは雌雄間で一貫性が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された。

病理組織学的検査において、1,000 mg/kg 体重/日投与群の雌雄及び 300 mg/kg 体重/日投与群の雌で投与部位で表皮過形成の程度の増強が認められたが、検体投与方法に起因した物理的刺激による変化と考えられ、毒性学的意義はないと判断された。

本試験において、1,000 mg/kg 体重/日投与群の雄において体重増加抑制及び食餌効率低下が認められ、雌では検体投与の影響は認められなかったことから、無毒性量は雄で 300 mg/kg 体重/日、雌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。（参照 29）

表 20 21 日間亜急性経皮毒性試験（ラット）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
1,000 mg/kg 体重/日	・ 体重増加抑制 ・ 食餌効率低下	・ 毒性所見なし
300 mg/kg 体重/日以下	・ 毒性所見なし	

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、10、100、300 及び 1,000 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。各投与群で認められた毒性所見は表 21 に示されている。

一般状態観察において、液状便が 1,000 mg/kg 体重/日投与群の雌雄で投与期間を通じて認められ、300 mg/kg 体重/日投与群においても断続的に認められた。しかし、本所見に関連した消化器の病理組織学的変化（炎症等）が認められなかったことから、毒性学的意義はないと考えられた。

体重増加量においては、100 mg/kg 体重/日以上投与群の雄及び 1000 mg/kg 体重/日投与群の雌で投与 0～4 週、100 mg/kg 体重/日以上投与群の雌で 0～13 週において有意な低値が認められた。

血液学的、血液生化学的（TP 及び Alb 以外）及び尿検査において、いくつかの項目に有意な変化がみられたが、それらの変化は軽微であり、投与前と同様の傾向を示すか、投与量、雌雄あるいは検査時期で一貫性が認められなかったことから、検体投与の影響とは考えられなかった。

臓器重量測定において、100、300 及び 1,000 mg/kg 体重/日投与群の雄で、副腎比重量が有意に増加した。この変化は、300 及び 1,000 mg/kg 体重/日投与群では病理組織学的検査で認められた皮質細胞肥大と関連していたが、100 mg/kg 体重/日投与群では関連する病理組織学的変化は認められないため、同群における副腎比重量増加には毒性学的意義はないと判断された。

剖検において、食道の退色が 300 及び 1,000 mg/kg 体重/日投与群の雄で認められたが、関連する病理組織学的変化は認められなかった。雌雄の投与群で、胸腺の小型化が認められ、病理組織学的検査で認められた退縮/萎縮の程度と関連していた。

本試験において、100 mg/kg 体重/日以上投与群の雌雄で体重増加抑制が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 10 mg/kg 体重/日であると考えられ

た。(参照 30)

表 21 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
1,000 mg/kg 体重/日	<ul style="list-style-type: none"> ・ 摂餌量減少 ・ TP 低下、Alb 低下 ・ 小葉中心性肝細胞肥大 	<ul style="list-style-type: none"> ・ TP 低下、Alb 低下
300 mg/kg 体重/日 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ 副腎比重量増加 ・ 副腎皮質細胞肥大(2 匹) 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 摂餌量減少 (1-4 週)(有意差は1,000 mg/kg 体重/日投与群のみ)
100 mg/kg 体重/日 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制
10 mg/kg 体重/日	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)

Wistar ラット(一群雌雄各 70 匹、発がん性群; 一群雌雄各 50 匹、慢性毒性群; 一群雌雄各 20 匹)を用いた混餌[原体: 0、200(慢性毒性群のみ)、2,000、10,000 及び 20,000 ppm: 平均検体摂取量は表 22 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 22 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 (mg/kg 体重/日)

投与群		200 ppm	2,000 ppm	10,000 ppm	20,000 ppm
慢性毒性群 (1~52 週)	雄	11.1	112	568	1,160
	雌	14.3	147	753	1,500
発がん性群 (1~104 週)	雄	—	96.0	496	1,000
	雌	—	129	697	1,440

各投与群で認められた毒性所見は表 23 に示されている。

発がん性群において、最後の 13 週に 10,000 及び 20,000 ppm 投与群の雌で死亡が増加し、20,000 ppm 投与群では生存率が有意に低下した。

血液生化学的検査において、URE、Cre、Glu、T.Chol 及び TG に統計学的に有意な変動が認められたが、いずれの個体値も背景データの範囲内にあり、用量相関性または検査時期間での一貫性が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。

尿検査において、尿量が 20,000 ppm 投与群の雄で投与 12 週に低下し、投与 51 週に雌の投与群で低下した。これらの変化は、軽度で用量相関性のない変化であり、実施機関の背景データの範囲内の変動であったことから、検体投与による影響とは考えられなかった。

病理組織学的検査の結果、前胃の扁平上皮癌が 20,000 ppm 投与群の雌 1

匹で、扁平上皮乳頭腫が 20,000 ppm 投与群の雌 2 匹及び 10,000 ppm 投与群の雌 1 匹で認められた (表 24 参照)。10,000 ppm 以上投与群の雌では、前胃に炎症性及び過形成性変化が認められており、前胃に認められた腫瘍は、慢性炎症性変化に起因すると考えられた。

非腫瘍性病変のうち、検体投与の影響と考えられる病変が、肝臓、腎臓、前胃、盲腸、十二指腸、甲状腺及び腸間膜リンパ節に認められた。

腎臓の皮質尿細管色素沈着が雌雄で認められ、この色素はシュモール反応陽性であり、リポフスチンであることが証明された。

本試験において、2,000 ppm 以上投与群の雌雄で体重増加抑制、肝比重量増加、小葉中間帯肝細胞空胞化等が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 200 ppm (雄: 11.1 mg/kg 体重/日、雌: 14.3 mg/kg 体重/日) であると考えられた。10,000 ppm 以上投与群の雌雄で肝細胞腺腫が増加し、雌で前胃腫瘍が低頻度ながら発生した。(参照 32)

(肝臓腫瘍の発生機序に関しては[14. (1)]、前胃腫瘍の発生機序に関しては[14. (2)]を参照)

表 23 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

投与群	試験群	雄	雌
20,000 ppm	両群	・腎皮質尿細管色素沈着(リポフスチン)	・小葉中心性肝細胞肥大
	慢性毒性	・肝外胆管拡張 ・肝門脈周囲炎症	・肝外胆管拡張
	発がん性	・肝嚢胞 ・甲状腺ろ胞細胞肥大	・生存率低下 ・背部脱毛 ・肝小葉像明瞭化、骨格筋萎縮 ・甲状腺ろ胞細胞肥大、甲状腺嚢胞状ろ胞細胞過形成 ・子宮筋層萎縮、子宮筋層線維化 ・膈上皮粘液分泌低下 ・前胃扁平上皮癌
10,000 ppm 以上	両群	・摂餌量減少 ・食餌効率減少 ・小葉中心性肝細胞肥大	・食餌効率減少 ・肝比重量増加 ・腎比重量増加
	慢性毒性	・腸間膜リンパ節洞赤血球増加/赤血球貪食、肥満細胞症(有意差は20,000 ppmのみ)	・GGT 増加(26週時) ・尿 pH 上昇、尿蛋白増加 ・肝内胆管過形成 ・腎皮質尿細管好塩基性化(有意差は20,000 ppmのみ) ・腸間膜リンパ節洞赤血球増加/赤血球貪食(有意差は20,000 ppmのみ)、肥満細胞症
	発がん性	・腹部脱毛 ・肝絶対重量増加	・削瘦、立毛、円背位、過剰咀嚼、歯牙退色

		<ul style="list-style-type: none"> 肝嚢胞性変性 腎皮質尿細管色素沈着(リポフスチン)、慢性腎症(有意差は20,000 ppmのみ)、皮質尿細管好塩基性化、腎乳頭鉍質沈着 腸間膜リンパ節洞赤血球増加/赤血球貪食(有意差は20,000 ppmのみ)、肥満細胞症 肝細胞腺腫 	<ul style="list-style-type: none"> 肝絶対重量増加 腸間膜リンパ節うっ血、子宮非薄化 小葉中心性肝細胞肥大、小葉中間帯肝細胞空胞化 慢性腎症、腎乳頭鉍質沈着 腸間膜リンパ節洞赤血球増加/赤血球貪食、肥満細胞症(有意差は10,000 ppmのみ)、洞組織球症 前胃上皮過形成/角化亢進/潰瘍/粘膜下織炎症/粘膜下織浮腫(有意差は20,000 ppmのみ)、漿膜炎 前胃扁平上皮乳頭腫 盲腸粘膜下織浮腫(有意差は20,000 ppmのみ) 角膜炎 肝細胞腺腫
2,000 ppm 以上	両群	<ul style="list-style-type: none"> 体重増加抑制 肝比重量増加 肝内胆管過形成 	<ul style="list-style-type: none"> 体重増加抑制 摂餌量減少 腎皮質尿細管色素沈着(リポフスチン)
	慢性毒性	<ul style="list-style-type: none"> GGT 増加 尿 pH 上昇 腎比重量増加 小葉中間帯肝細胞空胞化 	<ul style="list-style-type: none"> 肝比重量増加 小葉中間帯肝細胞空胞化(有意差は10,000 ppm以上)
	発がん性	<ul style="list-style-type: none"> 小葉中心性肝細胞肥大 	<ul style="list-style-type: none"> 肝内胆管過形成 腎皮質尿細管好塩基性化(2,000 ppm群のみ)
200 ppm	慢性毒性	毒性所見なし	毒性所見なし

表 24 2年間慢性毒性/発がん性併合試験(ラット)において認められた
肝臓及び前胃腫瘍発生数

性別	雄				雌				
	0	2,000	10,000	20,000	0	2,000	10,000	20,000	
投与群 (ppm)	0	2,000	10,000	20,000	0	2,000	10,000	20,000	
検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50	
肝・肝細胞腺腫	最終と殺動物	0	2	9↑	12↑	0	1	16↑	10↑
	死亡動物	0	0	1	1	0	0	8↑	18↑
	全動物	0	2	10↑	13↑	0	1	24↑	28↑
肝・肝細胞癌	最終と殺動物	0	0	1	0	0	0	2	1
	死亡動物	0	0	0	0	0	0	0	0
	全動物	0	0	1	0	0	0	2	1
前胃・扁平上皮乳頭腫	最終と殺動物	0	0	0	0	0	0	0	0
	死亡動物	0	0	0	0	0	0	1	2
	全動物	0	0	0	0	0	0	1	2
前胃・扁平上皮癌	最終と殺動物	0	0	0	0	0	0	0	1
	死亡動物	0	0	0	0	0	0	0	0
	全動物	0	0	0	0	0	0	0	1

Fisher 直接確率法、↑↓ : p<0.05、↑↓ : p<0.01

(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、100、800、4,000 及び 8,000 ppm: 平均検体摂取量は表 25 参照) 投与による 18 カ月間発がん性試験が実施された。

表 25 18 カ月間発がん性試験 (マウス) の平均検体摂取量

投与群		100 ppm	800 ppm	4,000 ppm	8,000 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	11.6	97.8	494	1,040
	雌	13.5	121	594	1,260

各投与群で認められた毒性所見は表 26 に示されている。

非腫瘍性病変について、盲腸では、粘膜、粘膜下織及び粘膜下織細静脈壁の細胞内色素沈着が、800 ppm 以上投与群の雌雄に認められた。この色素については、ヘモジデリン、リポフスチン、胆汁色素等が疑われ特殊染色を試みたが同定できなかった。

腫瘍性病変については、800 ppm 以上投与群の雄において、肝細胞腺腫の発生数が有意に増加した (表 27 参照)。

本試験において、800 ppm 以上投与群の雌雄で、盲腸粘膜、粘膜下織及び粘膜下織細静脈壁細胞内色素沈着等が認められたことから、無毒性量は、雌雄とも 100 ppm (雄: 11.6 mg/kg 体重/日、雌: 13.5 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 31)

(肝臓腫瘍の発生機序に関しては[14. (1)]を参照)

表 26 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
8,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・食餌効率低下 ・巣状肝細胞壊死 	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制
4,000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 	<ul style="list-style-type: none"> ・肝絶対及び比重量増加 ・腎皮質尿細管好塩基性化(有意差は 4,000 ppm のみ)
800 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・肝絶対及び比重量増加 ・盲腸粘膜細胞内色素沈着、盲腸粘膜下織及び粘膜下織細静脈壁細胞内色素沈着(有意差は 4,000 及び 8,000 ppm) ・肝細胞腺腫 	<ul style="list-style-type: none"> ・盲腸粘膜細胞内色素沈着(有意差は 4,000 ppm のみ)、盲腸粘膜下織及び粘膜下織細静脈壁細胞内色素沈着(有意差は 4,000 及び 8,000 ppm) ・腎血管周囲性リンパ球細胞集簇(有意差は 8,000 ppm のみ)
100 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・毒性所見なし 	<ul style="list-style-type: none"> ・毒性所見なし

表 27 18 カ月間発がん性試験（マウス）で認められた肝細胞腺腫の発生数

性別		雄				
投与群 (ppm)		0	100	800	4,000	8,000
検査動物数		50	50	50	50	50
肝細胞腺腫	78 週最終と殺動物	7	11	12	20↑	17
	死亡動物	1	1	5↑	3	1
	全動物	8	12	17↑	23↑	18↑
	腫瘍数/匹	0.22	0.34	0.50	0.80	0.60

Fisher 直接確率法、↑ ↓ : p<0.05、↑ ↓ : p<0.01

1 2. 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 28 匹 (P 世代) または 24 匹 (F₁ 世代)] を用いた混餌（原体：0、120、600、3,000 及び 15,000 ppm：平均検体摂取量は表 28 参照）投与による 2 世代繁殖試験が実施された。

表 28 2 世代繁殖試験（ラット）における平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)

投与群		120 ppm	600 ppm	3,000 ppm	15,000 ppm
P 世代	雄	9.8	48.5	240	1,200
	雌	10.5	53.0	261	1,290
F ₁ 世代	雄	11.7	59.0	307	1,690
	雌	13.0	64.6	338	1,810

各投与群で認められた毒性所見は、それぞれ表 29 に示されている。

親動物において P 世代では繁殖性に関する検査項目には検体投与の影響は認められなかったが、F₁ 世代の 15,000 ppm 投与群において性周期延長、交尾率低下、卵巣萎縮、卵胞数減少、子宮筋層非薄化、子宮扁平上皮化生等が観察され、15,000 ppm 投与群の F₁ では妊娠雌が 2 例しか得られず、F₂ 出生児の評価は不可能となった。F₁ 雄の交配実験で繁殖性には異常がみられなかったことから、F₁ 雌に繁殖性の低下の原因があると考えられた。本試験において、3,000 ppm 以上投与群の親動物雌雄で体重増加抑制及び摂餌量減少が、児動物で体重増加抑制、胸腺絶対及び比重量減少等が認められたことから、親動物及び児動物雌雄の無毒性量は 600 ppm (P 雄：48.5 mg/kg 体重/日、P 雌：53.0 mg/kg 体重/日、F₁ 雄：59.0 mg/kg 体重、F₁ 雌：64.6 mg/kg 体重/日) と判断された。繁殖能に対する無毒性量は、3,000 ppm 投与群の雌で卵巣機能低下（萎縮）が認められ、雄では繁殖能に対する影響は認められなかったため、雄では本試験の最高用量 15,000 ppm (P 雄：1,200 mg/kg 体重/日、F₁ 雄：1,690 mg/kg 体重)、雌では 600 ppm (P 雌：53.0 mg/kg 体

重/日、F₁雌：64.6 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 33)
 (繁殖成績低下に関する検討試験は[14. (3)]、卵巣の萎縮性変化に関する検討試験は[14. (4)]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	15,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 卵巣絶対及び比重量減少 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 腹部膨満 ・ 副腎比重量増加 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 腹部膨満 ・ 育成中体重増加抑制及び摂餌量低下(妊娠中及び授乳中は評価せず) ・ 性周期延長 ・ 交尾率低下、受胎率低下、繁殖率低下 ・ 卵巣絶対及び比重量減少、副腎絶対及び比重量増加、腎絶対及び比重量減少、下垂体絶対及び比重量増加、子宮絶対及び比重量減少 ・ 卵巣小型化 ・ 原始卵胞数減少 ・ 子宮ヘモジデリン沈着減少、血管壁フィブリノイド壊死減少、筋層菲薄化、扁平上皮化生 ・ 下垂体前葉細胞空胞化
	3,000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ 摂餌量減少 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制 ・ 摂餌量減少 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制 ・ 摂餌量減少 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 妊娠中体重増加抑制(3,000 ppm 群のみ)(授乳中は体重増加) ・ 摂餌量減少(妊娠及び授乳中)(3,000 ppm 群のみ) ・ 卵巣萎縮
	600 ppm 以下	毒性所見なし		毒性所見なし	
児動物	15,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ 腹部膨満 ・ 性成熟遅延 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 腹部膨満 ・ 子宮絶対及び比重量減少 	(十分な産児数が得られなかったため評価不可能)	
	3,000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ 低体重及び体重増加抑制 ・ 胸腺絶対及び比重量減少 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 低体重及び体重増加抑制 ・ 性成熟遅延 ・ 胸腺絶対及び比重量減少 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 低体重及び体重増加抑制 ・ 胸腺絶対及び比重量減少 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 低体重及び体重増加抑制 ・ 胸腺絶対及び比重量減少、子宮絶対及び比重量減少
	600 ppm 以下	毒性所見なし		毒性所見なし	

(2) 発生毒性試験 (ラット)

Wistar 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: 0.5%MC 水溶液) 投与して発生毒性試験が実施された。

母体ではいずれの群にも死亡は認められず、検体投与の影響は認められなかった。

胎児では、各群に奇形、変異及び骨化遅延が散見されたが、その発生頻度はいずれも低く、対照群と検体投与群との間に有意差は認められなかった。1,000 mg/kg 体重/日投与群の 2 母体の 12 胎児に口蓋裂が認められたが、口蓋裂は実施施設においてこの系統のラットで自然発生奇形として観察されており、本試験における発生頻度は背景データ (0~3.5%) の上限とほぼ同様であることから、口蓋裂発現は検体投与によるものではないと考えられた。さらに、本試験で口蓋裂を有する胎児の母動物と交配した雄ラットは他の試験においても口蓋裂を有する胎児の親であったことから、本試験における口蓋裂発生には遺伝的要素がかかわっている可能性が考えられた。

本試験において、いずれの投与群にも検体投与の影響が認められなかったことから、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 34)

(3) 発生毒性試験 (ラット・高用量・確認試験)

ラットを用いた発生毒性試験 [12. (2)] において、1,000 mg/kg 体重/日投与群の胎児に観察された口蓋裂は検体投与によるとは考えられなかったため、Wistar ラット (一群雌 20 匹) の妊娠 6~19 日に本剤をより高用量で強制経口 (原体: 0 及び 1,500 mg/kg 体重/日、溶媒: 0.5%MC 水溶液) 投与して催奇形性が検討された。

母体では、いずれの群においても死亡は認められず、検体投与に起因すると考えられる一般状態の変化も認められなかった。1,500 mg/kg 体重/日投与群において、投与期間中の摂餌量が減少したが、体重変化、剖検所見、妊娠子宮重量、黄体数、着床数、吸収胚/死亡胎児数、生存胎児数、胎児の性比及び胎児重量に検体投与の影響は認められなかった。

胎児については、いずれの群にも奇形は認められなかった。1500 mg/kg 体重/日投与群の内臓及び骨格の変異を有する胎児の発現頻度には対照群との差は認められなかった。骨化進行度では、本剤投与群で中手骨の骨化数の減少が (左右: 3.4) 認められたが、この変化は背景データ (左: 3.31~3.95、右: 3.31~3.97) の範囲内であったことから、骨化数減少は検体投与の影響ではないと考えられた。

また、胸骨分節、後頭骨、仙尾椎及びその他の四肢骨における骨化状態に、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、母動物及び胎児で本試験の最高用量 1,500 mg/kg 体重/日であると考えられた。

ラットを用いた発生毒性試験[12. (2)]で認められた口蓋裂は本剤投与によるものではないと考えられた。(参照 35)

(4) 発生毒性試験 (ウサギ)

NZW ウサギ (一群各雌 24 匹) の妊娠 6~28 日に強制経口 (原体: 0、30、100 及び 300 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。

母動物については 300 mg/kg 体重/日投与群で体重が低値を示し、妊娠子宮重量を除いた補正体重は 300 及び 100 mg/kg 体重/日投与群で低値を示した。摂餌量は 300 mg/kg 体重/日投与群では投与期間を通じて、100 mg/kg 体重/日投与群では投与期間前半に低かった。剖検及び着床所見 (妊娠子宮重量、黄体数、着床数、吸収胚数、生存胎仔数、胎盤重量) に検体投与の影響は認められなかった。

胎児では、胎児体重、生存胎児数、胎児の性比及び奇形を有する胎児の発生頻度に検体投与の影響は認められなかった。

本試験において、100 mg/kg 体重/日投与群の母動物に体重増加抑制及び摂餌量減少が認められ、胎児で検体投与の影響が認められなかったことから、無毒性量は母動物で 30 mg/kg 体重/日、胎児で本試験の最高用量 300 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 36)

13. 遺伝毒性試験

アミスルブロムの細菌を用いた復帰突然変異試験、マウスリンパ腫由来細胞 (L5178Y) を用いた遺伝子突然変異試験、ヒト末梢血リンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験、マウス骨髄細胞を用いた小核試験、ラット肝細胞を用いた小核試験、ラット肝細胞を用いた不定期 DNA 合成 (UDS) 試験、マウス肝細胞を用いたコメットアッセイ、ラットの肝、前胃及び腺胃細胞を用いたコメットアッセイが実施された。

試験結果は表 30 に示されている。すべての試験において陰性であったことから、アミスルブロムに遺伝毒性はないものと考えられた。(参照 37~41、54~57、70、71)

表 30 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> (WP2uvrA 株)	5~5,000 µg/7 ⁺ レット (+/-S9)	陰性
	遺伝子突然変異試験	マウスリンパ腫由来細胞 (L5178Y)	2.5~20 µg/mL (-S9) 5~70 µg/mL (+S9)	陰性
	染色体異常試験	ヒト末梢血リンパ球	5.04~123 µg/mL (-S9) 73.4~240 µg/mL (+S9)	陰性
<i>in vivo</i>	小核試験	ICR マウス (骨髄細胞) (一群雄 7 匹)	0、500、1,000、2,000 mg/kg 体重 (単回経口投与)	陰性
	小核試験	Fischer ラット (肝細胞) (一群雌 4 匹)	0、500、2,000 mg/kg 体重 (単回経口投与)	陰性
	UDS 試験	Fischer ラット (肝細胞) (一群雄 3 匹)	0、400、2,000 mg/kg 体重 (単回経口投与)	陰性
	コメント アッセイ	Wistar ラット (肝細胞) (一群雌 4 匹)	0、500、2,000 mg/kg 体重 (単回経口投与)	陰性
		ICR マウス (肝細胞) (一群雄 4 匹)	0、500、2,000 mg/kg 体重 (単回経口投与)	陰性
		Wistar ラット (肝細胞) (一群雌雄各 5 匹)	0、20,000 ppm (一週間混餌投与)	陰性
		ICR マウス (肝細胞) (一群雄 5 匹)	0、8,000 ppm (一週間混餌投与)	陰性
		Wistar ラット (前胃及び腺胃細胞) (一群雌 4 匹)	0、500、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

分解物 D 及び代謝物 G について、細菌を用いた復帰突然変異試験及びマウス骨髄細胞を用いた小核試験が実施された。結果は表 31 に示されている。すべての試験において陰性であった。(参照 42~45)

表 31 遺伝毒性試験概要（分解物及び代謝物）

被験物質	試験	対象	投与量	結果
分解物 D	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、TA1535、 TA1537) <i>E. coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> 株)	0.064~5,000 µg/7 ^レ ート (+/-S9)	陰性
	小核試験	ICR マウス (骨髄細胞) (一群雄 6 匹)	53.0~210 mg/kg 体重/日 (2 回経口投与)	陰性
代謝物 G	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)	50~5,000 µg/7 ^レ ート (+/-S9)	陰性
	小核試験	ICR マウス (骨髄細胞) (一群雄 7 匹)	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

14. その他の試験

(1) 肝における催腫瘍性に関する検討試験

マウス及びラットを用いた発がん性試験[11. (2) 及び(3)]の結果、高用量群の肝臓において催腫瘍性が認められたため、本剤の催腫瘍性に関する作用機序を解明するため、以下の試験①～⑤ならびにラット及びマウスの肝細胞、ラットの前胃及び腺胃細胞を用いたコメットアッセイ[13. (表 30)]を追加実施した。

その結果、肝小核試験（ラット）及びコメットアッセイ（ラット及びマウス）の結果がいずれも陰性であったことから、本剤の肝臓に認められた催腫瘍性は、本剤の遺伝子障害性に起因するものでなく、プロモーション作用によるものであり、ROS による酸化ストレス及び細胞増殖活性の亢進が関与している可能性が示唆された。よって、本剤は非遺伝毒性発がん物質に分類され、催腫瘍性には閾値が設定できるものと考えられた [肝腫瘍に関する無毒性量：ラット 2,000 ppm（雄：96.0 mg/kg 体重/日、雌：129.2 mg/kg 体重/日）、マウス 100 ppm（雄：11.6 mg/kg 体重/日）。

① 中期肝発がん性試験（ラット）

イニシエーション処理（*N*-ニトロソジエチルアミン（DEN）を 2,000 mg/kg 体重の用量で 1 回腹腔内投与）した Fishcer ラット（一群雄 20 匹、DEN 無処理群は 10 匹）を用いて、6 週間混餌（原体：0、200、2,000 及び 20,000 ppm：平均検体摂取量は表 32 参照）投与による肝中期発がん性試験が実施された。

表 32 中期肝発がん性試験（ラット）における検体摂取量

投与群	200 ppm	2,000 ppm	20,000 ppm	20,000 ppm
イニシエーション処理	DEN	DEN	DEN	—
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	12.0	120	1,450	1,800

20,000 ppm 投与群及び DEN 無処理 20,000 ppm 投与群で投与期間を通じて有意な体重増加抑制が認められた。20,000 ppm 投与群及び DEN 無処理 20,000 ppm 投与群で投与期間の大半で有意差はない摂餌量の高値傾向が認められた。2,000 以上投与群及び DEN 無処理 20,000 ppm 投与群において、肝絶対重量及び比重量が有意に増加し、検体投与の影響と考えられた。全動物について剖検したが、肉眼的に検体投与に起因する変化は認められなかった。200 ppm 投与群では肝比重量の軽度な増加が認められた。本試験の結果、GST-P 陽性細胞巢の数及び面積は、ともに DEN 処置を施した 2,000 ppm 以上の投与群では、DEN 単独処置群と比較して有意に増加した。なお、DEN 無処置 20,000 ppm 投与群では GST-P 陽性細胞巢の発生は認められなかった。

以上の結果より、本剤は 2,000 ppm (120 mg/kg 体重/日) 以上投与群で肝発がんプロモーション作用を有するが、200 ppm (12.0 mg/kg 体重/日) では作用しないことが示された。(参照 46)

② 肝薬物代謝酵素誘導試験（ラット）

Wistar ラット（一群雌雄各 5 匹、肝薬物代謝酵素活性測定用には一群雌雄各 4 匹）に 7 日間混餌（原体：0、200 及び 20,000 ppm：平均検体摂取量は表 33 参照）投与し、肝薬物代謝酵素誘導試験が実施された。陽性対照群として、フェノバルビタール（PB、50 mg/kg 体重/日）を 7 日間強制経口投与する群を設けた。

表 33 肝薬物代謝酵素誘導試験（ラット）における平均検体摂取量

投与群		200 ppm	20,000 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	21.1	1,950
	雌	20.6	2,080

20,000 ppm 投与群の雄では、投与開始 3 及び 7 日に体重増加抑制が認められ、摂餌量も有意に低下した。同群においては、剖検時、雌雄で肝絶対重量及び比重量が有意に増加した。肝薬物代謝酵素活性の測定において、20,000 ppm 投与群の雌雄で、PB 投与により特徴的に強く誘導される

PROD 活性の顕著な増加 (13~15 倍) が認められた。また、EROD 活性、MFCOD 活性、T-OH 活性も陽性対照群と同様に有意に増加した。一方、200 ppm 投与群ではすべての測定項目で有意な変化は認められなかった。

以上の結果から、本剤は 20,000 ppm (雄: 1,950 mg/kg 体重/日、雌: 2,080 mg/kg 体重/日) 投与群の雌雄で PB に類似した肝薬物代謝酵素活性誘導能を示したが、200 ppm (雄: 21.1 mg/kg 体重/日、雌: 20.6 mg/kg 体重/日) 投与群では誘導は認められなかった。(参照 47)

③ 肝薬物代謝酵素誘導試験 (マウス)

ICR マウス (一群雌雄各 5 匹、肝薬物代謝酵素活性測定用には一群雌雄各 4 匹) に 7 日間混餌 (原体: 0、100 及び 8,000 ppm: 平均検体摂取量は表 34 参照) 投与し、その後、肝臓の薬物代謝酵素活性を測定する肝薬物代謝酵素誘導試験が実施された。陽性対照群として、PB (50 mg/kg 体重/日) を 7 日間強制経口投与する群を設けた。

表 34 肝薬物代謝酵素誘導試験 (マウス) における平均検体摂取量

投与群		100 ppm	8,000 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	13.4	1080
	雌	16.9	1310

体重変化において、検体投与群では有意な変化は認められなかった。陽性対照群では雌雄とも有意な体重増加抑制が認められた。摂餌量において、8,000 ppm 投与群の雌雄及び陽性対照群の雌で、投与 3 日目に有意な低下が認められた。剖検時の臓器重量測定において、8,000 ppm 投与群及び陽性対照群の雌雄の肝比重量が有意に増加した。肝薬物代謝酵素活性測定では、8,000 ppm 投与群の雌雄において PB 投与で特徴的に強く誘導される PROD 活性の有意な増加 (1.6~1.9 倍) が認められた。また、雌雄で EROD 活性が有意に増加し、有意差はないものの雄で T-OH 活性が増加した。

以上の結果より、本剤は 8,000 ppm (雄: 1,080 mg/kg 体重/日、雌: 1,310 mg/kg 体重/日) の用量で、雌雄マウスに PB に類似した肝薬物代謝酵素活性誘導能を示したが、100 ppm (雄: 13.4 mg/kg 体重/日、雌: 16.9 mg/kg 体重/日) では誘導は認められなかった。(参照 48)

④ 複製 DNA 合成 (RDS) 試験

Wistar ラット及び ICR マウスを用いて、検体を単回強制経口投与または反復投与(混餌)し、その後、単回投与では投与 24、39 及び 48 時間後、反復投与では 0、3 及び 7 日後に剖検し、肝臓での BrdU 取り込みを指標とした RDS 誘発率を測定した。なお、陽性対照群には、PB (50 mg/kg 体重/日) を投与した。

試験結果は表 35 に示されている。(参照 49~51)

表 35 RDS 試験概要

投与方法 試験期間	供試 動物	一群あたり 供試数	投与量 (mg/kg 体重)	試験成績	結果及び無毒性量 (mg/kg 体重)
単回投与 (強制経口) 48 時間	Wistar ラット (参照 49)	雌雄 各 4	0、1,000、2,000	2,000 mg/kg 体重投与群の雄で肝重量増加 1,000 mg/kg 体重以上投与群の雌雄で RDS 誘発率増加	RDS 誘発能あり
反復投与 (混餌投与) 7 日間	Wistar ラット (参照 50)	雌雄 各 4	0、200、2,000、 10,000 ppm ----- 雄：14.6、136、572 雌：16.6、150、656	10,000 ppm 投与群の雄で3日目に体重増加抑制 2,000 ppm 投与群の雄及び10,000 ppm 投与群の雌雄で3日に、10,000 ppm 投与群の雄及び2,000 ppm 投与群の雌は7日に摂餌量減少 2,000 ppm 以上投与群で3日目に RDS 誘発率増加	RDS 誘発能あり(3日をピークとする一過性の変化) 雄：14.6 (200 ppm) 雌：16.6 (200 ppm)
	ICR マウス (参照 51)	雌雄 各 4	0、100、8,000 ppm ----- 雄：15.3、1,020 雌：16.6、1,230	8,000 ppm 投与群の雌雄で3日目に摂餌量減少 8,000 ppm 投与群の雄で RDS 誘発率増加	RDS 誘発能あり(雄のみ) 雄：15.3 (100 ppm) 雌：16.6 (100 ppm)

⑤ 肝臓での 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) の免疫組織化学染色及び 8-OHdG 測定試験及び活性酸素種測定試験

Wistar ラット(一群雌各 3 匹)に 7 日間を混餌(原体:0 及び 10,000 ppm)投与した後、剖検し肝臓を用いて酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の免疫組織化学染色を行い、8-OHdG 陽性率を算出した。マウスについては、7 日間反復経口投与による RDS 試験[14. (1)④]のホルマリン固定標本を用いて試験が実施された。陽性対照群には、PB をラットには 500 及び 1,500 ppm の濃度で 7 日間混餌投与し、マウスには 50 mg/kg 体重/日を 1 日 1 回、7 日間強制経口投与した。

また、Wistar ラット(一群雌雄各 5 匹)及び ICR マウス(一群雌雄各 5 匹)に 7 日間混餌[原体:0 及び 10,000 (ラット)/8,000 (マウス) ppm]

投与した後、各動物から摘出した肝臓の DNA を調製し、HPLC/ECD を用いて 8-OHdG を測定した。さらに、これらの動物の肝臓試料を用いて活性酸素種 (ROS) を測定した。

試験結果は表 36 に示されている。

8-OHdG 免疫染色の結果、雌ラットの 7 日間混餌投与において、10,000 ppm の用量で 8-OHdG 陽性率に変化は認められず、肝臓に酸化ストレスを誘発しなかった。(参照 52)

表 36 肝臓での酸化ストレス解析試験概要

投与方法 試験期間	供試動物	一群あたり 供試数	投与量 (mg/kg 体重)	試験成績
反復投与 (混餌) 7 日間	ラット (参照 52)	雌 3	0、10,000 ppm ----- 雌 : 1,010	10,000 ppm 投与群で 3 日に摂餌量減少 10,000 ppm 投与群の雌で 8-OHdG 陽性率変化なし。(免疫染色法)
	マウス (参照 53)	雌雄各 4	0、8,000 ppm ----- 雄 : 1,020 雌 : 1,230	8,000 ppm 投与群の雌雄で 8-OHdG 陽性率変化なし。(免疫染色法)
	ラット (参照 67)	雌雄各 5	0、10,000 ppm ----- 雄 : 1,240 雌 : 1,050	8-OHdG 誘発なし。(HPLC/ECD 法)
	マウス (参照 68)	雌雄各 5	0、10,000 ppm ----- 雄 : 1,423 雌 : 1,570	8-OHdG 誘発なし。(HPLC/ECD 法)
	ラット (参照 69)	雌雄各 5	0、10,000 ppm ----- 雄 : 1,240 雌 : 1,050	雄で ROS 産生増加。
	マウス (参照 70)	雄 5	0、8,000 ppm ----- 雄 : 1,420	ROS 産生増加。

(2) 胃における催腫瘍性に関する検討試験

前胃において認められた催腫瘍性の作用機序解明のため、ラットの前胃及び腺胃細胞を用いたコメットアッセイを追加実施した[13. (表 30)]。

その結果コメットアッセイ陰性であり、その他の変異原性試験においても陰性であったことから、本剤には遺伝子障害作用のないことが確認された。

ラットにおける 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験[11. (2)]において、前胃腫瘍は雌の 10,000 ppm 以上投与群でのみ認められ、これらの群では前胃粘膜の炎症、潰瘍及び過形成が多発していた。これに対し、前胃腫瘍が認められなかった雌 2,000 ppm 投与群及び雄投与群では、これらの変化は認めら