

で腎絶対及び比重量⁴増加が認められたので、無毒性量は雄で 64 ppm (4.1 mg/kg 体重/日)、雌で 500 ppm (39 mg/kg 体重/日) であると考えられた。
(参照 2、3)

表 29 90 日間亜急性毒性試験 (ラット) ①で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
4,000 ppm	・体重増加抑制	・体重増加抑制 ・腎絶対及び比重量増加
500 ppm 以上	・腎絶対及び比重量増加	500 ppm 以下
64 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

(2) 90 日間亜急性毒性試験 (ラット) ②

Wistar ラット (一群雌雄各 10 匹) を用いた混餌 (原体 : 0、7,500、10,000 及び 20,000 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 30 に示されている。

本試験において、7,500 ppm 以上投与群の雌雄で縮瞳、無気力等が認められたので、無毒性量は雌雄とも 7,500 ppm (雄 : 522 mg/kg 体重/日、雌 : 574 mg/kg 体重/日) 未満であると考えられた。(参照 2、3、17)

表 30 90 日間亜急性毒性試験 (ラット) ②で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
20,000 ppm	・鎮静、横臥、円背位、喘ぎ呼吸、削瘦、粗毛	・2 例死亡 (胸腺萎縮) ・鎮静、横臥、円背位、喘ぎ呼吸、削瘦、粗毛
10,000 ppm 以上	・血清 LDH 及び CK 活性低下 (約 20%) ・カルシウム増加	・RBC 減少、網状赤血球数増加 ・血清 LDH 及び CK 活性低下 (約 20%)
7,500 ppm 以上	・RBC 減少、網状赤血球数増加 ・縮瞳、無気力、注意力低下及び毛づくろい減少、体幹緊張性及び発声増加等	・縮瞳、無気力、注意力低下及び毛づくろい減少、体幹緊張性及び発声増加等

(3) 90 日間亜急性毒性試験 (マウス) ①

NMRI マウス (一群雌雄各 10 匹) を用いた混餌 (原体 : 0、80、320 及び 1,280 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 31 に示されている。

本試験において、320 ppm 以上投与群の雄でカリウム増加、雌で RBC 及び Ht 減少が認められたので、無毒性量は雌雄とも 80 ppm (雄 : 17mg/kg

⁴ 体重比重量を比重量という (以下同じ)。

体重/日、雌：19 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 2、3)

表 31 90 日間亜急性毒性試験 (マウス) ①で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
1,280 ppm	・AST 増加	・ALP 増加
320 ppm 以上	・カリウム増加	・RBC、Ht 減少
80 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

(4) 90 日間亜急性毒性試験 (マウス) ②

NMRI マウス (一群雌雄各 10 匹) を用いた混餌 (原体: 0、1,750、3,500 及び 7,000 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 32 に示されている。

本試験において、1,750 ppm 以上投与群の雌雄で体重及び摂餌量減少等が認められたので、無毒性量は雌雄とも 1,750 ppm 未満 (雄: 274 mg/kg 体重/日未満、雌: 356 mg/kg 体重/日未満) であると考えられた。(参照 2、4)

表 32 90 日間亜急性毒性試験 (マウス) ②で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
7,000 ppm	・全例死亡 ・側臥、衰弱	・全例死亡 ・側臥、衰弱
3,500 ppm 以上	・半数死亡 (3,500 ppm のみ) ・円背位、痙攣、腹臥位、歩行失調、呼吸困難	・半数死亡 (3,500 ppm のみ) ・円背位、痙攣、腹臥位、歩行失調、呼吸困難
1,750 ppm 以上	・粗毛、鎮静、削瘦 ・体重及び摂餌量減少	・1 例死亡 (1,750 ppm のみ) ・粗毛、鎮静、削瘦 ・体重及び摂餌量減少

(5) 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、4、8、16、64 及び 256 ppm) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

本試験において、256 ppm 投与群の雌雄で摂餌量の減少傾向がみられ、雌で体重増加抑制が認められたので、無毒性量は雌雄とも 64 ppm (雄: 2.1 mg/kg 体重/日、雌: 2.0 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 2)

(6) 28 日間亜急性吸入毒性試験 (ラット) ①

Wistar ラット (一群雌雄各 15 匹) を用いた鼻部吸入 (原体: 0、12、25 及び 50 mg/m³、6 時間/日) 暴露による 28 日間亜急性吸入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 33 に示されている。

本試験において、25 mg/m³ 以上暴露群の雄で鎮静状態及び緊張性/間代性痙攣等が認められたので、無毒性量は 12 mg/m³ (雌に関する記載なし) であると考えられた。(参照 17)

表 33 28 日間亜急性吸入毒性試験 (ラット) ①で認められた毒性所見

暴露群	雄	雌
50 mg/m ³	・ 2 例死亡 (肺炎、胸腺・骨髄・脾臓萎縮)	・ 2 例死亡 (肺炎、胸腺・骨髄・脾臓萎縮) ・ 鎮静状態、緊張性/間代性痙攣、振戦、よろめき歩行、興奮、攻撃性、血尿
25 mg/m ³ 以上	・ 鎮静状態、緊張性/間代性痙攣、振戦、よろめき歩行、興奮、攻撃性、血尿	25 mg/m ³ 投与群の雌に関する記載なし
12 mg/m ³	毒性所見なし	毒性所見なし

(7) 28 日間亜急性吸入毒性試験 (ラット) ②

SD ラット (一群雌雄各 5 匹) を用いた鼻部吸入 (原体: 0、50 及び 100 mg/m³、6 時間/日、5 日/週) 暴露による 28 日間亜急性吸入毒性試験が実施された。

本試験において、100 mg/m³ 暴露群の雌雄で易刺激性、不穏及び活動性低下、反復性の頭部の動きが認められ、雌の 1 例は切迫と殺されたので、無毒性量は雌雄とも 50 mg/m³ であると考えられた。(参照 2)

(8) 29 日間亜急性経皮毒性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 12 匹、125 mg/kg 体重/日投与群のみ一群雌雄各 6 匹) を用いた経皮 (原体: 0、125、250、500 及び 1,000 mg/kg 体重/日) 投与による 29 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 34 に示されている。

本試験において、250 mg/kg 体重/日以上投与群の雌雄で APTT 短縮が認められたので、無毒性量は雌雄とも 125 mg/kg 体重/日であると考えられた。(参照 17)

表 34 29 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	・ 鎮静状態、異常呼吸音、不規則呼吸、うずくまり、流涎、緊張性/間代性痙攣、振戦、活動低下、よろめき歩行、鼻及び眼瞼に血様物付着、皮膚へ	・ 鎮静状態、異常呼吸音、不規則呼吸、うずくまり、流涎、緊張性/間代性痙攣、振戦、活動低下、よろめき歩行、鼻及び眼瞼に血様物付着、皮膚へ

	の影響（荒れ、乾燥、硬化、変色）、痂皮形成 ・表皮肥厚、過角化症、潰瘍	の影響（荒れ、乾燥、硬化、変色）、痂皮形成 ・表皮肥厚、過角化症、潰瘍
500 mg/kg 体重/日以上		・心比重量減少
250 mg/kg 体重/日以上	・APTT 短縮	・APTT 短縮
125 mg/kg 体重/日	毒性所見なし	毒性所見なし

(9) 5 週間亜急性神経毒性試験（ラット）（親化合物及び代謝物 Z）

Wistar ラット（神経毒性観察群：一群雌雄各 10 匹、グルタミン合成酵素活性測定群：一群雌雄各 5 匹）を用いた混餌（親化合物又は代謝物 Z：0、20、200 及び 2,000 ppm）投与による 5 週間亜急性神経毒性試験が実施された。

グルタミン合成酵素活性に関して、親化合物では、全投与群で肝臓（雌雄）及び腎臓（雄）で有意な阻害が認められた。また、200 ppm 以上投与群の雄及び 2,000 ppm 投与群の雌では脳で有意な阻害が認められた。代謝物 Z では、阻害の程度は軽く、肝臓（200 ppm 以上投与群の雄及び 2,000 ppm 投与群の雌）及び腎臓（20 及び 2,000 ppm 投与群）で有意差が認められた。

以上の結果から、肝臓におけるグルタミン合成酵素阻害に対する無影響量は、親化合物では 20 ppm 未満、代謝物 Z では 20 ppm と考えられた。しかし、肝臓、腎臓又は脳における相関的な病理組織学的変化が認められないことから、このグルタミン合成酵素活性阻害は毒性所見ではないと考えられた。

本試験において、いずれの投与群でも検体投与に関連した毒性所見は認められなかったため、無毒性量は雌雄とも本試験の最高用量 2,000 ppm（親化合物：雄で 143 mg/kg 体重/日、雌で 162 mg/kg 体重/日；代謝物 Z：雄で 159 mg/kg 体重/日、雌で 179 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）

(10) 14 週間亜急性毒性試験（ラット）（L 体⁵）〈参考データ〉

Wistar ラット（一群雌雄各 10 匹）を用いた混餌（L 体：0、250、1,250 及び 2,500 ppm）投与による 14 週間亜急性毒性試験が実施された。

本試験において、1,250 ppm 以上投与群の雌雄で血漿及び尿中アンモニア濃度増加が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 250 ppm（雄：18.5 mg/kg 体重/日、雌：19.8 mg/kg 体重/日）であると考えられた。（参照 5）

⁵ [10. (10) 及び (11)] の試験は、L-グルホシネートアンモニウム塩を用いて実施された。

(1 1) 90 日間亜急性毒性試験 (イヌ) (L 体⁵) <参考データ>

ビーグル犬 (一群雌雄各 6 匹) を用いた混餌 (L 体: 0、2、5 及び 8.5 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。

本試験において、5 mg/kg 体重/日以上投与群の雌雄で血漿アンモニア濃度増加、同群の雌で腎臓中アンモニア濃度の増加が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 2 mg/kg 体重/日であると考えられた。(参照 5)

(1 2) 28 日間亜急性毒性試験 (ラット) (代謝物 B)

Wistar ラット (一群雌雄各 5 匹) に混餌 (代謝物 B: 0、50、500、2,500 及び 5,000 ppm) 投与して 28 日間亜急性毒性試験が実施された。

本試験において、5,000 ppm 投与群の雄で血中尿酸値増加、雌で血中 TG 増加及び肝比重量増加が認められたので、無毒性量は雌雄とも 2,500 ppm (雄: 286 mg/kg 体重/日、雌: 282 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 17)

(1 3) 90 日間亜急性毒性試験 (ラット) (代謝物 B)

Wistar ラット (一群雌雄各 10~20 匹) を用いた混餌 (代謝物 B: 0、400、1,600 及び 6,400 ppm) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

本試験において、いずれの投与群にも検体投与に関連した毒性所見は認められなかったため、無毒性量は雌雄とも本試験の最高用量 6,400 ppm (雄: 546 mg/kg 体重/日、雌: 570 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 2、17)

(1 4) 90 日間亜急性毒性試験 (マウス) (代謝物 B)

NMRI マウス (一群雌雄各 10 匹) を用いた混餌 (代謝物 B: 0、320、1,600、3,200 及び 8,000 ppm) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

本試験において、いずれの投与群にも検体投与に関連した毒性所見が認められなかったため、無毒性量は雌雄とも本試験の最高用量 8,000 ppm (雄: 1,290 mg/kg 体重/日、雌: 1,540 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 2)

(1 5) 90 日間亜急性毒性試験 (イヌ) (代謝物 B)

ビーグル犬 (一群雌雄各 2~6 匹) を用いた混餌 (代謝物 B: 0、100、400 及び 1,600 ppm) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

本試験において、いずれの投与群にも投与に関連した毒性所見は認められなかったため、無毒性量は雌雄とも本試験の最高用量 1,600 ppm (雄:

115 mg/kg 体重/日、雌：103 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 2、10、17)

(16) 90 日間亜急性毒性試験 (ラット) (代謝物 F)

Wistar ラット (一群雌雄各 10 匹) を用いた混餌 (代謝物 F：0、500、2,000 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。

本試験において、いずれの投与群にも投与に関連した毒性所見は認められなかったため、無毒性量は雌雄とも本試験の最高用量 10,000 ppm (雄：684 mg/kg 体重/日、雌：772 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 2)

(17) 90 日間亜急性毒性試験 (ラット) (代謝物 Z)

Wistar ラット (一群雌雄各 10~20 匹) を用いた混餌 (代謝物 Z：0、400、2,000 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。

本試験において、いずれの投与群にも検体投与に関連した毒性所見は認められなかったため、無毒性量は雌雄とも本試験の最高用量 10,000 ppm (雄：738 mg/kg 体重/日、雌：800 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 2)

(18) 90 日間亜急性毒性試験 (マウス) (代謝物 Z)

NMRI マウス (一群雌雄各 20 匹) を用いた混餌 (代謝物 Z：0、500、2,000 及び 8,000 ppm) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

本試験において、いずれの投与群にも検体投与に関連した毒性所見は認められなかったため、無毒性量は雌雄とも本試験の最高用量 8,000 ppm (雄：1,300 mg/kg 体重/日、雌：1,740 mg/kg 体重/日) であると考えられた。なお、グルタミン合成酵素活性阻害作用は全投与群の雌雄で認められ、無影響量は得られなかった。(参照 2)

(19) 90 日間亜急性毒性試験 (イヌ) (代謝物 Z)

ビーグル犬 (一群雌雄各 4~6 匹) を用いた混餌 (代謝物 Z：0、500、2,000 及び 8,000 ppm) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

本試験において、いずれの投与群にも検体投与に関連した毒性所見は認められなかったため、無毒性量は雌雄とも本試験の最高用量 8,000 ppm (雄：289 mg/kg 体重/日、雌：300 mg/kg 体重/日) であると考えられた。なお、グルタミン合成酵素活性阻害作用は全投与群の雌雄で認められ、無影響量は得られなかった。(参照 2)

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、2、5 及び 8.5 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 35 に示されている。

本試験において、8.5 mg/kg 体重/日投与群の雌雄で一般状態の変化が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 5 mg/kg 体重/日であると考えられた。(参照 2、3、14、17)

(中枢神経系への影響の発現機序については[14: (1)]参照)

表 35 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
8.5 mg/kg 体重/日	<ul style="list-style-type: none"> ・死亡 [1 例] (心筋壊死による心及び循環器系の衰弱) ・咬齧、流涎、運動亢進、嗜眠、自発運動低下、振戦、失調性歩行、頻尿、強直性/間代性痙攣 	<ul style="list-style-type: none"> ・死亡 [1 例] (誤嚥性肺炎、軽度心筋壊死) ・歯軋り、流涎、運動亢進、嗜眠、自発運動低下、振戦、失調性歩行、頻尿、強直性/間代性痙攣
5 mg/kg 体重/日以下	毒性所見なし	毒性所見なし

(2) 2年6カ月間慢性毒性/発がん性併合試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 80 匹) を用いた混餌 (原体:0、40、140 及び 500 ppm) 投与による 2 年 6 カ月間慢性毒性/発がん性併合試験が実施された。

各投与群で認められた毒性所見は表 36 に示されている。

本試験において、140 ppm 以上投与群の雄で腎絶対及び比重量増加が、雌で死亡率増加が認められたので、無毒性量は雌雄とも 40 ppm (雄:2.1 mg/kg 体重/日、雌:2.5 mg/kg 体重/日) であると考えられた。発がん性は認められなかった。(参照 2)

表 36 2 年 6 カ月間慢性毒性/発がん性併合試験 (ラット) で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
500 ppm		・腎絶対及び比重量増加
140 ppm 以上	・腎絶対及び比重量増加	・死亡率増加 (投与 130 週後)
40 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

(3) 2年間発がん性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 60 匹) を用いた混餌 (原体:0、1,000、5,000 及び 10,000 ppm) 投与による 2 年間発がん性試験が実施された。

10,000 ppm 投与群の雄において、稀な腫瘍である皮膚腫瘍 (毛包腫)

の発生頻度増加が認められたが、毛包由来と考えられる腫瘍（毛母腫、毛包上皮腫、毛包腫及び角化棘細胞腫）の発生頻度の合計に統計学的な有意差は認められず、これらの毛包系腫瘍の発現は投与に関連した影響ではないと考えられた。

本試験において、10,000 ppm 投与群の雌で背景データを超える網膜萎縮の発生頻度増加が、全投与群の雌雄で腎絶対及び比重量増加が認められたので、無毒性量は雌雄とも 1,000 ppm 未満（雄：45.4mg/kg 体重/日未満、雌：57.1 mg/kg 体重/日未満）であると考えられた。発がん性は認められなかった。（参照 2）

（4）2 年間発がん性試験（マウス）

NMRI マウス（一群雌雄各 50 匹）を用いた混餌〔原体：0、20、80 及び 160（雄）/320（雌）ppm〕投与による 2 年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は表 37 に示されている。

本試験において、160（雄）/320（雌）ppm 投与群の雌雄で体重増加抑制等が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 80 ppm（雄：10.8 mg/kg 体重/日、雌：16.2 mg/kg 体重/日）であると考えられた。発がん性は認められなかった。（参照 2、3、14、17）

表 37 2 年間発がん性試験（マウス）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
320 ppm		<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・Glu、AST 増加 ・脾絶対及び比重量増加
160 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・死亡率増加 ・体重増加抑制 ・Glu 増加 ・全血中 GSH 減少 	
80 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

（5）1 年間慢性毒性試験（イヌ）（代謝物 Z）

ビーグル犬（一群雌雄各 6 匹）を用いた混餌（代謝物 Z：0、100、1,000 及び 8,000 ppm）投与による 1 年間慢性毒性試験が実施された。

本試験において、いずれの投与群にも検体投与による悪影響は認められなかったので、無毒性量は雌雄とも本試験の最高用量 8,000 ppm（雄：325 mg/kg 体重/日、雌：346 mg/kg 体重/日）であると考えられた。（参照 2）

(6) 2年間慢性毒性/発がん性併合試験 (ラット) (代謝物 Z)

SD ラット (一群雌雄各 100 匹) を用いた混餌 (代謝物 Z: 0、200、2,000 及び 20,000 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。

各投与群で認められた毒性所見は表 38 に示されている。

本試験において、20,000 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 2,000 ppm (雄: 91 mg/kg 体重/日、雌: 108 mg/kg 体重/日) であると考えられた。発がん性は認められなかった。

(参照 2)

表 38 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験 (ラット) (代謝物 Z) で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
20,000 ppm	<ul style="list-style-type: none">軟便、摂餌量増加、体重増加抑制腎絶対及び比重量増加腎盂結石脾臓髓外造血亢進	<ul style="list-style-type: none">軟便、摂餌量増加、体重増加抑制腎絶対及び比重量増加腎盂結石脾臓髓外造血亢進
2,000 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

(7) 2 年間発がん性試験 (マウス) (代謝物 Z)

ICR マウス (一群雌雄各 90 匹) を用いた混餌 (代謝物 Z: 0、100、1,000 及び 8,000 ppm) 投与による 2 年間発がん性試験が実施された。

本試験において、いずれの投与群にも検体投与に関連した毒性所見は認められなかったので、無毒性量は雌雄とも本試験の最高用量 8,000 ppm (雄: 1,190 mg/kg 体重/日、雌: 1,460 mg/kg 体重/日) と考えられた。発がん性は認められなかった。(参照 2)

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 30 匹) を用いた混餌 (原体: 0、40、120 及び 360 ppm) 投与による 2 世代繁殖試験が実施された。

本試験において、親動物では雄で毒性所見が認められず、360 ppm 投与群の雌 (P 及び F₁) で哺育期間中の摂餌量の減少、児動物では 360 ppm 投与群の全世代で生産児数の減少が認められたので、無毒性量は親動物の雄で本試験の最高用量 360 ppm (P 雄: 24 mg/kg 体重/日、F₁ 雄: 24 mg/kg 体重/日)、雌で 120 ppm (P 雌: 12 mg/kg 体重/日、F₁ 雌: 12 mg/kg 体重/日)、児動物で 120 ppm (P 雄: 8.1 mg/kg 体重/日、P 雌: 12 mg/kg 体重/日、F₁ 雄: 8.1 mg/kg 体重/日、F₁ 雌: 12 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)

(2) 発生毒性試験 (ラット) ①

Wistar ラット (一群雌 20 匹) の妊娠 6~15 日に強制経口 (原体 : 0、10、50 及び 250 mg/kg 体重/日、溶媒 : 蒸留水) 投与して、発生毒性試験が実施された。

全投与群の母動物で活動性の亢進が認められ、50 mg/kg 体重/日以上投与群では膣出血、粗毛等が、250 mg/kg 体重/日投与群では 1 例の死亡が認められた。

胎児では、全投与群で腎盂又は尿管拡張の発生頻度増加がみられ、250 mg/kg 体重/日投与群では、腎盂及び尿管の両部位の拡張がみられた胎児数が統計学的に有意に増加した。

本試験において、10 mg/kg 体重/日以上投与群の母動物で活動性の亢進等が、胎児で腎盂又は尿管拡張の発生頻度増加が認められたので、無毒性量は母動物及び胎児で 10 mg/kg 体重/日未満であると考えられた。(参照 2、17)

(3) 発生毒性試験 (ラット) ②

前述のラットを用いた発生毒性試験① [12. (2)] において、最低用量で母動物及び胎児に影響がみられ、無毒性量が得られなかったため、本試験は無毒性量を求める目的で追加試験として実施された。

Wistar ラット (一群雌 21~24 匹) の妊娠 6~15 日に強制経口 (原体 : 0、0.5、2.2 及び 10 mg/kg 体重/日、溶媒 : 蒸留水) 投与して、発生毒性試験が実施された。

10 mg/kg 体重/日投与群において、母動物には試験① [12. (2)] で観察されたような臨床症状はみられず、胎児に腎盂及び尿管拡張は認められなかった。

いずれの投与群の母動物及び胎児にも検体投与に関連した毒性所見は認められなかったため、無毒性量は母動物及び胎児で本試験の最高用量 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)

(4) 発生毒性試験 (ラット) ③

Wistar ラット (一群雌 20~25 匹) の妊娠 6~15 日に強制経口 (原体 : 0、0.5、2.2 及び 10 mg/kg 体重/日、溶媒 : 蒸留水) 投与して、発生毒性試験が実施された。母動物には自然分娩させ、その後 21 日間児動物を哺育させた。

本試験において、いずれの投与群の母動物及び児動物においても検体

投与に関連した毒性所見は認められなかったため、無毒性量は母動物及び児動物で本試験の最高用量 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、3)

以上、試験①[12. (2)]の 10 及び 50 mg/kg 体重/日投与群でみられた腎盂又は尿管拡張の発生頻度増加(統計学的有意差なし)は、試験②[12. (3)]において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。よって、ラットを用いた発生毒性試験①～③[12. (2)～(4)]の総合評価として、母動物では 50 mg/kg 体重/日以上投与群で膈出血、粗毛等が、胎児では 250 mg/kg 体重/日投与群で腎盂及び尿管拡張の発生頻度増加が認められたため、無毒性量は母動物で 10 mg/kg 体重/日、胎児で 50 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。

(5) 発生毒性試験(ウサギ)

ヒマラヤウサギ(一群雌 15 匹)の妊娠 7～19 日に強制経口(原体: 0、2、6.3 及び 20 mg/kg 体重/日、溶媒: 蒸留水)投与して、発生毒性試験が実施された。

本試験において、20 mg/kg 体重/日投与群の母動物で体重増加抑制、胎児で死亡率増加が認められたため、無毒性量は母動物及び胎児で 6.3 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、14、17)

(6) 発達神経毒性試験(ラット)

SD ラット(一群雌 25 匹)の妊娠 6 日から分娩 21 日後まで混餌(原体: 0、200、1,000 及び 4,500 ppm)投与して、発達神経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 39 に示されている。

本試験において、1,000 ppm 以上投与群の母動物で体重増加抑制等が、児動物で自発運動量増加等が認められたため、無毒性量は母動物及び児動物で 200 ppm (14 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 2)

表 39. 発達神経毒性試験(ラット)で認められた毒性所見

投与群	母動物	児動物
4,500 ppm	・ 淡色便	・ 出生後死亡数増加
1,000 ppm 以上	・ 体重増加抑制 ・ 摂餌量減少	・ 体重増加抑制 ・ 自発運動量、移動運動量増加
200 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

(7) 発生毒性試験 (ラット) (代謝物 B)

Wistar ラット (一群雌 20 匹) の妊娠 6~15 日に強制経口 (代謝物 B : 0、100、300 及び 900 mg/kg 体重/日、溶媒 : 蒸留水) 投与して、発生毒性試験が実施された。

900 mg/kg 体重/日投与群の母動物で、死亡が 1 例、排尿行動増加、立毛、体重増加抑制、腎絶対重量増加、全同腹児死亡 (3 腹) が認められた。同群の胎児では、波状肋骨及び肋骨肥厚の発生頻度が有意に増加 (14.6%) したが、この発生頻度は背景データ (0~18.6%) の範囲内であり、また、この変異を持つ胎児を有する母動物数 (各群 4~6 例) には有意な増加はみられなかったことから、これは検体投与によるものとは考えられなかった。

本試験において、900 mg/kg 体重/日投与群の母動物で体重増加抑制等が認められ、胎児には悪影響は認められなかったので、無毒性量は母動物で 300 mg/kg 体重/日、胎児で本試験の最高用量 900 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)

(8) 発生毒性試験 (ウサギ) (代謝物 B)

ヒマラヤウサギ (一群雌 15 匹) の妊娠 6~18 日に強制経口 (代謝物 B : 0、50、100 及び 200 mg/kg 体重/日、溶媒 : 蒸留水) 投与して、発生毒性試験が実施された。

100 mg/kg 体重/日以上投与群の母動物で、糞排泄減少、うずくまり、赤色尿排泄、摂餌及び飲水行動減少が認められ、100 mg/kg 体重/日投与群では流産が 1 例、死亡が 1 例、200 mg/kg 体重/日投与群では流産が 4 例、死亡が 5 例認められた。胎児ではいずれの投与群でも毒性影響は観察されなかった。

本試験において、100 mg/kg 体重/日以上投与群の母動物で流産、死亡等が認められ、胎児では投与に関連した毒性所見が認められなかったので、無毒性量は母動物で 50 mg/kg 体重/日、胎児で 200 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)

(9) 2 世代繁殖試験 (ラット) (代謝物 Z)

SD ラット (一群雌雄各 30 匹) に混餌 (代謝物 Z : 0、200、2,000 及び 10,000 ppm) 投与による 2 世代繁殖試験が実施された。

本試験において、いずれの投与群の親動物及び児動物においても投与に関連した毒性所見が認められなかったので、無毒性量は親動物及び児動物で本試験の最高用量 10,000 ppm (P 雄 : 702 mg/kg 体重/日、P 雌 : 890 mg/kg 体重/日、F₁ 雄 : 821 mg/kg 体重/日、F₁ 雌 : 1,010 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)

(10) 発生毒性試験 (ラット) (代謝物 Z)

Wistar ラット (一群雌 20~21 匹) の妊娠 6~15 日に強制経口 (代謝物 Z: 0 及び 1,000 mg/kg 体重/日、溶媒: 脱イオン水) 投与し、発生毒性試験が実施された。

本試験において、母動物及び胎児に投与に関連した毒性所見が認められなかったため、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、17)

(11) 発生毒性試験 (ウサギ) (代謝物 Z)

ヒマラヤウサギ (一群雌 15 匹) の妊娠 6~18 日に強制経口 (代謝物 Z: 0、64、160 及び 400 mg/kg 体重/日、溶媒: 蒸留水) 投与して、発生毒性試験が実施された。

本試験において、160 mg/kg 体重/日以上投与群の母動物で摂餌量減少が、胎児で片側性または両側性の腰肋の発生頻度増加が認められたため、無毒性量は母動物及び胎児で 64 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、17)

1.3. 遺伝毒性試験

グルホシネートアンモニウム塩 (原体) の細菌を用いた DNA 修復試験及び復帰突然変異試験、出芽酵母を用いた遺伝子変換/DNA 修復試験、分裂酵母及びマウスリンパ球細胞を用いた前進突然変異試験、ヒトリンパ球細胞及びヒト末梢血培養細胞を用いた染色体異常試験、ラット初代培養肝細胞を用いた UDS 試験及びマウスを用いた小核試験が実施された。

表 40 に示されているとおり、いずれの試験においても結果はすべて陰性であったことから、グルホシネートアンモニウム塩 (原体) に遺伝毒性はないものと考えられた。(参照 2、3)

表 40 遺伝毒性試験概要 (原体)

試験	対象	処理濃度・投与量	結果	
in vitro	DNA 修復試験	<i>Bacillus subtilis</i> (H-17、M-45 株)	50~10,000 µg/7 [*] イヌ	陰性
	遺伝子変換/DNA 修復試験	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (D4)	1,000~10,000 µg/7 [*] ヴ-ト (+/-S9)	陰性
	復帰突然変異試験	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538 株) <i>Escherichia coli</i> (WP2hcr 株)	5~1,000 µg/7 [*] ヴ-ト (+/-S9)	陰性 ¹⁾
	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2uvrA 株)	0.08~250 µg/7 [*] ヴ-ト (+/-S9)	陰性
	遺伝子突然変異試験	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	125~1,000 µg/mL (+/-S9)	陰性
	前進突然変異試験	マウスリンパ球細胞 (L51784Y.TK+/-)	50~5,000 µg/mL (+/-S9)	陰性
	染色体異常試験	ヒトリンパ球細胞	1~1,000 µg/mL (+/-S9)	陰性
	染色体異常試験	ヒト末梢血培養細胞	46.4~10,000 µg/mL (+/-S9)	陰性
	UDS 試験	ラット初代培養肝細胞	26.2~5,240 µg/mL	陰性
in vivo	小核試験	NMRI マウス (骨髓細胞) (一群雌雄各 5 匹)	0、100、200、350 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

1) 500µg/7^{*} ヴ-ト以上で致死作用

代謝物 B、F 及び Z について、細菌を用いた復帰突然変異試験、分裂酵母を用いた前進突然変異試験、チャイニーズハムスター V79 細胞を用いた遺伝子突然変異試験、ヒト A549 細胞を用いた UDS 試験、ヒトリンパ球細胞、チャイニーズハムスター V79 細胞及び骨髓細胞を用いた染色体異常試験、NMRI マウス骨髓細胞を用いた小核試験が実施された。

表 41 に示されているとおり、いずれの試験においても結果はすべて陰性であったことから、代謝物 B、F 及び Z に遺伝毒性はないものと考えられた。(参照 2、17)

表 41 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	
B	<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538 株) <i>E. coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> 株)	4~5,000 µg/7 ^レ ト (+/-S9)	陰性 ¹⁾
		前進突然変異試験	<i>S. pombe</i> (P1 株)	313~10,000 mg/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	100~1,000 µg/mL (+/-S9)	陰性
		UDS 試験	ヒト A549 細胞	1~2,000 µg/mL (+/-S9)	陰性
		染色体異常試験	ヒトリンパ球細胞	0.1~1.52 mg/mL : 24 時間 (+/-S9) 1.52 mg/mL : 48 時間 (+/-S9)	陰性
	<i>in vivo</i>	染色体異常試験	チャイニーズハムスター (骨髓細胞) (一群雌雄各 6 匹)	0, 100, 333, 1,000 mg/kg 体重 (単回経口投与)	陰性
		小核試験	NMRI マウス (骨髓細胞) (一群雌雄各 5 匹)	0, 200, 600, 2,000 mg/kg 体重 (単回経口投与)	陰性
F	<i>in vitro</i>	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)	1.6~5,000 µg/7 ^レ ト (+/-S9)	陰性
		染色体異常試験	ヒトリンパ球細胞	24.3~1,820 µg/mL (+/-S9)	陰性
Z	<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538 株) <i>E. coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> 株)	2.3~5,820 µg/7 ^レ ト (+/-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	582~1,550 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	444~1,190 µg/mL (+/-S9)	陰性
		UDS 試験	ヒト A549 細胞	1.3~1,330 µg/mL (+/-S9)	陰性
		UDS 試験	ヒト A549 細胞	0.6~582 µg/mL (+/-S9)	陰性
		染色体異常試験	ヒトリンパ球細胞	0.6~5.0 mg/mL : 24 時間 (+/-S9) 5.0 mg/mL : 48 時間 (+/-S9)	陰性
		染色体異常試験	ヒトリンパ球細胞	3~5,000 mg/mL (-S9) 3~4,750 mg/mL (+S9)	陰性
	<i>in vivo</i>	染色体異常試験	チャイニーズハムスター-V79 細胞	154~1,550 µg/mL (+/-S9)	陰性
		小核試験	NMRI マウス (骨髓細胞) (一群雌雄各 5 匹)	222~2,220 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

1) 500µg/7^レト以上で弱い抗菌性あり

1.4. その他の試験

(1) 28日間強制経口投与毒性及びメカニズム試験 (イヌ)

イヌを用いた1年間慢性毒性試験[11. (1)]において、8.5 mg/kg 体重/日以上投与群で間代性・強直性痙攣などの症状がみられ死亡例もみられたことから、本試験は検体の中樞神経系への作用を含めた毒性発現機序を解明する目的で実施された。

ビーグル犬(一群雌雄各6匹)にグルホシネートを0、1及び8 mg/kg 体重/日の用量で、最初の1~18日間は非標識体を、19~28日までは¹⁴C-グルホシネートを反復経口投与して、一般毒性の他に神経毒性検査、脳内伝達物質を含む各種物質の動態の測定、グルタミン合成酵素活性の測定が実施された。また、検体の組織中レベルの変化と生体恒常性の生理的変動との関連性をみるために、検体の体内分布及び代謝についても観察された。

その結果、8 mg/kg 体重/日投与群の雌雄の中脳及び小脳並びに同群雌の脊髄におけるグルタミン合成酵素活性の低下がみられた。8 mg/kg 体重/日投与群の雌では、毒性作用として摂餌量低下及び体重増加抑制が認められた。1 mg/kg 体重/日投与群では毒性学的に意義のある変化は認められず、無毒性量は1 mg/kg 体重/日と考えられた。また、本試験の結果から神経伝達物質を含めた物質の動態又は検体の代謝分布に毒性発現を示唆する変化は得られず、本検体の毒性発現の作用機序の解明には至らなかった。(参照2)

(2) ラットにおける単回脳室内/静脈内投与後の脳内カテコールアミン及びグルタミン合成酵素測定(親化合物及び代謝物B)

高用量のグルホシネートを暴露したラット及びマウスに観察された1~4時間の潜伏期の後の痙攣に関連し、これらの潜伏期間中に脳の各部位におけるカテコールアミン濃度又はグルタミン合成酵素活性が静脈内投与又は脳室内投与により変化がみられるか否かについて検討された。また、主要代謝物であるBについても同様の検討試験が実施された。

Wistar ラット(一群雄2匹)に、グルホシネート又は代謝物Bを10及び20 µgの用量で脳室内投与し、投与24時間後まで症状観察が行われた。また、Wistar ラット(一群雄5~6匹)に、グルホシネートを10及び20 µg若しくは代謝物Bを20 µgの用量で脳室内投与し、又はグルホシネートを0、10及び100 mg/kg 体重の用量で静脈内投与して、脳内カテコールアミン濃度及びグルタミン合成酵素活性が測定された。

その結果、グルホシネートの投与により、投与経路にかかわらず痙攣がみられた。しかし、グルホシネートの20 µgの脳室内投与の場合のみ、痙攣発現に至るまでの潜伏期間に線条体のジヒドロキシフェニル酢酸の上昇、前頭葉のノルアドレナリンの低下がみられた。グルホシネートの10

µg 以上の脳室内投与群でグルタミン合成酵素活性の低下がみられた。代謝物 B の投与では脳室内投与、静脈内投与ともに変化がみられなかった。

(参照 2)

(3) ラットにおける単回経口投与後の各臓器におけるグルタミン合成酵素活性、グルタミン酸及びアンモニア濃度測定

Wistar ラット (一群雌 15~30 匹) に、グルホシネートを 0、200、800 及び 1,600 mg/kg 体重の用量で単回経口投与し、脳、肝臓及び腎臓におけるグルタミン合成酵素活性、アンモニア濃度及びグルタミン酸濃度並びに脳における AChE 活性が測定された。

その結果、肝臓及び腎臓由来グルタミン合成酵素阻害活性は、全投与群で有意な阻害が認められ、脳由来グルタミン合成酵素は、1,600 mg/kg 体重投与群で有意な阻害が認められた。アンモニア量に変化はなかったが、脳内グルタミン酸量の減少が 800 mg/kg 体重以上投与群で認められた。1,600 mg/kg 体重投与群で、肝臓中グルタミン酸量の増加が認められた。また、グルタミン合成酵素の変化は脳、肝臓及び腎臓のいずれの臓器においても回復性を有することが示された。(参照 2、17)

(4) ラット及びマウスにおける単回経口投与後の各臓器におけるグルタミン合成酵素活性、アンモニア濃度、グルタミン酸及びグルタミン濃度測定

グルホシネートを、Wistar ラット (一群雌 5 匹) に 0、200 及び 800 mg/kg 体重、NMRI マウス (一群雌 5 匹) に 0、50 及び 200 mg/kg 体重の用量で単回経口投与し、心臓、脳、肝臓及び腎臓におけるグルタミン合成酵素活性、アンモニア濃度並びにラットにおけるこれら臓器中のグルタミン及びグルタミン酸濃度が測定された。

その結果、グルタミン合成酵素阻害はマウス及びラットの腎臓並びにラットの肝臓で顕著にみられたが、脳では変化は認められなかった。アンモニア濃度はマウスの 200 mg/kg 体重投与群の肝臓のみで有意に上昇した。ラットにおけるグルタミン及びグルタミン酸濃度は、いずれの臓器でも変化はみられなかった。

グルホシネートの高用量を投与した場合にみられる中枢神経に関連した毒性作用は、脳におけるグルタミン合成酵素阻害、アンモニア濃度及びグルタミン又はグルタミン酸濃度の変化によるものではないと考えられた。(参照 2)

(5) ラットにおける 4 週間混餌投与メカニズム試験

グルホシネートはグルタミン酸と構造が類似しており、グルタミン合成