

表6 Cohen ら (1991) のラット二段階膀胱発がん試験における群設定

群	飼料	イニシエーション 段階 (6 週間)	プロモーション段階 (72 週間)
①	Prolab 3200	FANFT0.2%	サッカリンナトリウム 5.00%
②	Prolab 3200	FANFT0.2%	サッカリンナトリウム 3.00%
③	Prolab 3200	FANFT0.2%	サッカリンカルシウム 5.20%
④	Prolab 3200	FANFT0.2%	サッカリンカルシウム 3.12%
⑤	Prolab 3200	FANFT0.2%	サッカリン 4.21%
⑥	Prolab 3200	FANFT0.2%	サッカリン 2.53%
⑦	Prolab 3200	FANFT0.2%	サッカリンナトリウム 5.00% +炭酸カルシウム 1.15%
⑧	Prolab 3200	FANFT0.2%	サッカリンカルシウム 5.20% +塩化ナトリウム 1.34%
⑨	Prolab 3200	FANFT0.2%	サッカリンナトリウム 5.00% +塩化アンモニウム 1.23%
⑩	Prolab 3200	FANFT0.2%	炭酸カルシウム 1.15%
⑪	Prolab 3200	FANFT0.2%	塩化ナトリウム 1.34%
⑫	Prolab 3200	FANFT0.2%	対照
⑬	Prolab 3200	無処置	サッカリンナトリウム 5.00%
⑭	Prolab 3200	無処置	サッカリンカルシウム 5.20%
⑮	Prolab 3200	無処置	サッカリン 4.21%
⑯	Prolab 3200	無処置	対照
⑰	NIH-07	FANFT0.2%	サッカリンナトリウム 5.00%
⑱	NIH-07	FANFT0.2%	対照

(p) Garland ら (1994) のラット 10 週間試験

IARC73 においても引用されている Garland ら (1994) の報告によれば、5~6 週齢の F344 ラット、去勢 F344 ラット又は  $\alpha_{2\mu}$ -グロブリンを生合成しない系統である NBR ラット (各群雄 10 匹) にサッカリンナトリウム (0, 7.5%; 0, 3,750 mg/kg 体重/日相当) を 10 週間混餌投与 (飼料: Prolab3200) する試験が実施されている。その結果、光学顕微鏡を用いた病理組織学的検査では、F344 ラットの投与群の 7/10 匹 (うち 1 匹には乳頭状/結節状過形成も認められた。)、去勢 F344 ラットの投与群の 4/10 匹、NBR ラットの投与群の 1/10 匹に膀胱移行上皮の単純過形成が認められたが、F344 ラットの対照群及び NBR ラットの対照群には過形成病変は認められず、去勢 F344 ラットの対照群の 1/10 匹に単純過形成が認められたとされている。走査型電子顕微鏡を用いた超微形態学的検査で、F344 ラットの投与群の 7/10 匹及び去勢 F344 ラットの投与群の 5/10 匹に膀胱移行上皮の高度の増殖性変化が認められたのに対し、NBR ラットの投与群において高度の増殖性変化が見られたのは 2/10 匹にとどまったとされている。一方、いずれの系統の対照群においても膀胱移行上皮の高度の増殖性変化は認められなかったとされている。いずれの投与群においてもそれぞれの対照群と比較して盲腸重量の増加が認められたが、この変化の程度は、F344 ラット及び去勢 F344 ラットに比べて NBR ラットで軽度であったとされている。いずれの投与群においてもそれぞれの対照群と比較して尿 pH の低下傾向が見られたが、この変化の統計学的有意性は F344 ラット及び去勢 F344 ラットで認められ、NBR ラットでは認められなかったとされている。ただし、NBR ラットについては半数を超える動物で採尿が困難であったため尿試料が得られず、そのことが上記に影響した可能性があるとき

れている。F344 ラット及び去勢 F344 ラットの投与群ではほとんどの動物に尿沈渣が認められたが、それぞれの対照群ではまれに不明瞭な沈渣を認めるのみであったとされている。NBR ラットの投与群では、採尿困難による尿試料の少なさのために明確な評価が困難であったが、得られた尿試料のほぼ半数に沈渣を認めたとされている。NBR ラットの対照群の尿量は F344 ラット及び去勢 F344 ラットの対照群より多く、F344 ラット、去勢 F344 ラット及び NBR ラットの投与群の尿量はいずれもそれぞれの対照群の尿量と比較すると同程度の増加を示したとされている。NBR ラットの対照群の尿中ナトリウムイオン濃度は F344 ラット及び去勢 F344 ラットの対照群よりも多く、F344 ラット、去勢 F344 ラット及び NBR ラットの投与群の尿中ナトリウム濃度はそれぞれの対照群に比べて増加したが、この変化の統計学的有意性は F344 ラットでのみ得られたとされている。F344 ラット及び NBR ラットの尿中では、たん白とサッカリンナトリウムとの結合が認められたが、F344 ラットでは主として  $\alpha_{2\mu}$ -グロブリンが含まれる 19~20 kDa 画分のたん白との結合が認められたのに対し、NBR ラットでは F344 ラットに比べてたん白との結合量が極めて少なく、しかも特段の標的たん白が存在しなかったとされている。Garland らは、サッカリンナトリウムによる雄ラットの膀胱発がんについて、 $\alpha_{2\mu}$ -グロブリンとサッカリンナトリウムとの結合が関与していると考えしている。一方で Garland らは、サッカリンナトリウムがアルブミン等他のたん白と結合した場合においても膀胱に対して類似の反応を起こす可能性についても言及し、 $\alpha_{2\mu}$ -グロブリンを生合成しない NBR ラットにおいてわずかながら膀胱移行上皮の単純過形成が発生したり、尿中に  $\alpha_{2\mu}$ -グロブリンがほとんど含まれない雌 F344 ラットにおいて同様の変化が報告されているのは、サッカリンナトリウムの  $\alpha_{2\mu}$ -グロブリン以外のたん白との結合に基づいている可能性があるとしている。他方、Garland らは、NBR ラットや雌 F344 ラットのサッカリンナトリウムによる膀胱発がんに対する抵抗性は、 $\alpha_{2\mu}$ -グロブリンの低値に基づくものであるとしている。Garland らは、本試験における F344 ラットに対するサッカリンナトリウムの作用に及ぼす去勢の影響について、 $\alpha_{2\mu}$ -グロブリンの不完全な排除を反映したものであると考察している。以上より Garland らは、サッカリンナトリウムによる雄ラットの膀胱発がん機序において、 $\alpha_{2\mu}$ -グロブリンは唯一の要因ではないが、その果たす役割は大きいと結論している（参照 5、109）。IARC ワーキンググループは、以上の結果について、サッカリン類による膀胱過形成の誘発に  $\alpha_{2\mu}$ -グロブリンが関与することを支持する知見であると判断している（参照 5）。本委員会としては、IARC ワーキンググループの判断を妥当と考えるが、本試験は 1 用量のみの試験であることから、本試験における NOAEL の評価を行わなかった。

#### (q) Uwagawa ら (1994) のラット 8 週間試験

IARC73 においても引用されている Uwagawa ら (1994) の報告によれば、6 週齢の F344 ラット又は NBR ラット (各群雄 5~10 匹) にサッカリンナトリウム (5%; 2,500 mg/kg 体重/日相当)、アスコルビン酸ナトリウム (5%; 2,485 mg/kg 体重/日相当) 又はウラシル (3%; 1,500

mg/kg 体重/日<sup>(2)</sup>) を 8 週間混餌投与 (飼料: CRF-1) する試験が実施されている。その結果、光学顕微鏡を用いた病理組織学的検査において、アスコルビン酸ナトリウムの投与によってすべての F344 ラット (6/6 匹) には膀胱移行上皮に単純過形成の発生が認められ、NBR ラットにはそれが認められなかったとされている。一方、ウラシルの投与では両系統のすべてのラット (F344 ラット 6/6 匹、NBR ラット 5/5 匹) の膀胱に乳頭腫と移行上皮のびまん性過形成が認められたとされている。走査型電子顕微鏡を用いた超微形態学的検査において、ウラシルの投与では両系統のほぼすべてのラット (F344 ラット 5~6/6 匹、NBR ラット 4~5/5 匹) の膀胱に移行上皮過形成の特徴とされる多形性微絨毛、均一性短小微絨毛又は縄状若しくは葉状の microridge のすべての発生が認められたが、サッカリンナトリウムの投与では F344 ラットの 4/6 匹に縄状又は葉状の microridge が、アスコルビン酸ナトリウムの投与では F344 ラットの 2/6 匹に多形性微絨毛、6/6 匹に縄状又は葉状の microridge が、それぞれ認められたにとどまったとされている。BrdU 標識率は、サッカリンナトリウム投与群及びアスコルビン酸ナトリウム投与群の F344 ラットでそれぞれ対照群の 20 倍及び 36 倍であったのに対し、両投与群の NBR ラットでは変化がなく、ウラシル投与群の両系統ラットでも対照群の 50 倍超と大きな差が見られたとされている。F344 ラットでは、サッカリンナトリウム投与群及びアスコルビン酸ナトリウム投与群のいずれにおいても尿 pH 及び尿中ナトリウム濃度が上昇し、アスコルビン酸ナトリウム投与群においては尿浸透圧の増加及び尿量の減少が認められたとされている。NBR ラットでは、サッカリンナトリウム投与群及びアスコルビン酸ナトリウム投与群のいずれにおいても尿 pH 及び尿中ナトリウム濃度が上昇し、アスコルビン酸ナトリウム投与群においては尿量の有意な増加が認められたとされている。Uwagawa らは、サッカリンナトリウム及びアスコルビン酸ナトリウムによる膀胱移行上皮の細胞増殖活性上昇と発がんプロモーター活性の発現には  $\alpha_{2u}$ -グロブリンが関与しており、尿の pH 及びナトリウムイオン濃度の増加は必須でないが増強因子として働くと考えられている (参照 5、110)。IARC ワーキンググループは、以上の結果について、サッカリン類による膀胱過形成の誘発に  $\alpha_{2u}$ -グロブリンと細胞増殖活性の増強が関与することを支持する知見であると判断している (参照 5)。本委員会としては、IARC ワーキンググループの判断を妥当と考えるが、本試験は 1 用量のみの試験であることから、本試験における NOAEL の評価を行わなかった。

(r') Cohen ら (1995a) のラットを用いた二世世代にわたる試験 I

IARC73 においても引用されている Cohen ら (1995a) の報告によれば、F344 ラット又は SD ラットの雌雄 ( $F_0$ ) にサッカリンナトリウム又はサッカリン (0、5% ; 0、2,500 mg/kg 体重/日相当) を 2 週間混餌投与 (飼料: Prolab3200) した後、交配し、雌雄胎児及び雄児動物 ( $F_1$ ) を得る試験が実施されている。本試験においては、F344 ラットにはサッカリンナトリウム又はサッカリンを、SD ラットにはサッカリンを  $F_1$  の最終と殺時まで投与しているが、SD ラットへのサッカリンナトリウ

ムの投与においては、最終と殺時までのほか、妊娠・授乳時のみ、授乳時のみ及び離乳後のみ投与する群を設定している。その結果、F344 ラットについて、サッカリンナトリウム投与群では、28日齢及び91日齢のF<sub>1</sub>雄児動物に膀胱移行上皮の<sup>3</sup>Hチミジン標識率が増加する傾向が認められたが統計学的に有意でなく、7日齢のF<sub>1</sub>雄児動物にそのような変化は見られず、サッカリン投与群では、F<sub>1</sub>胎児並びに7日齢及び28日齢のF<sub>1</sub>雄児動物にも細胞増殖活性の増強がなかったとされている。組織学的には、サッカリンナトリウム投与群の91日齢のF<sub>1</sub>雄児動物の膀胱に軽度の単純過形成を認めたが、それを除くサッカリンナトリウム投与群並びにサッカリン投与群のF<sub>1</sub>胎児及びF<sub>1</sub>雄児動物の膀胱移行上皮の細胞増殖に変化が認められなかったとされている。一方、SDラットについて、膀胱移行上皮の細胞増殖活性が被験物質の投与に依存して有意に増強したのは、サッカリンナトリウムを離乳後のみ投与した群の91日齢のF<sub>1</sub>雄児動物と、サッカリン投与群の14日齢F<sub>1</sub>雄児動物のみであったとされている。組織学的には、サッカリンナトリウムを全期間又は離乳後のみ投与した群の91日齢のF<sub>1</sub>雄児動物の膀胱に軽度の単純過形成が認められたが、それらを除くサッカリンナトリウム及びサッカリン投与群のF<sub>1</sub>胎児及びF<sub>1</sub>雄児動物には、膀胱移行上皮の細胞増殖に変化が認められなかったとされている。また、別途SDラットにサッカリンナトリウム(0、5%；0、2,500 mg/kg 体重/日相当)を2週間混餌投与(飼料：Prolab3200)した後に交配し、雌雄の胎児(F<sub>1</sub>)及び授乳中児動物(F<sub>1</sub>)を得る別の試験が実施されている。この試験では、投与群の雌雄の21日齢F<sub>1</sub>児動物の膀胱に、移行上皮細胞増殖活性の増強、表層性壊死及び軽度の上皮過形成の小病巣が認められたが、7日齢F<sub>1</sub>児動物並びに妊娠17日齢及び21日齢のF<sub>1</sub>胎児の膀胱に組織学的変化は認められなかったとされている(参照5、111)。本委員会としては、本試験は1用量のみの試験であることから、本試験におけるNOAELの評価を行わなかった。

(s') Cohenら(1995b)のラットを用いた二世世代にわたる試験II

IARC73においても引用されているCohenら(1995b)の報告によれば、雄F344ラット(F<sub>0</sub>)にアスコルビン酸ナトリウム(0.91、2.73、4.56、6.84%；452、1,357、2,267、3,400 mg/kg 体重/日相当)、サッカリンナトリウム(5、7.5%；2,500、3,750 mg/kg 体重/日相当)、サッカリンナトリウム(5%；2,500 mg/kg 体重/日相当)＋塩化アンモニウム(1.23%；620 mg/kg 体重/日相当)又はサッカリンナトリウム(7.5%；3,750 mg/kg 体重/日相当)＋塩化アンモニウム(1.85%；920 mg/kg 体重/日相当)を4又は5週間混餌投与(飼料：Prolab3200)し、交配して得られた雄の児動物(F<sub>1</sub>)にF<sub>0</sub>と同様の投与を離乳後より行う試験が実施されている。その結果、F<sub>1</sub>雄児動物のサッカリンナトリウム7.5%投与群については、塩化アンモニウムの併用の有無にかかわらず、出生直後から体重増加抑制が認められ、死亡又は瀕死となったため、30日齢までにと殺されている。アスコルビン酸ナトリウム2.73%投与群を除く他の投与群についても体重増加抑制が認められたとされている。F<sub>1</sub>雄児動物の尿pHは、サッカリンナトリウム5%投与群で37日齢時に対

照群より低下したが、一貫して6.5を上回り、100日齢までに対照群とほぼ同様の値になったとされている。これに対して、サッカリンナトリウム5%+塩化アンモニウム1.23%投与群では、全期間を通じて、対照群又はサッカリンナトリウム5%投与群に比べて低値を保っていたとされている。アスコルビン酸ナトリウム投与群の尿pHは、37日齢及び100日齢時で変わらず対照群のそれを有意に上回り、用量相関性に増加したとされている。F<sub>1</sub>雄児動物のサッカリンナトリウム5%投与群及びアスコルビン酸ナトリウム6.84%投与群の膀胱では光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡を用いた検査において移行上皮の過形成の発生が認められ、BrdU標識率が増加していたが、サッカリンナトリウム+塩化アンモニウム投与群の膀胱ではそれらの変化が認められなかったとされている。なお、膀胱移行上皮の過形成の発生は、走査型電子顕微鏡においてのみアスコルビン酸ナトリウム2.73%及び4.56%投与群でも認められたとされている。一方、F<sub>1</sub>雄児動物のサッカリンナトリウム5%投与群では塩化アンモニウム併用の有無にかかわらず盲腸の拡張が認められたが、アスコルビン酸ナトリウム投与群では盲腸の拡張は認められなかったとしている(参照5、112)。本委員会としては、本試験は実質1用量のみの試験であることから、本試験におけるNOAELの評価を行わなかった。

(t') Cohenら(1995c)のラット10週間試験

IARC73においても引用されているCohenら(1995c)の報告によれば、5週齢のF344ラット(各群雄10匹)にサッカリンナトリウム(7.5%; 3,750 mg/kg 体重/日相当)、それと等モルの各種ナトリウム塩(アスコルビン酸ナトリウム6.84%; 3,400 mg/kg 体重/日相当、グルタミン酸ナトリウム5.83%; 2,915 mg/kg 体重/日<sup>(2)</sup>、アスパラギン酸ナトリウム5.35%; 2,675 mg/kg 体重/日<sup>(2)</sup>、クエン酸ナトリウム8.9%; 4,450 mg/kg 体重/日<sup>(2)</sup>、エリソルビン酸ナトリウム6.87%; 3,435 mg/kg 体重/日、重炭酸ナトリウム2.9%; 1,450 mg/kg 体重/日<sup>(2)</sup>若しくは塩化ナトリウム2.02%; 1,010 mg/kg 体重/日<sup>(2)</sup>)又はサッカリンナトリウム(7.5%) + 塩化アンモニウム(1.85%; 920 mg/kg 体重/日相当)を10週間混餌投与(飼料:Prolab3200)する試験が実施されている。その結果、光学顕微鏡による組織学的検査では、重炭酸ナトリウム及び塩化ナトリウムを除くナトリウム塩の投与群並びにサッカリンナトリウム投与群に、4/10匹以上の頻度で尿路移行上皮の単純過形成の発生が認められたとされている。特に、サッカリンナトリウム投与群及びアスコルビン酸ナトリウム投与群では、単純過形成の発生頻度が比較的高く(それぞれ9/10匹及び10/10匹)、さらに、それぞれ1匹及び3匹に乳頭状/結節状過形成の発生が認められたとされている。重炭酸ナトリウム投与群では3/10匹の頻度で単純過形成の発生が認められたが統計学的有意性がなく、塩化ナトリウム投与群では過形成性病変が発生しなかったとされている。また、サッカリンナトリウム+塩化アンモニウム投与群では膀胱が組織学的に正常であり、過形成性病変の発生は認められなかったとされている。走査型電子顕微鏡による超微形態学的検査では、グルタミン酸ナトリウム及び塩化ナトリウムを除くナトリウム塩の投与

群並びにサッカリンナトリウム投与群のすべての動物に、膀胱移行上皮発がんの初期段階とされる高度の増殖性変化が認められたとされている。グルタミン酸ナトリウム投与群では 7/10 匹に、さらに、塩化ナトリウム投与群でも 5/10 匹に同様の変化が認められたとされている。サッカリンナトリウム+塩化アンモニウム投与群では、同様の変化がほとんど認められなかった (1/10 匹) とされている。BrdU 標識率を指標とした膀胱の移行上皮細胞増殖活性に関する検査では塩化ナトリウムを除くナトリウム塩の投与群で増強する傾向が認められたが、サッカリンナトリウム、アスコルビン酸ナトリウム及びクエン酸ナトリウム投与群のみで統計学的有意性が得られたものであり、また、サッカリンナトリウム+塩化アンモニウム投与群で細胞増殖活性の増強が認められなかったとされている。尿 pH は、サッカリンナトリウム投与群で低下し、対照群と同程度であった塩化ナトリウム投与群を除く他のすべてのナトリウム塩投与群で上昇したが、いずれにおいても 6.5 を下回ることがなかったとされている。それに対して、サッカリンナトリウム+塩化アンモニウム投与群の尿は pH が著しく低下し酸性化したとされている。一方、すべてのナトリウム塩の投与群及びサッカリンナトリウム投与群ではリン及びカルシウムを主成分とし、ほかにカリウム、塩素、硫黄及びケイ素を含有する尿中沈渣の生成が認められた (定量はされていない。) が、サッカリンナトリウム+塩化アンモニウム投与群ではそのような尿中沈渣の生成は認められなかったとされている。Cohen らは、これらのナトリウム塩の投与によってラット膀胱移行上皮にがんを発生させるには、高用量で暴露させること及び尿 pH を 6.5 以上とすることが必要であり、尿量及び尿中ナトリウム濃度の増加や尿中沈渣の存在もある程度関与していると考察している (参照 5、113)。本委員会としては、本試験は 1 用量のみの試験であることから、本試験における NOAEL の評価を行わなかった。

#### (u') Ogawa ら (1996) のラット 72 週間試験

IARC73 においても引用されている Ogawa ら (1996) の報告によれば、F344 ラット (各群雄 9~29 匹) について、対照群のほか、サッカリンナトリウム (5% ; 2,500 mg/kg 体重/日相当) を 11 週間若しくは 72 週間、アスコルビン酸ナトリウム (5% ; 2,485 mg/kg 体重/日相当) を 11 週間、ウラシル (3% ; 1,500 mg/kg 体重/日<sup>(2)</sup>) を 20 週間混餌投与する群及び FANFT (0.2%) を 6 週間混餌投与した後に基礎飼料 (飼料 : Prolab3200) を 72 週間与える群を設定し、それぞれ摂餌又は投与の終了後に下部尿路移行上皮細胞の分化に関するバイオマーカーであるウロプラキンに対する膀胱の免疫組織化学的染色を行う試験が実施されている。その結果、サッカリンナトリウムの投与により発生した単純過形成のウロプラキン免疫組織化学的染色パターンは、アスコルビン酸ナトリウムの投与により発生した単純過形成のそれと全く同一であったとされている。組織学的に同一の所見を示す過形成性病変に対するウロプラキン染色パターンや、発がん過程の各段階別のウロプラキンの発現プロファイルは、サッカリンナトリウム、アスコルビン酸ナトリウム及びウラシル投与群と、遺伝毒性発がん物質とされる FANFT 投与群

との間で異なっていたとされている。表層部膀胱移行上皮のウロプラキン陽性率については、FANFT 投与群の乳頭状/結節状過形成及び移行上皮癌のみで低下したとされている。中層部上皮のウロプラキン陽性率については、サッカリンナトリウム、アスコルビン酸ナトリウム及びウラシル投与群の正常上皮、ウラシルを除くすべての被験物質の投与群の単純過形成、サッカリンナトリウム投与群の乳頭状/結節状過形成、FANFT 投与群の移行上皮癌で対照群より高値であったとされている。ウラシル投与群の乳頭腫症でも対照群より高値の傾向が見られたが、統計学的有意性を得るに至らなかったとされている。なお、サッカリンナトリウム投与群の単純過形成及び乳頭状/結節状過形成で正常上皮より高値の傾向が見られたが、統計学的有意性を得るに至らなかったとされている（参照5、114）。本委員会としては、本試験は1用量のみの試験であることから、本試験における NOAEL の評価を行わなかった。

b. マウス

(a) Allen ら (1957) のマウス 52 週間試験 (参考)

経口投与による試験ではないので参考データであるが、IARC73 においても引用されている Allen ら (1957) の報告によれば、サッカリン (製法及び純度不詳) (0, 2 mg) をコレステロールで賦形したペレットとしてマウス (性及び週齢不詳) (対照群 28 匹、投与群 20 匹) の膀胱内腔に挿入し、挿入後 52 週間の観察を行う試験が実施されている。挿入 30 週間後まで生存した動物のうち膀胱腫瘍の発生が見られたものは、対照群で 1/24 匹であったのに対し、投与群で 4/13 匹 ( $p=0.01$ ) であったとされている (参照5、115)。IARC ワーキンググループは、ペレットそのものによる腫瘍発生の可能性もあり、本試験成績の解釈を行うことは極めて困難であるとしている (参照5)。本委員会としては、IARC ワーキンググループの指摘を妥当と考え、認められた膀胱腫瘍がサッカリンの投与に直接起因するとは断定できないと判断した。

(b) Roe ら (1970) のマウス二段階発がん試験

IARC73 及び FAS17 においても引用されている Roe ら (1970) の報告によれば、9~14 週齢の交雑 Swiss マウス (対照群雌 100 匹、各投与群雌 50 匹<sup>33)</sup>) に、BP (0, 50  $\mu\text{g}$ ) 含有ポリエチレングリコールエーテルを 0.2 mL 単回強制経口投与 (胃内挿管) するイニシエーション段階の処置を行い、その 7 日後からサッカリン (0, 5%; 0, 7,500 mg/kg 体重/日相当) をプロモーションの段階で 18 か月間混餌投与する試験が実施されている。その結果、BP 処置サッカリン投与群で体重増加抑制が見られたことを除き、生存率及び体重に対する BP 処置又はサッカリン投与による影響は認められなかったとされている。投与開始 18 か月後の時点で生存していた動物では、BP 無処置対照群と比較して BP 処置群において前胃上皮の乳頭腫及び癌の発生率の増加が見られたが、BP 処置の有無にかかわらずサッカリンの投与に関連した当該腫瘍の発生率、個数及び程度の変化は認められなかったとされている。膀胱につ

<sup>33</sup> 誤って対照群に体重の重い動物、投与群に体重の軽い動物を振り分けてしまったとされている。

いて注意深く肉眼的観察を行ったが、いずれの群においても異常の認められた動物はなかったとされている。なお、膀胱についての病理組織学的検査は行われていない。Roeらは、本試験の条件下においてサッカリンに発がん性及びBP処置に係る発がんプロモーション作用は認められなかったと結論している(参照5、10、116)。IARCワーキンググループは、BPには膀胱に対する臓器親和性がないこと及び膀胱について病理組織学的検査が行われていないことを指摘している(参照5)。本委員会としては、IARCワーキンググループの指摘を是認し、本試験成績を評価に用いないこととした。

(c) Bryanら(1970)のマウス膀胱埋込400日間試験(参考)

経口投与による試験ではないので参考データであるが、Bryanら(1970)の報告によれば、60~90日齢のSwissマウス(各回各群雌100匹)の膀胱にサッカリンナトリウム(0、20% ; 0、4~4.8 mg<sup>(34)</sup>)を含むペレットを外科的に埋め込み、埋込み400日後に最終と殺し、埋込み後175日間以上生存した動物について脳以外の全組織・器官の剖検及び主要組織・器官の病理組織学的検査を行う試験が2回実施されている。その結果、膀胱癌発生率は、対照群で1回目8/63匹(13%)、2回目5/43匹(12%)であったのに対し、投与群で1回目31/66匹(47%)、2回目33/64匹(52%)と統計学的に有意な増加( $p < 0.001$ )が認められたとされている。膀胱に埋め込まれたペレット中のサッカリンナトリウムは、埋め込み5.5時間後に50%、1.5日後には99%が溶出していたことから、Bryanらは、膀胱がサッカリンナトリウムに暴露された期間はごく短いものであったとしている。(参照117)

(d) Kroesら(1977)のマウスを用いた七世代にわたる試験

IARC73及びFAS17においても引用されているKroesら(1977)の報告によれば、平均体重14gのSwissマウス(週齢不詳)(F<sub>0</sub>)(各群雌雄各50匹)にサッカリン(主たる不純物としてOTSAを0.5%含有)(0、0.2、0.5% ; 0、300、750 mg/kg体重/日<sup>(35)</sup>)を混餌投与し、投与開始5週後に各群内で雌20匹及び雄10匹を交配し、得られた児動物(F<sub>1a</sub>)を離乳後にと殺<sup>(35)</sup>し、F<sub>0</sub>の各群内において残る雌30匹及び雄15匹を交配して児動物(F<sub>1a</sub>)を得て、F<sub>1a</sub>以降各世代において同様に各群内雌雄2:1で交配してF<sub>2a</sub>~F<sub>6a</sub>と2腹目のF<sub>2b</sub>~F<sub>6b</sub>を得て、F<sub>2a</sub>からは3腹目のF<sub>3c</sub>が得られている。

F<sub>1a</sub>~F<sub>5a</sub>について、離乳後各群雄10匹及び雌20匹に調整し、4か月間の投与を行った後にと殺する試験が実施されている。その結果、F<sub>2a</sub>の0.2%投与群の雌1匹で投与開始3か月後に膀胱乳頭腫が認められたとされている。そのほか、体重に被験物質の毒性影響を示唆する変化は見られず、剖検及び病理組織学的検査(腎臓、膀胱等)において被験物質の投与に関連した異常は認められなかったとされている。

F<sub>0</sub>、F<sub>3b</sub>及びF<sub>6a</sub>について、各群雌雄各50匹に調整し、21か月間の

<sup>34</sup> ペレットの重量は20~24 mgと報告されていることから換算。

<sup>35</sup> 同腹生存胎児数が少なく、その次の世代の生殖が困難と判断したため離乳後にと殺したと説明されている。



投与を行った後にと殺する試験が実施されている。その結果、生存率、体重、摂餌量 ( $F_{6a}$  のみ観察) 及び血液学的検査において被験物質の投与に関連した明らかな変化は認められなかったとされている。病理組織学的検査において、 $F_0$  の対照群の雌 1 匹に未分化の膀胱癌、 $F_0$  の 0.2% 投与群の雄 1 匹に非侵襲性の膀胱移行上皮癌及び  $F_{3b}$  の 0.5% 投与群の雄 1 匹に組織学的異型度 II の膀胱移行上皮癌が認められたが、いずれの投与群においても腫瘍発生率の増加は認められなかったとされている。なお、膀胱結石の発生率は対照群を含む各群で同等であったとされている。Kroes らは、本試験においてサッカリンに毒性及び発がん性は認められなかったと結論している (参照 5、10、118)。本委員会としては、Kroes らの結論を是認し、本試験条件下においてサッカリンの投与に起因する毒性 (発がん性を含む) は認められなかったと判断した。

(e) Homburger (1978) のマウス最長 2 年間試験

IARC73 においても引用されている Homburger (1978) の報告によれば、約 8 週齢の CD マウス (各群雌雄各 25 匹) に市販サッカリンナトリウム (OTSA を 345ppm 含有) から製造したサッカリン (0、1、5%) を最長 2 年間混餌投与する試験が実施されている。なお、投与開始 6 か月間以内に死亡した動物については放棄したとされているが、それらの生存期間については明らかにされていない。その結果、剖検において異常が見られた組織・器官のすべて及び各群少なくとも 12 匹以上の主要組織・器官について行った病理組織学的検査において、投与群では膀胱に低頻度の乳頭状過形成・乳頭腫が認められたほか、血管腫瘍、肺腫瘍、肝細胞癌及びリンパ腫が散見されたが、それらの発生率と対照群のそれとの間に有意な差は認められなかったとされている。また、別途実施された検証試験の投与群ではこれらの腫瘍の発生は認められなかったとされているが、当該検証試験の結果は示されていない (参照 5、94)。IARC ワーキンググループは、試験成績の報告が不十分であることを指摘している (参照 5)。本委員会としては、IARC ワーキンググループの指摘を妥当と考え、本試験成績を評価に用いないこととした。

(f) Fukushima ら (1983) のマウス最長 20 週間経時試験

IARC73 においても引用されている Fukushima ら (1983) の報告によれば、6 週齢の B6C3F<sub>1</sub> マウスにサッカリンナトリウム (純度 99.5% : OTSA を 7ppm 含有) (0、5%) を混餌投与 (飼料 : 対照群 Oriental MF、投与群 Oriental M) し、投与開始 0、4、8、12、16 又は 20 週後に投与群 5 匹ずつをと殺する経時試験が実施されている。その結果、体重に変化は認められなかったとされている。走査型電子顕微鏡も用いた病理組織学的検査においては、投与開始 12 週後にと殺した投与群 1 匹の膀胱移行上皮に単純過形成が見られたが、投与開始 16 週後及び 20 週後に膀胱の増殖性病変は認められなかったとされている。投与開始 4、12 又は 20 週後の膀胱粘膜の [methyl-<sup>3</sup>H]チミジン標識率は、いずれも対照群との間で差が認められなかったとされている (参照 5、102)。IARC ワーキンググループは、動物数が少ないこと及び試験期間が短いことを指摘している (参照 5)。本委員会としては、IARC ワーキンググルー

プの指摘を妥当と判断し、本試験成績を評価に用いないこととした。

(g) Prasado & Rai (1986) のマウス 1 年間試験

IARC73 においても引用されている Prasado & Rai (1986) の報告によれば、6 週齢の ICR/Swiss マウス (各群雌雄各 10 匹) にサッカリン (0、500、1,000、1,500 mg/kg 体重/日) を 1 年間反復強制経口投与した後に殺す試験が実施されている。その結果、全投与群で途中死亡した動物は無かったとされている。体重については、1,500 mg/kg 体重/日投与群の雄で摂餌量の減少を伴わない低値が認められ、全投与群に投与期間を通じて見られた下痢との関連性が指摘されている。脳、甲状腺、肺、肝臓、胃、回腸、腎臓、脾臓、精巣及び卵巣についての病理組織学的検査においては、1,500 mg/kg 体重/日投与群の雄の 5/10 匹、雌の 3/10 匹に甲状腺の乳頭腺癌が認められ、肺への転移も認められたとされている。Prasado & Rai は、甲状腺乳頭腺癌の発生について、サッカリンによる直接的作用によるものであり、それにはエピジェネティックな発癌機構が関与していると考察している (参照 5、119)。IARC ワーキンググループは、動物数が適切でないこと、試験成績の報告が完全でないこと並びにマウス及びその他の動物種を用いた他の試験において甲状腺腫瘍の発生は再現されていないことを指摘している (参照 5)。本委員会としては、IARC ワーキンググループの指摘を妥当と判断し、本試験成績を評価に用いないこととした。

(h) Frederick ら (1989) のマウス二段階肝・膀胱発がん試験

IARC73 においても引用されている Frederick ら (1989) の報告によれば、21~26 日齢の離乳 BALB/cStCrIfC3H/Nctr マウス (各群雌 96~192 匹) について、表 7 の①~⑩群を設定し、2-AAF (0、200ppm) を 13 週間混餌投与するイニシエーション段階の処置の後、2 週間休薬し、その後のプロモーション段階でサッカリンナトリウム (純度 98%超) (0、0.1、0.5、1.0、5.0%) を 117 週間混餌投与する試験が実施されている。その結果、2-AAF 処置対照群 (⑤群) の死亡率は 2-AAF 無処置対照群 (⑩群) よりも有意に高かったが、2-AAF 処置投与群 (①~④群) では、サッカリンナトリウムの用量に関連した生存期間の延長が認められたとされている。2-AAF 無処置投与群 (⑥~⑩群) の生存期間は対照群よりもわずかに長かったとされている。病理組織学的検査において、膀胱腫瘍の発生は、2-AAF 無処置群 (⑥~⑩群) では認められず、2-AAF 処置群でも対照群 (⑤群) の 2/164 匹、0.1%投与群 (④群) の 3/165 匹に見られたほかは認められなかったとされている。膀胱の過形成の発生率も、2-AAF 処置群 (①~⑤群) 及び 2-AAF 無処置群 (⑥~⑩群) それぞれの対照群と投与群との間で同様であったとされている。肝臓腫瘍の発生率についても、2-AAF 処置群 (①~⑤群) で対照群及び全投与群ともに 17~20%、2-AAF 無処置群 (⑥~⑩群) で対照群及び全投与群ともに 5~6%と、サッカリンナトリウムの投与に関連した変化は見られなかったとされている。以上より、Frederick らは、サッカリンナトリウムにマウス肝・膀胱発がんプロモーション作用はないものと推察している。2-AAF 無処置群 (⑥~⑩群) でサッカリンナトリウムの用量に

関連したハーダー腺腫瘍の発生率の増加 ( $p=0.04$ ) が見られたが、そのほか、2-AAF 処置の有無にかかわらずサッカリンナトリウムの用量に関連した腫瘍発生率の増加は認められなかったとされている。一方、リンパ腫発生阻害が 2-AAF 処置の有無にかかわらずサッカリンの用量に関連して見られたとされている (参照 5、120)。IARC ワーキンググループは、ハーダー腺の腫瘍発生は加齢に関連して自然発生することが知られていること、各群動物数が等しくないこと、ハーダー腺腫瘍の背景発生頻度は変動すること等を指摘している (参照 5)。本委員会として、サッカリンナトリウムにマウス肝・膀胱発がんプロモーション作用はないとする Frederick らの結論を是認した。また、本委員会としては、IARC ワーキンググループの指摘を妥当と考え、本試験成績からはサッカリンナトリウムの投与によりハーダー腺腫瘍が誘発されたとの結論には至らないと判断した。

表 7 Frederick ら (1989) のマウス二段階膀胱発がん試験における群設定

群	動物数	イニシエーション段階 (13 週間)	休眠期間 (2 週間)	プロモーション段階 (117 週間)
①	96	2-AAF	対照	サッカリンナトリウム 5.0%
②	144	2-AAF	対照	サッカリンナトリウム 1.0%
③	192	2-AAF	対照	サッカリンナトリウム 0.5%
④	192	2-AAF	対照	サッカリンナトリウム 0.1%
⑤	192	2-AAF	対照	対照
⑥	96	対照	対照	サッカリンナトリウム 5.0%
⑦	144	対照	対照	サッカリンナトリウム 1.0%
⑧	192	対照	対照	サッカリンナトリウム 0.5%
⑨	192	対照	対照	サッカリンナトリウム 0.1%
⑩	192	対照	対照	対照

(i) Torres de Mercau ら (1997) のマウス 180 日間試験

Torres de Mercau ら (1997) の報告によれば、4 か月齢の C3H マウス (各群雌雄各 5 匹) にサッカリンナトリウム (0、0.1%) を 180 日間混餌投与する試験が実施されている。その結果、対照群と比較して、投与群の結腸吸収上皮細胞の微絨毛の長さ、直径及びその他の形状の変化が認められたとされている (参照 121)。本委員会としては、病変の発現頻度、性差等、試験結果の報告が十分でないことから、本試験成績を評価に用いないこととした。

c. ハムスター

(a) Althoff ら (1975) のハムスター生涯試験

IARC73 及び FAS17 における引用によれば、Althoff ら (1975) は、8 週齢の交雑シリアン・ゴールデン・ハムスター (各群雌雄各 30 匹) に M 法で製造されたサッカリン (0、0.156、0.312、0.625、1.25%<sup>(36)</sup>) を生涯飲水投与する試験を実施している。サッカリンの平均摂取量は、0.156%投与群で 44 mg/動物であり、1.25%投与群で 353 mg/動物であったとしている。病理組織学的検査においては、対照群を含む全群に尿路移行上皮の腫瘍は認められなかったとしている。認められた腫瘍性病変の種類と頻度については、対照群と投与群との間で差がなく、本試験

<sup>36</sup> 予備試験 (8 週間投与) における最大耐量であったとしている。

に用いた動物において通常見られる範囲内であったとしている（参照 5、10）。本委員会としては、Althoffらの見解を是認し、本試験における NOAEL を、雌雄ともに本試験の最高用量である 1.25% (353 mg/動物/日) と評価した。

(b) Fukushima ら (1983) のハムスター最長 20 週間経時試験

IARC73 においても引用されている Fukushima ら (1983) の報告によれば、6 週齢のシリアン・ゴールデン・ハムスターにサッカリンナトリウム (純度 99.5% : OTSA を 7ppm 含有) (0、5%) を混餌投与 (飼料 : 対照群 Oriental MF、投与群 Oriental M) し、投与開始 0、4、8、12、16 又は 20 週後に投与群 5 匹ずつをと殺する経時試験が実施されている。その結果、体重に変化は認められなかったとされている。走査型電子顕微鏡も用いた病理組織学的検査においては、膀胱移行上皮に単純過形成及び乳頭状/結節状過形成の発生は認められなかったとされている。投与開始 4、12 又は 20 週後にと殺した投与群の膀胱粘膜の [methyl-<sup>3</sup>H]チミジン標識率は、いずれも対照群との間で差が認められなかったとされている (参照 5、102)。IARC ワーキンググループは、動物数が少ないこと及び試験期間が短いことを指摘している (参照 5)。本委員会としては、IARC ワーキンググループの指摘を妥当と判断し、本試験成績を評価に用いないこととした。

d. モルモット

(a) Fukushima ら (1983) のモルモット最長 20 週間経時試験

IARC73 においても引用されている Fukushima ら (1983) の報告によれば、6 週齢の Hartley モルモットにサッカリンナトリウム (純度 99.5% : OTSA を 7ppm 含有) (0、5%) を混餌投与 (飼料 : 対照群 Oriental MF、投与群 Oriental M) し、投与開始 0、4、8、12、16 又は 20 週後に投与群 3 匹ずつをと殺する経時試験が実施されている。その結果、体重については、投与群で増加抑制が認められたとされている。走査型電子顕微鏡も用いた病理組織学的検査においては、膀胱移行上皮に単純過形成及び乳頭状/結節状過形成の発生は認められなかったとされている。投与開始 4、12 又は 20 週後にと殺した投与群の膀胱粘膜の [methyl-<sup>3</sup>H]チミジン標識率は、いずれも対照群との間で差が認められなかったとされている (参照 5、102)。IARC ワーキンググループは、動物数が少ないこと及び試験期間が短いことを指摘している (参照 5)。本委員会としては、IARC ワーキンググループの指摘を妥当と判断し、本試験成績を評価に用いないこととした。

e. イヌ

(a) Taylor ら (1968) のイヌ 11 か月間試験

FAS17 においても引用されている Taylor ら (1968) の報告によれば、イヌ (各群 4 匹) (性別不詳) にサッカリンナトリウム (0、65 mg/kg 体重/日) を週 6 日、11 か月間反復強制経口投与 (胃内挿管) する試験が実施されている。その結果、投与開始 6 か月後以降に投与群の 1 匹が食欲不振となり、死に至ったが、剖検において異常所見は認められな

ったとされている。投与開始 10 か月前後から投与終了までの約 2 か月間、投与群の全動物に明らかな下痢を伴わない軟便が見られたが、外観、摂餌量及び摂水量に影響は認められなかったとされている。そのほか、体重、血液学的検査（血色素、白血球数及び赤血球数）、血液生化学的検査（ビリルビン、非たん白質性窒素及びフェノールスルホンフタレイン）、尿検査並びに体腔内諸器官の剖検及び病理組織学的検査において、投与群に異常は認められなかったとされている（参照 10、79）。本委員会としては、投与終了前 2 か月間に投与群で認められた軟便は、一般状態及びいずれの毒性項目にも異常が認められなかったことから、投与に起因する毒性変化ではないと判断し、本試験における最高用量は無毒性量であると考えられたが、本試験は 1 用量のみの試験であることから、本試験における NOAEL の評価を行わなかった。

#### (b) Kennedy ら (1976) のイヌ 16 週間試験

FAS17 においても引用されている Kennedy ら (1976) の報告によれば、4~5 か月齢の純血統ビーグル犬（各群雌雄各 3 匹）について、対照群のほか、表 4（50 頁）のような混餌投与群を設定し、16 週間の投与を行う試験が実施されている。その結果、体重については、④群の雌雄で全投与期間を通じた増加抑制が見られたが、より高用量の⑤群及び⑥群では見られなかったことから、Kennedy らは、この体重増加抑制について生物学的変動を反映したものであるとしている。血液学的検査において、⑥群の雄で白血球数の増加、④群の雄と①群の雌で血色素濃度の増加が見られたが正常値の範囲内であったとされている。血液生化学的検査において、アルカリホスファターゼ活性が⑥群の雌で増加し、①群の雄で減少したが、これについて Kennedy らは、大きな変化ではなく、増減に一貫性が見られないことから正常な生物学的変動を反映したものであると推定している。そのほか、一般状態、摂餌量、尿検査、器官重量（肝臓、腎臓、脾臓、生殖器、心臓、脳、副腎及び甲状腺）並びに剖検及び病理組織学的検査において被験物質の投与に関連した変化は認められなかったとされている（参照 10、93）。本委員会としては、Kennedy らの見解を妥当と考えた。なお、本委員会としては、本試験は 1 用量のみの試験であることから、本試験における NOAEL の評価を行わなかった。

#### f. サル

- (a) Coulston ら (1975) 及び McChesney ら (1977) のサル 79 か月間試験  
IARC73 及び FAS17 においても引用されている Coulston ら (1975) 及び McChesney ら (1977) の報告によれば、アカゲザル（各群雌雄各 2~3 匹）にサッカリンナトリウム<sup>(37)</sup>（0、20、100、500 mg/kg 体重/日）を週 5 又は 6 日、79 か月間反復経口投与した後にと殺する試験が実施されている。その結果、対照群の 2 匹及び各投与群 1 匹が投与期間内に死亡したが、投与群の 3 匹については、死因が被験物質の投与に関

<sup>37</sup> 試験の途中でサッカリンナトリウムのロットが替わり、第 1 のロットは OTSA を 2.4ppm 含有し、第 2 のロットは OTSA を 3.2ppm 含有していたとされている。ただし、サッカリンナトリウムの投与における 2 種類のロットの具体的な使い分け方については、詳細が不明である。

係なく、膀胱を含むいかなる臓器にも過形成性又は腫瘍性の変化を認めなかったとされている。投与群の体重は、対照群に比べ、20 及び 100 mg/kg 体重/日投与群で高値、500 mg/kg 体重/日投与群群で低値を示したが、いずれも有意な変化ではなかったとされている。そのほか、一般状態、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査（沈渣）、器官重量（腎臓及び精巣）並びに剖検及び病理組織学的検査（腎臓、精巣及び膀胱）で被験物質の投与に関連した変化は認められなかったとされている（参照 5、10、122、123）。本委員会としては、本試験における NOAEL を、雌雄ともに本試験の最高用量である 500 mg/kg 体重/日と評価した。

#### (b) Takayama ら (1998) のサル生涯試験

IARC73 においても引用されている Takayama ら (1998) の報告によれば、アカゲザル、カニクイザル及びアフリカミドリザル（対照群雄 10 匹及び雌 6 匹、投与群雄 9 匹及び雌 11 匹<sup>38)</sup>）にサッカリンナトリウム（純度 99%超）（0、25 mg/kg 体重/日）を週 5 日、生後間もなくから死亡するか切迫殺されるまでの生涯にわたり（103~283 か月間<sup>39)</sup>）混餌投与する試験が実施されている。その結果、光学顕微鏡のほか走査型電子顕微鏡も用いた観察においても尿路（腎盂、尿管、膀胱及び尿道）移行上皮に変化は認められなかったとされている。死亡の 1~2 年前に、アカゲザル及びカニクイザルの各群雌雄各 2 匹について実施した尿検査において、尿 pH、尿浸透圧、尿たん白、尿中のナトリウム、カルシウム及びリンの濃度並びに結晶尿の増加は認められず、尿中に異常な結石及び沈渣の生成は認められなかったとされている。そのほか、投与群のうちアフリカミドリザルの雌 1 匹に子宮筋腫、別の雌 1 匹に卵巣乳頭嚢腺腫及び胃平滑筋腫、アカゲザルの雄 1 匹に甲状腺リンパ腫の発生が見られたが、Takayama らは、これらの腫瘍について、当該動物に係るコロニーの無処置対照やブリーダーでの飼育動物においても観察される種類の腫瘍であるとしている（参照 5、124）。Thorgeirsson ら (1994) の中間報告によれば、投与開始から 22 年間に経過した時点において投与群の 5 匹が死亡したが、腫瘍の発生は認められなかったとされている。また、投与群の生存動物 15 匹についても腫瘍発生の証拠は認められず、その他の疾患の兆候も認められなかったとされている（参照 125）。IARC ワーキンググループは、用量が比較的少量であること、動物数が比較的少ないこと及び用いた種が多様であることを指摘している（参照 5）。本委員会としては、Takayama ら及び Thorgeirsson らの見解を是認した。一方、本委員会としては、IARC ワーキンググループの指摘を妥当と考え、本試験において NOAEL を求めるべきではないと判断した。

#### ② 不純物

サッカリン類の不純物（表 1（11 頁）参照）を被験物質とした反復投与

<sup>38)</sup> 投与群の構成は、アカゲザル雄 5 匹及び雌 2 匹、カニクイザル雌雄各 3 匹、アフリカミドリザル雄 1 匹及び雌 5 匹並びにアカゲザル雄とカニクイザル雌との交雑種雌 1 匹とされている。

<sup>39)</sup> 投与開始 103、128、157、168、170、192、214 及び 218 か月後に 1 匹ずつ計 8 匹が死亡したとされている。

毒性及び発がん性に関する試験成績として以下のような報告がある。

a. OTSA

FAS17における引用によれば、Stavricら(1973)は、Tisdellら(1974)の試験及びTaylor & Friedman(1974)の試験(Taylorら(1980)により最終報告)において使用されたRF法製のサッカリンナトリウムがOTSAを最大で4,660ppm含有していたと報告したことから、NRC(1974)により、二世代にわたる試験において見られた膀胱腫瘍の発生増加はOTSAによるものではないかとの指摘がなされた。(参照10)

(a) Schmähl(1978)のラット生涯試験

IARC73及びSIARにおいても引用されているSchmähl(1978)の報告によれば、3か月齢のSDラット(各群雌雄各38匹)にOTSA(0、20、200 mg/kg 体重/日)を生涯にわたって混餌投与する試験が実施されている。その結果、一般状態及び体重は正常であったとされている。被験物質の投与に関連した急性期の影響は認められなかったが、リンパ肉腫が対照群で7/71匹、20 mg/kg 体重/日投与群で10/75匹、200 mg/kg 体重/日投与群で10/76匹と対照群を含む各群同様の発生率で見られ、それにより多くの動物が死亡したとされている。なお、リンパ肉腫が発生した時期の中央値は対照群で540日であったのに対し、20 mg/kg 体重/日投与群で670日、200 mg/kg 体重/日投与群で705日であったとされている。また、白血病が対照群で0/71匹、20 mg/kg 体重/日投与群で5/75匹、200 mg/kg 体重/日投与群で3/76匹に見られたが、用量相関性は認められないことから、これについてSchmählは被験物質の投与に関連したものか否か判断できないとしている。膀胱腫瘍については、対照群でその発生は見られなかったが、20 mg/kg 体重/日投与群では乳頭腫が3/75匹に見られ、200 mg/kg 体重/日投与群では乳頭腫が4/76匹に、癌が1/76匹に見られたとされている。Schmählは、本試験において認められた悪性腫瘍病変の発生率は対照群を含む各群間で同等であったと結論している(参照5、30、126)。SIARでは、背景データ、被験物質の純度、統計処理、膀胱腫瘍を発生した動物の性別、膀胱寄生虫の有無等が不詳であること等から、本試験の信頼性は確保されていないものとされている(参照30)。本委員会としては、SIARでの判断を是認し、本試験成績を評価に用いないこととした。

(b) Arnoldら(1980)のラットを用いた二世代にわたる試験(再掲)

IARC73、FAS17及びSIARにおいても引用されている上述のArnoldら(1980)の報告によれば、32日齢のSDラット(F<sub>0</sub>) (各群雌雄各50匹(250 mg/kg 体重/日+塩化アンモニウム1%投与群のみ雄40匹、雌38匹))にOTSA(不純物を100ppm未満含有)(0、2.5、25、250 mg/kg 体重/日、250 mg/kg 体重/日+塩化アンモニウム1%)を飲水投与(自由摂取)し、投与開始90日後に各群内で雌雄を1:1で1週間交配し、妊娠、出産及び哺育を経て142週まで投与を継続した後にと殺するとともに、得られた児動物(F<sub>1</sub>) (各群雌雄各49~50匹)についても、生後21日に離乳後、F<sub>0</sub>と同様の投与を投与127週まで継続した後にと殺す

る試験が実施されている。その結果、体重については、F<sub>0</sub>及びF<sub>1</sub>の250 mg/kg 体重/日投与群及び250 mg/kg 体重/日+塩化アンモニウム1%投与群の雌雄で被験物質の投与に関連した増加抑制が認められ、摂餌量の減少を伴っていたとされている。そのほか、生存率、一般状態、血液学的検査及び尿検査において、被験物質の投与に関連した異常は認められなかったとされている。肉眼的観察では腎臓及び膀胱に結石が散見されたが、フィルターを用いた尿ろ過物の観察では全群の腎臓及び膀胱に結石が認められ、結石の構成成分についても被験物質の投与に関連した一定の傾向は認められなかったとされている。全動物について実施された病理組織学的検査においては、膀胱における腫瘍性病変として、良性腫瘍（膀胱移行上皮乳頭腫）の発生が、F<sub>0</sub>の対照群の雄1匹、2.5 mg/kg 体重/日投与群の雌雄各1匹及び250 mg/kg 体重/日投与群の雄1匹並びにF<sub>1</sub>の2.5 mg/kg 体重/日投与群の雌2匹に見られたが、F<sub>0</sub>及びF<sub>1</sub>ともに悪性腫瘍（膀胱移行上皮癌）の発生は認められなかったとされている。なお、本試験において用いられたラットの膀胱に線虫の寄生は認められなかったとされている（参照5、10、30、97）。本委員会としては、本試験成績を是認し、膀胱移行上皮乳頭腫の発生に用量相関性が認められず、投与に起因した変化ではないと考えられることから、本試験条件下においてOTSAの投与に起因する膀胱発がん性は認められなかったと判断した。

(c) Hoosonら(1980)のラット二段階膀胱発がん試験

IARC73においても引用されている上述のHoosonら(1980)の報告によれば、離乳Wistarラット(対照群雌63匹、各投与群雌50匹)について、表5(55頁)の①~⑦群を設定し、MNU(0、最大1.5mg)を飽和水溶液0.15 mLとして尿道カテーテルにより単回膀胱内滴下するイニシエーション段階の処置の2週間から2年間のプロモーション段階の投与を飲水により行う試験Iが実施されている。また、試験Iの開始6か月後に、離乳Wistarラット(各群雌50匹)について、表5の⑧~⑩群を設定し、MNU(0、最大1.5mg)を①~⑦群と同様に処置した8日後から2年間のプロモーション段階の投与を混餌により行う試験IIが実施されている。その結果、OTSAの投与による尿pH上昇、結晶尿、結石生成及び膀胱病理への影響は認められなかったとされている。また、MNU処置群において、OTSAの投与や投与したサッカリン中のOTSA混入に関連した膀胱移行上皮の過形成又は腫瘍の発生率の増加は認められなかったとされている。以上よりHoosonらは、OTSAは本試験において膀胱発がんプロモーション作用に関与しなかったと結論している(参考5、99)。本委員会としては、本試験成績を是認し、本試験条件下においてOTSAの投与に起因する膀胱発がんプロモーション作用はなかったと判断した。

(d) 厚生省(1998)のラット反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

SIARにおいても引用されている厚生省(当時)の平成9年度既存化学物質安全性点検結果によれば、8週齢のSDラット(各群雌雄各13匹)に、OTSA(0、20、100、500 mg/kg 体重/日)を、雄に対しては



交配前 14 日間、交配期間中 14 日間及び交配期間終了後 14 日間の計 42 日間、雌に対しては交配前 14 日間及び最長 14 日間の交配期間を経て哺育 3 日まで（交配後分娩の認められなかった動物については妊娠 24 日相当日まで）強制経口投与（胃内挿管）し、得られた児動物を哺育 4 日にと殺する反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験が実施されている。その結果、500 mg/kg 体重/日投与群の雌の 3 匹が死亡し、2 匹が切迫殺されている。一般状態については、100 mg/kg 体重/日以上投与群の雌雄に自発運動減少及び腹臥姿勢（投与開始後から）、流涎（投与期間中期から）等の変化が認められたとされている。体重については、100 mg/kg 体重/日投与群の雄で投与初期に摂餌量低下を伴う低値、雌で妊娠及び哺育期に低値、500 mg/kg 体重/日投与群の雄で投与期間を通じて低値、雌で投与初期に摂餌量低下を伴う低値が認められたとされている。血液学的検査においては、500 mg/kg 体重/日投与群の雄で血小板数の高値が認められたとされている。血液生化学的検査では、20 mg/kg 体重/日以上投与群の雄でアルカリホスファターゼ活性の低値、100 mg/kg 体重/日以上投与群の雄で総コレステロール濃度の高値、500 mg/kg 体重/日投与群の雄で総たん白濃度及び  $\gamma$ -GTP 活性の高値、A/G 比、ブドウ糖及びトリグリセリド濃度の低値が認められたとされている。試験担当者は、アルカリホスファターゼ活性の低下及び血中コレステロール濃度の上昇は甲状腺機能低下の際にも認められる変化であり、また、スルホンアミド類にはブドウ糖濃度を低下させる作用があることから、甲状腺及び膵臓の病理組織学的検査において被験物質投与の影響を示唆する病変は認められていないが、被験物質が甲状腺及び膵臓に明瞭な形態学的変化を伴わない軽微な影響を及ぼす可能性は否定できないとしている。器官重量については、100 mg/kg 体重/日以上投与群の雄で腎臓、副腎及び精巣の相対重量の増加、雌で肝臓の相対重量の増加、500 mg/kg 体重/日投与群の雄で肝臓の相対・絶対重量及び腎臓の絶対重量の増加、雌で脳、腎臓及び副腎の相対重量の増加が認められたとされている。剖検では、100 mg/kg 体重/日以上投与群の雄で肝臓の暗色化、腎臓の腫大及び暗色化、雌で肝臓の腫大、肺の肋骨胸膜癒着（癒着部に黄白色塊の付着）及び淡色点、500 mg/kg 体重/日投与群の雄で肝臓の腫大、脾臓のリンパ濾胞不明瞭、肺の暗色点及び白色点<sup>40</sup>等、雌で肝臓の暗色化、肺の横隔膜癒着及び暗赤色点、胸腺の小型化が認められたとされている。病理組織学的検査においては、20 mg/kg 体重/日以上投与群の雄で腎尿細管上皮の好酸性小体の形成の頻度及び程度の増加、100 mg/kg 体重/日以上投与群の雌雄で細胞質が軽微な曇り硝子様を呈した小葉中心性の肝細胞肥大、500 mg/kg 体重/日投与群の雌で心外膜の線維化及び細胞浸潤、胸腺の萎縮、胸腺被膜の線維化、水腫及び細胞浸潤並びに胸腺被膜上の好中球を含む滲出物が認められたとされている。このことから試験担当者は、肝重量増加は肝細胞肥大を反映したものであり、酵素誘導があったと考察している。以上より、試験担当者は、雄については全投与群にアルカリホスファターゼ活性の低値及び腎尿細管上皮の好酸性小体の形成の増強が見られたことから、本試

<sup>40</sup> 病理組織学的検査においてごく軽度な限局性の出血及び軽微な泡沫細胞の集積が認められたとされている。

験における反復投与毒性に係る NOAEL を求めることができないとし、雌については本試験における反復投与毒性に係る NOAEL を 20 mg/kg 体重/日としている（参照 30、127）。一方、SIAR においては、雄ラットに見られた腎臓の変化について雄ラット特有の  $\alpha_2\mu$ -グロブリンの蓄積によるものと考えられるとして、本試験における反復投与毒性に係る NOAEL を雌雄ともに 20 mg/kg 体重/日としている（参照 30）。本委員会としては、雄の全投与群に見られた腎尿細管上皮の好酸性小体の増加について、 $\alpha_2\mu$ -グロブリンによるものである可能性が推察されるが、直接証明されていないものと考え、本試験における雄に係る NOAEL を求めることはできないと判断した。

(e) 厚生省 (2000) のラット 28 日間反復投与毒性試験

厚生省 (当時) の平成 11 年度既存化学物質安全性点検結果によれば、約 5 週齢の SD ラット (各群雌雄各 5~10 匹) に OTSA (0、4、20、100 mg/kg 体重/日) を 28 日間反復強制経口投与 (胃内挿管) した後、対照群及び 100 mg/kg 体重/日投与群について 14 日間の回復期間を設ける 28 日間反復投与毒性試験が実施されている。その結果、投与期間中及び回復期間中に死亡した動物はなかったとされている。一般状態については、100 mg/kg 体重/日投与群の雌雄に投与開始 7~10 日後以降投与期間を通じて各投与 15~20 分後に流涎及び活動性低下が見られたがいずれも各投与約 2 時間後までには回復したほか、100 mg/kg 体重/日投与群の雄 1 匹に投与開始 15 日後以降断続して腹臥位姿勢が見られたとされている。病理組織学的検査においては、100 mg/kg 体重/日投与群の雄で腎尿細管上皮の好酸性小体の形成が統計学的に有意ではないが増加傾向にあったとされている。好酸性小体の形成は、雄ラット固有の  $\alpha_2\mu$ -グロブリンが近位尿細管上皮に取り込まれ好酸性物質として観察される現象であるが、本変化は回復期間終了後においても増加する傾向が見られ、投与中止による回復性は明らかではなかったとされている。そのほか、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査 (アルカリホスファターゼ活性に変化は認められていない)、尿検査及び器官重量について、被験物質の投与に関連した影響は認められなかったとされている。以上より、試験担当者は、100 mg/kg 体重/日投与群の雌雄で見られた流涎及び活動性低下並びに雄で見られた腎尿細管上皮の好酸性小体の形成の増加傾向を基に、本試験における NOAEL を雌雄ともに 20 mg/kg 体重/日としている (参照 128)。本委員会としては、試験担当者の考察を是認し、本試験における NOAEL を雌雄ともに 20 mg/kg 体重/日と評価した。

(f) 厚生省 (2000) のラット簡易生殖毒性試験

厚生省 (当時) の平成 11 年度既存化学物質安全性点検結果によれば、9 週齢の SD ラット (各群雌雄各 13 匹) に、OTSA (0、4、20、100 mg/kg 体重/日) を、雄に対しては交配前 14 日間、交配期間中 14 日間及び交配期間終了後 19 日間の計 47 日間、雌に対しては交配前 14 日間及び最長 14 日間の交配期間を経て哺育 3 日まで (交配後分娩の認められなかった動物については妊娠 26 日相当日まで) 強制経口投与 (胃内挿管)

する簡易生殖毒性試験が実施されている。その結果、死亡し又は切迫殺された動物はなかったとされている。一般状態については、100 mg/kg 体重/日投与群の雌雄で流涎及び活動性低下が各投与後一過性に見られたが、各投与後 4 時間以内には回復したとされている。体重については、100 mg/kg 体重/日投与群の雄でほぼ全投与期間を通じた摂餌量低下を伴わない増加抑制、雌で投与初期に低値及び増加抑制が認められたとされている。そのほか、器官重量並びに剖検及び病理組織学的検査においては、被験物質の投与に関連した変化は認められなかったとされている。以上より、試験担当者は、本試験における反復投与毒性に係る NOAEL を雌雄ともに 20 mg/kg 体重/日としている（参照 1 2 9）。本委員会としては、100 mg/kg 体重/日投与群の雄で腎尿細管上皮に好酸性小体の形成が見られなかったことに疑問が残ったが、試験担当者の考察を是認し、本試験における NOAEL を雌雄ともに 20 mg/kg 体重/日と評価した。

#### b. PTSA

##### (a) 厚生省（1992）のラット反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

厚生省（当時）の平成 3 年度既存化学物質安全性点検結果によれば、8 週齢の SD ラット（各群雌雄各 13 匹）に、PTSA（0、120、300、750 mg/kg 体重/日）を、雄に対しては交配前 14 日間、交配期間中 14 日間及び交配期間終了後 14 日間の計 42 日間、雌に対しては交配前 14 日間及び最長 14 日間の交配期間を経て哺育 3 日まで強制経口投与（胃内挿管）し、得られた児動物を哺育 4 日にと殺する反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験が実施されている。その結果、死亡し又は切迫殺された動物はなかったとされている。一般状態については、120 mg/kg 体重/日以上投与群の雌雄で流涎、750 mg/kg 体重/日投与群の雄で初回投与の翌日及び翌々日に一過性の血尿が認められたとされている。体重については、300 mg/kg 体重/日以上投与群の雌で妊娠期間中の摂餌量低下を伴う増加抑制及び分娩後の低値、750 mg/kg 体重/日投与群の雄で投与初期の摂餌量低下を伴う増加抑制及び全投与期間を通じた低値、雌で妊娠期間中の摂餌量低下を伴う低値が認められたとされている。血液学的検査においては、300 mg/kg 体重/日以上投与群の雄で白血球数の減少等が認められたとされている。血液生化学的検査においては、300 mg/kg 体重/日以上投与群の雄で尿素窒素の用量依存的かつ有意な増加、AST 活性及び塩素濃度の上昇、750 mg/kg 体重/日投与群の雄で ALT 活性の上昇及びカリウム濃度の低下が認められたとされている。器官重量では、300 mg/kg 体重/日以上投与群の雌で腎臓の相対重量の高値及び胸腺の絶対重量の低下傾向、750 mg/kg 体重/日投与群の雄の腎臓及び精巣の相対重量の高値並びに胸腺の絶対重量の低下傾向が見られたとされている。剖検では、300 mg/kg 体重/日以上投与群の雌で胸腺の退縮、750 mg/kg 体重/日投与群の雄で肝臓の暗色化が認められたとされている。病理組織学的検査においては、120 mg/kg 体重/日以上の投与群の雄で膀胱の粘膜上皮層の肥厚及び剥離、粘膜固有層の水腫及び細胞浸潤並びに出血、精細管の萎縮及び精細胞の減少、雌で膀胱の粘膜上皮層の肥厚及び粘膜固有層の細胞浸潤、300 mg/kg 体重/日以上の投与群の雌で胸腺の強い退縮が認められたとされている。以上より、試

験担当者は、本試験における反復投与毒性に係る NOAEL を雌雄ともに 120 mg/kg 体重/日を下回る用量であるとしている（参照 130）。本委員会としては、試験担当者の考察を是認し、本試験における NOAEL を雌雄ともに 120 mg/kg 体重/日を下回る用量と評価した。

#### c. OSBA

##### (a) Kennedy ら (1976) のラット 13 週間試験

FAS17 においても引用されている上述の Kennedy ら (1976) の報告によれば、離乳 SD ラット（各群雌雄各 10 匹）について、対照群のほか、表 4（50 頁）のような混餌投与群を設定し、13 週間の投与を行う試験が実施されている。その結果、⑥群の雄 1 匹が投与 2 週に死亡したが、これは呼吸器感染によるものと推定されている。そのほか、②群を含め、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、器官重量（肝臓、腎臓、脾臓、生殖器、心臓及び脳）並びに剖検及び病理組織学的検査において被験物質の投与に関連した変化は認められなかったとされている。以上より、Kennedy らは、代謝物又は不純物として生じた OSBA による毒性ハザードはほとんどないと結論している（参照 10、93）。本委員会としては、Kennedy らの結論を是認し、サッカリン類の代謝物又は不純物としての OSBA による毒性ハザードはないと判断した。

##### (b) Kennedy ら (1976) のイヌ 16 週間試験

FAS17 においても引用されている上述の Kennedy ら (1976) の報告によれば、4~5 か月齢の純血統ビーグル犬（各群雌雄各 3 匹）について、対照群のほか、表 4（50 頁）のような混餌投与群を設定し、16 週間の投与を行う試験が実施されている。その結果、体重については、④群の雌雄で全投与期間を通じた増加抑制が見られたが、より高用量の⑤群及び⑥群では見られなかったことから、Kennedy らは、この体重増加抑制について生物学的変動を反映したものであるとしている。血液学的検査において、②群及び⑥群の雄で白血球数の増加が見られたが正常値の範囲内であったとされている。血液生化学的検査において、アルカリホスファターゼ活性が⑥群の雌で増加したが、これについて Kennedy らは、大きな変化ではなく、一貫性が見られないことから正常な生物学的変動を反映したものであると推定している。そのほか、②群を含め、一般状態、摂餌量、尿検査、器官重量（肝臓、腎臓、脾臓、生殖器、心臓、脳、副腎及び甲状腺）並びに剖検及び病理組織学的検査において被験物質の投与に関連した変化は認められなかったとされている。以上より、Kennedy らは、代謝物又は不純物として生じた OSBA による毒性ハザードはほとんどないと結論している（参照 10、93）。本委員会としては、Kennedy らの結論を是認し、サッカリン類の代謝物又は不純物としての OSBA による毒性ハザードはないと判断した。

#### d. CBSA 及び CBSA-NH<sub>4</sub>

##### (a) Kennedy ら (1976) のラット 13 週間試験

FAS17 においても引用されている上述の Kennedy ら (1976) の報告

によれば、離乳SDラット（各群雌雄各10匹）について、対照群のほか、表4（50頁）のような混餌投与群を設定し、13週間の投与を行う試験が実施されている。その結果、⑥群の雄1匹が投与2週に死亡したが、これは呼吸器感染によるものと推定されている。血液学的検査において、③群の雄で白血球数の増加が見られたが正常値の範囲内であったとされている。そのほか、一般状態、体重、摂餌量、血液生化学的検査、尿検査、器官重量（肝臓、腎臓、脾臓、生殖器、心臓及び脳）並びに剖検及び病理組織学的検査において被験物質の投与に関連した変化は認められなかったとされている。以上より、Kennedyらは、代謝物又は不純物として生じた $\sigma$ -CBSA-NH<sub>4</sub>による毒性ハザードはほとんどないと結論している（参照10、93）。本委員会としては、Kennedyらの結論を是認し、サッカリン類の代謝物又は不純物としての $\sigma$ -CBSA-NH<sub>4</sub>による毒性ハザードはないと判断した。

(b) Kennedyら（1976）のイヌ16週間試験

FAS17においても引用されている上述のKennedyら（1976）の報告によれば、4～5か月齢の純血統ビーグル犬（各群雌雄各3匹）について、対照群のほか、表4（50頁）のような混餌投与群を設定し、16週間の投与を行う試験が実施されている。その結果、体重については、④群の雌雄で全投与期間を通じた増加抑制が見られたが、より高用量の⑤群及び⑥群では見られなかったことから、Kennedyらは、この体重増加抑制について生物学的変動を反映したものであるとしている。血液学的検査において、⑥群の雄で白血球数の増加が見られたが正常値の範囲内であったとされている。血液生化学的検査において、アルカリホスファターゼ活性が⑥群の雌で増加したが、これについてKennedyらは、大きな変化ではなく、一貫性が見られないことから正常な生物学的変動を反映したものであると推定している。そのほか、②群を含め、一般状態、摂餌量、尿検査、器官重量（肝臓、腎臓、脾臓、生殖器、心臓、脳、副腎及び甲状腺）並びに剖検及び病理組織学的検査において被験物質の投与に関連した変化は認められなかったとされている。以上より、Kennedyらは、代謝物又は不純物として生じた $\sigma$ -CBSA-NH<sub>4</sub>による毒性ハザードはほとんどないと結論している（参照10、93）。本委員会としては、Kennedyらの結論を是認し、サッカリン類の代謝物又は不純物としての $\sigma$ -CBSA-NH<sub>4</sub>による毒性ハザードはないと判断した。

e. BIT

(a) EPAレビュー（1993）でのラット90日間試験

EFSA科学パネル意見書（2006）において引用されたEPAレビュー（1993）の内容によれば、ラット成獣（各群雌雄各12匹）にBIT（0、200、900、4,000ppm）を90日間混餌投与する試験が実施されている。通常のバッテリーによって検査及び観察が行われた結果、毒性学的に意義のある所見は、(i) 900ppm以上の投与群の雄及び4,000ppm投与群の雌に認められた投与期間を通じた体重の低値並びに(ii) 4,000ppm投与群の雌雄（いずれも11/12匹）に認められた前胃境界縁の過形成であるとされている。900ppm投与群については、前胃の過形成は認められな

かったが、剖検において雌雄各 1 匹に境界線の肥厚が見られたとされている。EPA レビューの中では、本試験における NOEL は雄で 200ppm (15.3 mg/kg 体重/日相当)、雌で 900ppm (78 mg/kg 体重/日相当) とされている (参照 18)。本委員会としては、EPA レビューの結論を是認し、体重の低値を基に、本試験における NOAEL を雄で 200ppm (15.3 mg/kg 体重/日相当)、雌で 900ppm (78 mg/kg 体重/日相当) と評価した。

(b) SCCNFP (2004) のラット 28 日間試験

EFSA 科学パネル意見書(2006)においても引用されている SCCNFP (2004) の報告書によれば、Wistar ラット (各群雌雄各 6 匹) に BIT (BIT として 0、12.63、37.89、113.67 mg/kg 体重/日) を 28 日間反復強制経口投与 (胃内挿管) する試験 (OECD TG407) が実施されている。その結果、一般状態については、113.67 mg/kg 体重/日投与群の雄の全動物で投与 17 日以降、雌の 2 匹で投与 20 日以降に被験物質の投与に関連した流涎が認められたが、回復期には認められなかったことから、この流涎は可逆性の変化であることが示唆されている。体重については、113.67 mg/kg 体重/日投与群の雄で、投与 2 週以降に増加抑制、回復期に低値が認められ、雌でも投与 4~6 週に低値が認められたとされている。37.89 mg/kg 体重/日投与群 (雌雄の区別なし) に前胃の病変が見られ、被験物質の刺激による影響と考えられたが、対照群及び他の投与群に前胃の病変は認められなかったとされている。そのほか、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、神経系への影響に係る検査、器官重量並びに剖検及び病理組織学的検査において被験物質の投与に関連した変化は認められなかったとされている。SCCNFP 報告書では、本試験における NOAEL (雌雄の区別なし) は 12.63 mg/kg 体重/日であるとされている (参照 18、71)。本委員会としては、原著 (未公表) を確認することができないが、SCCNFP の報告書での結論を是認し、本試験における NOAEL を雌雄ともに 12.63 mg/kg 体重/日と評価した。

(c) SCCNFP (2004) のラット 90 日間試験

EFSA 科学パネル意見書(2006)においても引用されている SCCNFP (2004) の報告書によれば、Wistar ラット (各群雌雄各 10 匹) に BIT (BIT として 0、8.42、25.26、63.15 mg/kg 体重/日) を 90 日間反復強制経口投与 (胃内挿管) する試験 (OECD TG408) が実施されている。その結果、摂餌量については、25.26 mg/kg 体重/日以上投与群の雌及び 63.15 mg/kg 体重/日投与群の雄で低下が認められたとされている。剖検及び病理組織学的検査においては、25.26 mg/kg 体重/日投与群 (雌雄の区別なし) の主として前胃に病変が認められたとされており、被験物質の投与に関連したものであるが可逆性のもと考えられている。いずれも被験物質の刺激性によるものとされている。そのほか、一般状態、体重、血液学的検査、血液生化学的検査、精子検査、神経系への影響に係る検査及び器官重量において被験物質の投与に関連した変化は認められなかったとされている。SCCNFP 報告書では、本試験における

NOAEL (雌雄の区別なし) は 8.42 mg/kg 体重/日であるとされている (参照 18、71)。本委員会としては、原著 (未公表) を確認することができないが、SCCNFP の報告書での結論を是認し、本試験における NOAEL を雌雄ともに 8.42 mg/kg 体重/日と評価した。

f. MA

(a) Hagan ら (1967) のラット 13 週間試験

FAS56 においても引用されている Hagan ら (1967) の報告によれば、離乳 Osborne-Mendel ラット (各群雌雄各 10 匹) に MA (0、0.1、1% ; 0、50、500 mg/kg 体重/日相当) を 13 週間混餌投与する試験が実施されている。その結果、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査並びに剖検及び病理組織学的検査において被験物質の投与に関連した変化は認められなかったとされている (参照 72、131)。JECFA は、本試験における NOEL を 1% (500 mg/kg 体重/日相当) としている (参照 72)。本委員会としては、JECFA の結論を是認し、本試験における NOAEL を、雌雄ともに本試験の最高用量である 1% (500 mg/kg 体重/日) と評価した。

(b) Dow (1967) のラット 115 日間試験

FAS14 における引用によれば、Dow (1967) は、離乳ラット (各群雌雄各 10 匹) に MA (0、0.3、1% ; 約 0、150~300、500~1,000 mg/kg 体重/日相当) を 115 日間混餌投与する試験を実施している。その結果、1% 投与群において肝臓重量及び腎臓重量の高値並びに腎臓の軽微な組織学的変化が認められたとしている。そのほか、生存率、一般状態、体重、血液学的検査及び剖検において被験物質の投与に関連した有害影響は認められなかったとしている。JECFA は、本試験における NOAEL を 0.3% (150~300 mg/kg 体重/日相当) としている (参照 31)。本委員会としては、JECFA の結論を是認し、本試験における NOAEL を雌雄ともに 0.3% (150~300 mg/kg 体重/日) と評価した。

(c) DHEW (1978) のラット 78 週間試験 (参考)

類縁物質に係る試験であるので参考データであるが、FAS14 においても引用されている DHEW (1978) の報告によれば、F344 ラット (各群雌雄各 35 匹) にアントラニル酸 (0、1.5、3.0%) を 78 週間混餌投与する試験が実施されている。その結果、腫瘍発生の増加は認められず、被験物質の投与に関連した非腫瘍性病変も認められなかったとしている。一方、被験物質の投与に関連したごく軽微な体重増加抑制が見られたが、生存率及び一般状態に異常は認められなかったとされている。DHEW は、本試験条件下においてアントラニル酸に発がん性はないと結論している (参照 31、132)。本委員会としては、DHEW の結論を是認し、本試験条件下においてアントラニル酸の投与に起因した発がん性は認められなかったと判断した。

(d) Stoner ら (1973) のマウス 24 週間試験 (参考)

経口投与による試験ではないので参考データであるが、FAS14 にお

いても引用されている Stoner ら (1973) の報告によれば、6~8 週齢の A/He マウス (各群雌 20 匹) に MA (各回用量不詳; 合計投与量 0, 2,250, 11,200 mg/kg 体重) を週 3 回、24 週間反復腹腔内投与し、肺の病理組織学的検査等を行う試験が実施されている。その結果、原発性の腫瘍の発生率の増加は認められず、Stoner らは、本試験条件下において MA の投与による肺腫瘍発生率の増加は認められなかったとしている (参照 3 1、1 3 3)。本委員会としては、Stoner らの結論を是認し、本試験条件下において MA の投与に起因した肺腫瘍発生率の増加はなかったと判断した。

(e) DHEW (1978) のマウス 78 週間試験 (参考)

類縁物質に係る試験であるので参考データであるが、FAS14 においても引用されている DHEW (1978) の報告によれば、B6C3F<sub>1</sub> マウス (各群雌雄各 35 匹) にアントラニル酸 (0, 2.5, 5.0%) を 78 週間混餌投与する試験が実施されている。その結果、腫瘍発生率の増加は認められず、被験物質の投与に関連した非腫瘍性病変も認められなかったとされている。一方、被験物質の投与に関連したごく軽微な体重増加抑制が見られたが、生存率及び一般状態に異常は認められなかったとされている。DHEW は、本試験条件下においてアントラニル酸に発がん性はないと結論している (参照 3 1、1 3 2)。本委員会としては、DHEW の結論を是認し、本試験条件下においてアントラニル酸の投与に起因した発がん性は認められなかったと判断した。

③ 有機酸ナトリウム塩による雄ラット膀胱腫瘍 (参考)

その他の有機酸ナトリウム塩による雄ラット膀胱腫瘍発生率の作用機序について検討した試験成績として以下のような報告がある。

a. クエン酸ナトリウム

Fukushima ら (1986) の報告によれば、6 週齢の F344 ラット (各群雄 20~25 匹) に BBN (0, 0.05%) を 4 週間飲水投与するイニシエーション段階の処置の後に、クエン酸ナトリウム (0, 5%; 0, 2,500 mg/kg 体重/日<sup>(2)</sup>) をプロモーション段階で 32 週間混餌投与する二段階膀胱発がん試験が実施されている。その結果、剖検 (膀胱) において、BBN 処置対照群に非常に小さい病変、BBN 処置クエン酸ナトリウム投与群に大きな腫瘍の発生が見られたが、結石は認められなかったとされている。病理組織学的検査においては、BBN 処置クエン酸ナトリウム投与群の膀胱基底膜の乳頭状/結節状過形成、乳頭腫及び癌の発生率及び個数が BBN 処置対照群よりも有意に増加したとされている。一方、BBN 無処置クエン酸ナトリウム投与群に膀胱粘膜の病変は認められなかったとされている。また、別途 6 週齢の F344 ラット (各群雄 5 匹) にクエン酸ナトリウム (0, 5%) を 16 週間混餌投与する試験が実施されている。その結果、投与 4, 8 及び 16 週での尿検査のいずれにおいても投与群で尿 pH の上昇、リン酸マグネシウムアンモニウム結晶の生成及び尿中ナトリウム排泄量の増加が認められたが、尿中のカルシウムイオン及びマグネシウムイオン濃度に変化はなかったとされている。Fukushima らは、本試験において認め



られたクエン酸ナトリウムによる膀胱発がんプロモーション作用は尿 pH 上昇、尿中結晶生成及び尿中ナトリウムイオン濃度が関係していると推定している（参照 134）。本委員会としては、Fukushima らの結論を是認し、本試験条件下においてクエン酸ナトリウムの投与に起因する膀胱発がんプロモーション作用があったと判断した。

#### b. グルタミン酸ナトリウム

de Groot ら（1988）の報告によれば、離乳 Wistar ラット（各群雄 10 匹）について、対照群のほか、グルタミン酸ナトリウム 6%、グルタミン酸ナトリウム 6%+炭酸水素ナトリウム 1.6%、グルタミン酸ナトリウム 6%+塩化アンモニウム 1.0%又は炭酸水素カリウム 2.5%を混餌投与する群を設定し、穀物ベース飼料又はカゼインベース配合飼料を用いて 13 週間投与を行う試験が実施されている。その結果、膀胱移行上皮過形成の発生率は、穀物ベース飼料混餌による対照群で 2/10 匹、グルタミン酸ナトリウム 6%投与群で 4/10 匹及びグルタミン酸ナトリウム 6%+炭酸水素ナトリウム 1.6%投与群で 2/10 匹であったのに対し、アルカリ化剤である炭酸水素カリウム 2.5%投与群で 7/10 匹と有意な増加が認められたとされている。一方、カゼインベース配合飼料混餌によるグルタミン酸ナトリウム 6%投与群では 1/10 匹、それ以外の投与群ではいずれも 0/10 匹であった。なお、カゼインベース配合飼料混餌投与群の尿 pH は、穀物ベース飼料混餌投与群よりも低かったことから、穀物ベース飼料はカゼインベース配合飼料よりも過剰塩基を多く含んでいたとされている。また、別途離乳 Wistar ラット（各群雄 10 匹）に炭酸水素カリウム（0、5%）を穀物ベース飼料又はカゼインベース配合飼料を用いて 13 週間混餌投与する試験が実施されている。その結果、膀胱移行上皮過形成の発生率は、カゼインベース配合飼料混餌投与群で 6/10 匹、穀物ベース飼料混餌投与群で 10/10 匹と、後者に有意な高値が認められたとされている。以上より de Groot らは、飼料の酸塩基バランスを操作することによりラット膀胱移行上皮過形成を誘発することができると結論している（参照 135）。本委員会としては、de Groot らの結論を是認し、飼料の酸塩基バランスの操作によりラット膀胱移行上皮過形成を誘発することができると判断した。

#### c. コハク酸ナトリウム

Otoshi ら（1993）の報告によれば、6 週齢の F344 ラット（BBN 処置各群雄 16 匹、BBN 無処置各群雄 8 匹）に BBN（0、0.05%）を 4 週間飲水投与するイニシエーション段階の処置の後に、コハク酸、コハク酸ナトリウム又はコハク酸二ナトリウム（0、5%；0、2,500 mg/kg 体重/日<sup>(2)</sup>）をプロモーション段階で 32 週間混餌投与する二段階膀胱発がん試験が実施されている。その結果、投与終了後（投与開始 36 週後）の尿 pH は、BBN 処置対照群及び BBN 処置コハク酸投与群で 6.69 及び 6.03 であったのに対し、BBN 処置コハク酸ナトリウム投与群及び BBN 処置コハク酸二ナトリウム投与群では 8.06 及び 8.16 とほぼ同様の高値であったが、尿中ナトリウム濃度は 229 mEq/L 及び 335 mEq/L と BBN 処置コハク酸二ナトリウム投与群で統計学的に有意に高かったとされている。BBN 無処置群には前腫瘍性病変（乳頭状/結節状過形成）及び膀胱腫瘍（乳頭腫及び癌）

の発生は認められなかったが、BBN 処置コハク酸ナトリウム投与群及び BBN 処置コハク酸二ナトリウム投与群では前腫瘍性病変及び膀胱腫瘍の発生率及び個数が有意に増加したとされている。膀胱腫瘍の発生率については、BBN 処置コハク酸ナトリウム投与群と BBN 処置コハク酸二ナトリウム投与群との間で差が見られなかったが、BBN 処置コハク酸二ナトリウム投与群の膀胱腫瘍の表面積は BBN 処置コハク酸ナトリウム投与群のそれよりも有意に大きかったとされている。この膀胱腫瘍表面積については、ナトリウム摂取量との関連性が認められたとされている。Otoshi らは、尿 pH が同一の条件下では、膀胱腫瘍の増大は尿中ナトリウム濃度に関連するとしている（参照 136）。本委員会としては、Otoshi らの結論を是認し、膀胱腫瘍の増大は尿中ナトリウム濃度に関連すると判断した。

#### ④ トリプトファン蓄積～インドール類過剰排泄

IARC73 における引用によれば、Sims & Renwick (1983) は、雄 SD ラットに、サッカリンナトリウム (0~10% ; 0~5,000 mg/kg 体重/日相当)、トリプトファン 2% 又はトリプトファン 2%+サッカリンナトリウム 5% を 1~2 か月間混餌投与し、膀胱癌がんの機序を探索する試験を実施している。その結果、サッカリンナトリウムの投与に関連したインジカン (インドールの代謝物) の尿中排泄量の増加が認められ、サッカリンナトリウム 10% 投与群では 24 時間尿中排泄量が 3.1 倍に増加したとしている。また、盲腸壁重量及び盲腸内容物重量の用量依存性の増加、盲腸中インドール類濃度の増加が認められたとしている。Sims & Renwick は、盲腸中のたん白質及びトリプトファンの蓄積によるものと推定しており、サッカリンナトリウムが腸内におけるたん白質の消化に作用し、腸内細菌叢による食餌中トリプトファンのインドール類 (膀胱癌がん補助物質) への変換を促進し、それが膀胱腫瘍発生に寄与するという仮説に合致するものであったとしている。また、Lawrie ら (1985) は、雄ラットにサッカリンナトリウム (7.5% ; 3,750 mg/kg 体重/日相当) を 40 日間混餌投与したところ、インジカンのほか、チロシンの腸内細菌叢による代謝物である *p*-クレゾールの尿中排泄量が用量に依存して増加したとしている。(参照 5)

IARC73 における引用によれば、Sims & Renwick (1985) は、雌雄 SD ラットにサッカリンナトリウム (7.5% : 3,750 mg/kg 体重/日相当) を交配 6 週間前から混餌投与する試験を実施している。その結果、得られた児動物は、哺育期間中の乳汁を経由してより高濃度のインジカンに暴露されたとしている。また、児動物においては、盲腸の拡張、盲腸中たん白質量、尿量及び尿中インジカン排泄量の増加並びに盲腸中トリプトファンナーゼ活性の低下が認められたが、これらの変化に性差は見られなかったとしている。別途、母動物にサッカリンナトリウムを出産後から混餌投与した群の児動物においては、上記の変化と一貫性のある変化は見られず、変化にばらつきが見られたとしている。これについて Sims & Renwick は、トリプトファンナーゼ活性のばらつきによるものであるとしている。(参照 5)

IARC73 及び FAS32 における引用によれば、Anderson ら (1988) (再掲) は、離乳雄 SD ラットにサッカリンナトリウム (5% ; 2,500 mg/kg 体重相当)

又は等モルのサッカリンカルシウム、サッカリン若しくはサッカリンカリウムを 10 週間混餌投与した後の盲腸重量及び盲腸+内容物の重量の増加に各群間で差は認められなかったとしている。(参照 5、23)

IARC73 における引用によれば、Roberts & Renwick (1985) は、ヒト 15 例にサッカリンナトリウム (0、1,000 mg/人/日) を 1 か月間経口摂取させ、摂取前、摂取中及び摂取後の尿を検査したところ、尿中インジカン排泄量は対照群及び投与群ともに大きくばらつき、サッカリンナトリウム投与の影響を受けなかったとしている。(参照 5)

IARC ワーキンググループは、Shoenig & Anderson (1985) によってサッカリンナトリウムを投与した雌は雄よりも盲腸重量が増加すること、Anderson ら (1988) によってサッカリンナトリウム以外のサッカリン類によっても盲腸重量が増加することが明らかにされたことから、サッカリンナトリウム投与によってたん白質代謝が変化し、トリプトファンが蓄積し、それが腸内細菌叢で変換されて尿中に排泄されたインドール類が膀胱癌を促進するという Sims & Renwick の仮説では、サッカリンナトリウムによるラット膀胱の腫瘍発生における性差及びカチオン特異性を説明することができないと結論している。(参照 5)

本委員会としては、IARC ワーキンググループの結論を是認し、サッカリンナトリウムの投与によってたん白質の代謝が変化し、トリプトファンが蓄積し、それが腸内細菌叢で変換されて生成したインドール類が尿中に排泄され膀胱癌を促進するという仮説のみでは、ラット膀胱の腫瘍発生における性差及びカチオン特異性を説明することができないと判断した。

#### ⑤ 反復投与毒性及び発がん性のまとめ

サッカリンナトリウムを 5% の濃度で混じた飼料を二世代にわたり SD ラットに投与する二つの試験では、いずれにおいても  $F_1$  雄 (一方の試験では 32 日齢から投与を開始した  $F_0$  雄も) に膀胱移行上皮癌又は膀胱移行上皮乳頭腫を含めた腫瘍の発生が有意な頻度で認められ、別の二世代にわたる試験においても 4.0% 以上の投与群及び 7.5% 投与群の  $F_1$  雄に膀胱腫瘍が有意な頻度で発生したことから、少なくとも胎児又は若齢児動物の段階からのサッカリンナトリウムの投与によって雄ラット膀胱に発がん性が認められることは明らかである。一方、同時に試験が実施された雌ラットでは、子宮の扁平上皮癌又は膀胱移行上皮癌の発生の報告はあるものの、いずれも有意な頻度ではなく、また、有意な頻度で認められた膀胱の単純過形成病変は前がん病変ではないことから、サッカリンナトリウムの膀胱発がん性は雄ラットにのみ認められるものと考えられた。

また、サッカリンナトリウムは、イニシエーション処置をした雄ラット膀胱粘膜に対して、発がんプロモーション作用を有することが報告されているが、雌ラットに対しては認められていない。さらに、ラット膀胱上皮への発がんプロモーション作用はサッカリンナトリウムの投与においてのみ観察され、サッカリンカルシウム及びサッカリンの投与においては観察されていない。

発がん又は発がんプロモーション作用機序に関与していると考えられる膀胱上皮の細胞増殖活性の上昇は、サッカリンナトリウムの投与により誘発されるものの、尿中にサッカリンイオンが存在するのみでは誘発されず、混合する基礎飼料の性状に影響され、サッカリンナトリウム以外のナトリウム塩の投与によっても誘発される変化であった。

これまでの結果から、サッカリンナトリウムの雄ラット膀胱発がんの作用機序は、尿中ナトリウム濃度、尿 pH、雄ラット特有の尿中たん白、結晶尿等の関与が示唆される。しかし、ラット以外の動物種については明らかな発がん性を示す結果は得られておらず、雄ラットについても系統による感受性の差があり、その膀胱発がんは尿中のサッカリンイオンそのものの影響ではないことが示されていることから、サッカリンナトリウムの雄ラット膀胱発がん結果はヒトに外挿できないものと考えた。

一方、その他の毒性として、胎児の段階から長期間投与されたラットを用いた二世世代にわたる試験において、サッカリンナトリウム 3.0% 投与群の雌雄で摂餌量の低下を伴わない体重増加抑制及び同腹生存胎児数の減少が認められており、これらの変化を投与に起因する毒性と考え、その下の用量である 1.0% (500 mg/kg 体重/日；サッカリンとして 380 mg/kg 体重/日) を NOAEL とした。

また、PTSA 以外のサッカリン類の不純物については、膀胱への影響は報告されていない。PTSA についての試験成績では、最低用量の 120 mg/kg 体重/日投与群から雌雄ラットの膀胱粘膜で炎症性傷害像が認められたことから、NOAEL は 120 mg/kg 体重/日を下回る用量であると評価した。しかしながら、M 法で製造されたサッカリンナトリウムについての試験及びそれよりも PTSA が多く含まれると考えられる RF 法で製造されたサッカリンナトリウムについての試験のいずれにおいても雌ラットに特段の変化が認められていないことから、120 mg/kg 体重/日を投与した際に雌雄ラットで認められる毒性変化は、サッカリン投与試験における混入物として評価した場合には認められないものと考えた。PTSA 以外のサッカリン類の不純物の NOAEL については、いずれも長期試験に係るものではないが、OTSA が雌雄ともに 20 mg/kg 体重/日、OSBA 及び CBSA-NH<sub>4</sub> が雌雄ともに 1,000 mg/kg 体重/日超、BIT が雌雄ともに 8.42 mg/kg 体重/日、MA が雌雄ともに 150~300 mg/kg 体重/日と評価した。

#### (4) 生殖発生毒性

##### ① サッカリン類

サッカリンカルシウムを被験物質とした生殖発生毒性に関する試験成績としては、IARC73 において Adkins ら (1972) の抄録報告 (ラット及びハムスターにサッカリンカルシウム (10、100 g/日) を投与する催奇形性試験) が引用されている (参照 5) が、その詳細を確認することは出来なかった。その他のサッカリン類を被験物質とした生殖発生毒性に関する試験成績として以下のような報告がある。

##### a. ラット

##### (a) Lessel (1971) のラット生殖発生毒性試験

Lessel (1971) の報告によれば、妊娠 Boots-Wistar ラット (各群 6

四) にサッカリンナトリウム (0, 6,000 mg/kg 体重/日) を妊娠 1~20 日に反復投与 (投与経路不詳) し、妊娠 21 日に帝王切開を行う試験が実施されている。その結果、投与開始初期に母動物の体重増加抑制が認められたが、胎児生存率、同腹生存胎児数及び胎児体重に被験物質の投与に関連した変化は認められず、胎児の病理組織学的検査結果は正常であり、被験物質に催奇形性は認められなかったとされている。また、別の群 (対照群 12 匹、投与群 9 匹) を設けて、サッカリンナトリウム (0, 6,000 mg/kg 体重/日) を、妊娠期間中を通して反復投与 (投与経路不詳) し、自然分娩させ、出産後は投与をやめ、得られた児動物が離乳するまで観察を行う試験が実施されている。その結果、出生率、同腹生存児動物数、離乳時児動物生存率及び離乳時児動物体重に被験物質の投与による影響は認められず、児動物に奇形は認められなかったとされている。さらに、生殖能力の確認されたラット (各群雄 10 匹、雌 20 匹) にサッカリン (0, 1%) を 60 日間混餌投与した後に交配する試験が実施されており、妊娠率及び出産時の同腹生存児動物数に对照群と投与群との間で差は認められなかったとされている。(参照 87)

#### (b) Tanaka ら (1973) のラット発生毒性試験

Tanaka ら (1973) の報告によれば、10~12 週齢の妊娠 Wistar ラット (各群 20 匹) にサッカリンナトリウム (純度不詳) (0, 480, 950, 1,900, 3,800 mg/kg 体重/日<sup>41)</sup>) を妊娠 7~13 日の 7 日間反復強制経口投与 (胃内挿管) し、妊娠 20 日に各群 15 匹を帝王切開し、残る各群 5 匹については自然分娩させ、得られた児動物を 3 週間観察した後に殺す発生毒性試験が実施されている。

その結果、母動物については、3,800 mg/kg 体重/日投与群で投与開始後一時的な体重増加抑制及び摂餌量の減少が見られたほかは妊娠期間中に毒性兆候は認められなかったとされている。また、帝王切開した母動物では、胎児を含む子宮重量、胎盤重量、黄体数、着床数及び着床率に对照群と投与群との間で差は認められず、胎盤遺残が散見されたものの、用量相関性はなく、すべて对照群の背景データの範囲内であったとされている。

帝王切開群の胎児については、被験物質の投与に関連した死亡率及び発育遅延の増加はなく、对照群を含む全群で同腹生存胎児数は同様であり、外表・内臓奇形を有する胎児は認められなかったとされている。骨格検査では、投与群に中手骨数及び尾椎骨数のわずかな増加が見られたが、对照群の背景データの範囲内であり、足根骨数及び胸骨分節形状に对照群と投与群との間で顕著な差はなく、そのほか对照群を含む全群で通常は見られないような奇形はなかったとされている。

自然分娩群の出生児については、母動物の妊娠期間、体重増加、離乳率及び器官重量に对照群と投与群との間で差はなく、对照群を含む全群の児動物に離乳時の行動異常は認められなかったとされている。950 mg/kg 体重/日投与群の 1 匹に腰肋骨の発生が見られたが、对照群を含

<sup>41</sup> 別途実施した 2 週間反復経口投与毒性試験結果及び妊娠 13 日の単回経口投与急性毒性試験結果 (LD<sub>50</sub>: 9,510 mg/kg 体重) を基に設定したとされている。

む全群において外表、内臓及び骨格の奇形は認められなかったとされている。(参照137)

(c) Taylor & Friedman (1974) のラットを用いた三世代にわたる生殖発生毒性試験

FAS17における引用によれば、Taylor & Friedman (1974) は、ラットにRF法で製造されたサッカリンナトリウム(純度不詳)(0<sup>(42)</sup>、0.01、0.1、1.0、5.0、7.5% ; 0、5、50、500、2,500、3,750 mg/kg 体重/日<sup>(2)</sup>)を三世代にわたって混餌投与する試験を実施している。その結果、F<sub>1a</sub>児動物については、5.0%以上の投与群の体重が雄で12~20%、雌で17~29%低かったが、投与の経過に従って雌雄ともに他群との差は見られなくなったとしている。F<sub>2a</sub>世代については、胎児期の受胎率及び新生児期の生存率は被験物質の投与による影響を受けなかったが、5.0%以上の投与群の胎児期の平均同腹生存胎児数は若干減少し、離乳時の生存率及び体重並びに離乳率は低値であったとしている。F<sub>2b</sub>世代については、5.0%以上の投与群の離乳時体重が低値であったとしている(参照10)。本委員会としては、本試験におけるNOAELを1.0% (500 mg/kg 体重/日)と評価した。

(d) Tisdellら(1974)のラットを用いた二世代にわたる試験(再掲)

IARC73及びFAS17においても引用されているTisdellら(1974)の報告によれば、離乳SDラット(F<sub>0</sub>)にRF法で製造されたサッカリンナトリウム(純度不詳<sup>(18)</sup>)(0、0.05、0.5、5% ; 0、25、250、2,500 mg/kg 体重/日<sup>(2)</sup>)を混餌投与(飼料:Purina Lab Chow)し、その後交配し、雌については妊娠及び哺育期間中も投与を継続し、得られた児動物(F<sub>1</sub>) (各群雌雄各20匹)には離乳後最長100週間F<sub>0</sub>と同様の投与を行い、F<sub>1</sub>における腫瘍発生等を観察する試験が実施されている。その結果、F<sub>1</sub>児動物の5%投与群で離乳時体重の顕著な増加抑制が認められたほかは生殖発生毒性に係る異常は認められなかったとされている。(参照5、10、90)

(e) Lederer & Pottier-Arnould (1973) 及び Lederer (1977) のラット発生毒性試験

IARC22においても引用されているLederer & Pottier-Arnould (1973)の報告によれば、妊娠Wistarラット(対照群21匹、投与群13匹)にサッカリン(0、0.3%)を妊娠前から妊娠期間中を通じて混餌投与し、妊娠20日に帝王切開し、胎児の水晶体、網膜及び視神経の組織学的検査を行う試験が実施されている。その結果、水晶体の形態学的変化が、対照群の胎児17/137匹に見られたのに対し、投与群の胎児26/79匹に見られたとされている。また、IARC22においても引用されているLederer (1977)の報告によれば、妊娠Wistarラット(対照群52匹、投与群13~35匹)について、対照群のほか、M法により製造されたサッカリン(0.15、0.3、3% ; 75、150、1,500 mg/kg 体重/日<sup>(2)</sup>)

<sup>42</sup> 基礎飼料に、サッカリンナトリウム6%相当量のナトリウムを炭酸ナトリウムとして添加したものとされている。

又はRF法により製造されたサッカリン (0.3、3% ; 150、1,500 mg/kg 体重/日<sup>(2)</sup>) を混餌投与する群を設定し、妊娠期間中を通じて投与し、妊娠9日及び20日に帝王切開を行い、胚の吸収、胎児体重及び胎盤重量の観察並びに胎児の水晶体、網膜及び視神経の組織学的検査を行う試験が実施されている。その結果、0.3%以上のRF法製サッカリン投与群及び3%以上のM法製サッカリン投与群で胚吸収率の増加が認められたとされている。また、0.3%以上のRF法製サッカリン投与群で胎盤重量の増加並びに胎児の水晶体、網膜及び視神経の形態学的変化に係る指数の高値が認められたとされている。Ledererは、水晶体等の形態学的変化について不純物が原因ではないかと考察している(参照32、138、139)。IARC22では、本試験成績について、対照群でも変化が認められていることから、組織学的検査上のアーチファクトである可能性を排除できないとされている(参照32)。本委員会としても、水晶体等の形態学的変化が認められたとする本試験成績について、組織学的検査上のアーチファクトである可能性を排除することができないものと評価した。

(f) Arnoldら(1979)のラットを用いた二世世代にわたる試験

Arnoldら(1979)の報告によれば、平均体重175gのSDラット(F<sub>0</sub>) (各群雄雌各50匹)にサッカリンナトリウム(0、5%)を100日間混餌投与した後に雌雄を1:1で交配し、雌については妊娠、出産及び哺育期間中も投与を継続し、得られた児動物(F<sub>1</sub>)についても離乳後から親動物と同様の混餌投与を行い、F<sub>1</sub>各群各腹2匹計30匹の雄を生後8日又は21日にと殺し、残りのF<sub>1</sub>児動物については生後105日にと殺する試験が実施されている。その結果、F<sub>0</sub>の生殖に係るパラメータやF<sub>1</sub>の生存児数、生後4日体重並びに生後8日、21日及び105日の尿路の剖検及び病理組織学的検査において被験物質の投与に関連した変化は認められなかったとされている。(参照140)

(g) Taylorら(1980)のラットを用いた二世世代にわたる試験(再掲)

IARC73及びFASI7においても引用されている上述のTaylorら(1980)の報告によれば、離乳SDラット(F<sub>0</sub>) (各群雄10匹、雌20匹)に、RF法で製造されたサッカリンナトリウム(純度不詳、OTSA約350ppmを含有)(0、0.01、0.1、1.0、5.0、7.5% ; 0、5、50、500、2,500、3,750 mg/kg体重/日相当)を交配(約10週齢時)、妊娠及び出産を経て児動物の離乳まで混餌投与した後にと殺し、得られた児動物(F<sub>1</sub>) (各群雌雄各48匹)についても離乳後から各投与群で生存率が20%になるまでF<sub>0</sub>と同様の混餌投与を行い、対照群の生存率が20%になった時点で全生存動物をと殺する試験が実施されている。その結果、上述のとおりF<sub>1</sub>の5.0%以上の投与群の雌雄の離乳時に体重の低値が見られ、その後もF<sub>1</sub>の7.5%投与群の雄に体重増加抑制が認められたが、摂餌効率に影響は認められなかったとされている。(参照5、10、96)

(h) Arnoldら(1980)のラットを用いた二世世代にわたる試験(再掲)

IARC73 及び FAS17 においても引用されている上述の Arnold ら (1980) の報告によれば、32 日齢の SD ラット ( $F_0$ ) (各群雌雄各 50 匹) に M 法で製造されたサッカリンナトリウム (水溶性不純物 40~50ppm、OTSA 0.05ppm 未満を含有) (0、5% ; 0、2,500 mg/kg 体重/日相当) を混餌投与し、投与開始 90 日後に各群内で雌雄を 1:1 で 1 週間交配し、妊娠、出産及び哺育を経て 142 週まで投与を継続した後にと殺するとともに、得られた児動物 ( $F_1$ ) (各群雌雄各 49~50 匹) についても、生後 21 日に離乳後、 $F_0$  と同様の投与を 127 週まで継続した後にと殺する試験が実施されている。その結果、 $F_0$  の生殖に係るパラメータ (受精率、妊娠率、生存胎児数及び胎児体重) において被験物質の投与に関連した変化は認められなかったとされている。なお、上述のとおり  $F_1$  の 5% 投与群の雌雄で被験物質の投与に関連した体重増加抑制が認められたとされている。(参照 5、10、97)

(i) Colson ら (1984) のラット発生毒性試験

Colson ら (1984) の報告によれば、妊娠 Wistar ラット (各群 20 匹) について、対照群のほか RF 法製サッカリンナトリウム (0.3、3%)、精製 RF 法製サッカリンナトリウム (0.3、3%)、RF 法製サッカリンアンモニウム (0.3、3%) 又は M 法製サッカリン (0.15、0.3、3%) を混餌投与する群を設定し、妊娠 0 日から投与を開始し、妊娠 20 日に帝王切開を行い、胎児の眼球奇形等の程度 (催奇形指数) 及び発生率を見る試験が実施されている (参照 141)。本委員会としては、本報告については試験の詳細が不明であり、本報告の試験成績に基づいて NOAEL を評価することはできないと判断した。

b. マウス

(a) Tanaka ら (1973) のマウス発生毒性試験

Tanaka ら (1973) の報告によれば、8~10 週齢の妊娠 ICR マウス (各群 10 匹) にサッカリンナトリウム (純度不詳) (0、62.3、125、250、500、1,000 mg/kg 体重) を妊娠 6 日に単回強制経口投与 (胃内挿管) し、妊娠 18 日に帝王切開する発生毒性試験が実施されている。その結果、母動物については、妊娠中の体重増加に対照群と投与群との間で差はほとんどなく、一般状態について異常が認められた動物はおらず、胎児を含む子宮重量、胎盤重量及び着床数に対照群と投与群との間で差は認められなかったとされている。胎児については、生存胎児数、死亡率並びに生存胎児の体重、体長及び尾長に対照群と投与群との間で差は認められなかったとされている。Tanaka らは、本試験において被験物質の投与に関連した胚/胎児に対する影響は認められなかったとしている。(参照 137)

(b) Kroes ら (1977) のマウスを用いた七世代にわたる試験 (再掲)

IARC73 及び FAS17 においても引用されている上述の Kroes ら (1977) の報告によれば、 $F_{1a}$  のほか  $F_{2b}$  についても離乳後にと殺し、 $F_{3c}$  及び  $F_{4b}$ ~ $F_{6b}$  については妊娠 20 日の胎児の時点で取り出し、生殖発生毒性に係る試験が実施されている。その結果、個別世代の対照群と



投与群との間で有意差の見られた生殖発生に係るパラメータが散見されたが、いずれも世代間で一貫性のある変化ではなく、被験物質の投与に関連したものではないとされている。さらに、F<sub>6b</sub>については、骨格異常及び内臓異常の検査が行われ、被験物質の投与に関連した異常は認められなかったとされており、被験物質（サッカリン）に催奇形性は認められなかったとされている。Kroesらは、本試験において被験物質（サッカリン）の投与に関連した胚/胎児に対する影響は認められなかったと結論している。（参照5、10、118）

(c) Dropkinら（1985）のマウス発生毒性試験

IARC73における引用によれば、Dropkinら（1985）は、妊娠 ICR マウス（対照群 10 匹、各投与群 5 匹）にサッカリンナトリウムを(i) 妊娠 10 日に単回腹腔内投与（0、500、1,000、2,000 mg/kg 体重）、(ii) 妊娠 5～15 日に反復強制経口投与（胃内挿管）（0、5、10、25 mg/kg 体重/日）又は(iii) 妊娠 0～17 日に飲水投与（0、5、10、20%）し、妊娠 17 日に帝王切開して胎児の生存、成長及び奇形を見る発生毒性試験を実施している。その結果、25 mg/kg 体重/日反復強制経口投与群の胚吸収率（5/52）が対照群（7/125）よりもわずかに増加傾向にあったが、統計学的に有意な変化ではなかったとしている。全胎児中唯一の奇形は、25 mg/kg 体重/日反復強制経口投与群の 1 匹に認められた口蓋裂であったとしている（参照5）。本委員会としては、本試験については用いた動物数が少ないことから、本試験における NOAEL を正確に評価することはできないと判断した。

(d) Seidenbergら（1986）のマウス発生毒性試験

IARC73における引用によれば、Seidenbergら（1986）は、ICR マウス母動物にその短期試験での MTL に相当する用量のサッカリン（化学形不詳）を強制経口投与したところ、児動物の生存率、成長及び形態に影響は見られなかったとしている。（参照5）

(e) NTP（1997）のマウスを用いた二世世代にわたる試験

IARC73における引用によれば、NTP（1997）は、CD-1 マウスにサッカリンナトリウム（0、1.25、2.5、5%；0、3,500、5,900、8,100 mg/kg 体重/日相当）を二世世代にわたって飲水投与する試験を実施している。その結果、死亡率については、F<sub>0</sub>の5%投与群で有意な増加が認められたとしている。摂水量については、F<sub>0</sub>の5%投与群で10～20%減少した一方、F<sub>0</sub>の1.25%及び2.5%投与群ではそれぞれ20%及び40%増加しており、F<sub>0</sub>の5%投与群の死亡率増加は脱水によるものであるとしている。5%投与群において生存児数の減少及び児数で調整したF<sub>1</sub>胎児体重の減少が認められたとしている。さらに、F<sub>1</sub>の対照群及び2.5%投与群について投与を継続し、交配を行ったところ、摂水量の増加が見られたが、被験物質の投与に関連した生殖能への影響は認められなかったとしている（参照5）。本委員会としては、本試験における NOAEL を2.5%（5,900 mg/kg 体重/日）と評価した。

c. ウサギ

(a) Lessel (1971) のウサギ発生毒性試験

Lessel (1971) の報告によれば、妊娠ウサギ (週齢不詳) (対照群 7 匹、投与群 8 匹) にサッカリンナトリウム (0、600 mg/kg 体重/日) を妊娠 1~29 日に反復投与 (投与経路不詳) し、妊娠 30 日に帝王切開する試験が実施されている。その結果、投与開始初期に母動物の体重増加抑制が認められたが、胎児生存率、同腹生存胎児数及び胎児体重に被験物質の投与に関連した変化は認められず、胎児の病理組織学的検査結果は正常であり、被験物質に催奇形性は認められなかったとされている。(参照 87)

d. *In vitro* 試験

(a) Kitchen & Ebron (1983) のラット胚試験

IARC73 における引用によれば、Kitchen & Ebron (1983) は、妊娠 10.5~12.5 日のラット胚をサッカリン (1mM) に暴露させる *in vitro* 試験を実施しており、代謝活性化系の有無にかかわらず胚の成長及び形態に影響は認められなかったとしている。(参照 5)

(b) Pratt & Willis (1985) の初代培養ヒト胚細胞株を用いた試験

IARC73 における引用によれば、Pratt & Willis (1985) は、初代培養ヒト胚口蓋間充織細胞株を用いた *in vitro* 試験系で、サッカリンナトリウムの 50%増殖抑制濃度は 5.35 mg/mL (26 mM) であり、当該試験系で 1 mM 未満のサッカリンナトリウムに催奇形性が示唆されたとしたが、Steele ら (1988) は、多施設間において初代培養ヒト胚口蓋間充織細胞株の増殖試験等を行ったところサッカリンの催奇形性を示唆する結果は得られなかったとしている。(参照 5)

(c) Renault ら (1989) のラット胚芽培養細胞株を用いた試験

IARC73 における引用によれば、Renault ら (1989) は、ラット胚芽培養細胞株を用いた *in vitro* 試験を実施し、その軟骨形成及び細胞増殖に影響の見られたサッカリン (化学形不詳) 濃度を 2.6 mg/mL 及び 4.1 mg/mL としている。(参照 5)

(d) Newall & Beedles (1996) のマウス胚幹細胞試験

IARC73 における引用によれば、Newall & Beedles (1996) は、*in vitro* で 0.5 mg/mL 以下の濃度のサッカリンはマウス胚幹細胞の分化を阻害しないとされている。(参照 5)

② 不純物

サッカリン類の不純物 (表 1 (11 頁) 参照) を被験物質とした生殖発生毒性に関する試験成績として以下のような報告がある。

a. OTSA

(a) Lederer (1977) のラット発生毒性試験 (再掲)

IARC22 においても引用されている上述の Lederer (1977) の報告に

よれば、妊娠 Wistar ラット（対照群 52 匹、投与群 20 匹）に、OTSA（0、0.1%）を、妊娠期間中を通じて混餌投与し、妊娠 9 日及び 20 日に帝王切開を行い、胚の吸収率、胎児体重及び胎盤重量の観察並びに胎児の水晶体、網膜及び視神経の組織学的検査を行う試験が実施されている。その結果、胚吸収率、胎児体重並びに水晶体、網膜及び視神経の形態学的変化に係る指数に変化はなかったが、胎盤重量の増加が認められたとされている（参照 3 2、1 3 9）。IARC22 では、本試験成績について、対照群でも変化が認められていることから、組織学的検査上のアーチファクトである可能性を排除できないとされている（参照 3 2）。本委員会としては、水晶体等の形態学的変化が認められたとする本試験成績について、組織学的検査上のアーチファクトである可能性を排除することができないものと評価した。

(b) Arnold ら（1979）のラット生殖発生毒性試験

Arnold ら（1979）の報告によれば、平均体重 175 g の SD ラット ( $F_0$ )（各群雌 24~27 匹）を雌雄 1:1 で平均体重 250 g の無処置雄と交配し、OTSA（0、40、100、250 mg/kg 体重/日）を妊娠 1 日から児動物が離乳するまでの計 43 日間反復強制経口投与（胃内挿管）し、得られた児動物 ( $F_1$ ) のうち各腹からほぼ同数を無作為に選抜し、生後 8、15 及び 21 日にその日の  $F_0$  母動物への投与 2 時間後に中間と殺（それぞれ各群 13~21 匹）し、残りの  $F_1$  児動物については  $F_0$  母動物と同様の投与を生後 105 日まで行った後にと殺する試験が実施されている。その結果、 $F_0$  母動物の生殖に係るパラメータや平均生存児数に変化は認められなかったとされている。体重については、 $F_1$  の 100 mg/kg 体重/日以上 の投与群の雌雄で離乳後 3 週から 9 週にかけて低値が認められたとされている。尿検査においては、 $F_1$  児動物の 40 mg/kg 体重/日以上 の投与群で尿 pH の若干の低下 ( $\Delta 0.1\sim 0.5$ ) が見られたが、用量相関性は認められなかったとされている。尿路の剖検及び病理組織学的検査においては、膀胱結石が、肉眼では全く認められなかったが、鏡検では生後 21 日以降の児動物の雌雄で用量相関性をもって認められたとされている。生後 105 日の 100 mg/kg 体重/日投与群の雄 1 匹及び 250 mg/kg 体重/日投与群の雄 2 匹の膀胱に微細な限局性の移行上皮過形成が認められたとされている。

また、別途平均体重 175 g の SD ラット ( $F_0$ )（各群雄 40~50 匹、雌 38~50 匹）に OTSA（0、2.5、25、250 mg/kg 体重/日）、OTSA（250 mg/kg 体重/日）+塩化アンモニウム（1%飲水投与）又はサッカリンナトリウム（5%）を 100 日間混餌投与した後に雌雄を 1:1 で交配し、雌については妊娠、出産及び哺育期間中も投与を継続し、得られた児動物 ( $F_1$ ) についても離乳後から親動物と同様の混餌投与を行い、 $F_1$  各群各腹 2 匹計 30 匹の雄を生後 8 日又は 21 日にと殺し、残りの  $F_1$  児動物については生後 105 日にと殺する試験が実施されている。その結果、 $F_0$  の生殖に係るパラメータや  $F_1$  の生存児数に被験物質の投与に関連した変化は認められなかったとされている。出生直後の児動物への影響としては、OTSA の 250 mg/kg 体重/日投与群において生後 1 日及び 4 日の平均生存児動物数並びに生後 4 日の体重の減少が認められたとされて

いる。生後 105 日の児動物においても、250 mg/kg 体重/日投与群の雌雄で、塩化アンモニウム飲水投与の有無にかかわらず体重の低値が認められたとされている。尿路の剖検及び病理組織学的検査においては、生後 8 日の F<sub>1</sub> の OTSA 投与群 (250 mg/kg 体重/日+塩化アンモニウム 1%飲水投与群を除く。) において腎結石及び膀胱病変の発生率に用量相関性が認められたとされている。腎結石は、対照群で 6/30 匹、2.5 mg/kg 体重/日投与群で 5/30 匹、25 mg/kg 体重/日投与群で 11/30 匹、250 mg/kg 体重/日投与群で 14/30 匹に認められたが、250 mg/kg 体重/日+塩化アンモニウム 1%飲水投与群では 5/30 匹に見られたとされている。また、膀胱病変としては、2.5 mg/kg 体重/日投与群で乳頭腫が 1/30 匹、250 mg/kg 体重/日投与群で限局性の移行上皮過形成が 7/30 匹に認められたが、250 mg/kg 体重/日+塩化アンモニウム 1%飲水投与群では 1 匹も認められなかったとされている。Arnold らは、塩化アンモニウムの併用により腎結石の生成及び膀胱病変の発生が減少したと結論している (参照 140)。本委員会としては、本試験における NOAEL を 25 mg/kg 体重/日と評価した。

(c) Arnold ら (1980) のラットを用いた二世世代にわたる試験 (再掲)

IARC73 及び FAS17 においても引用されている上述の Arnold ら (1980) の報告によれば、32 日齢の SD ラット (F<sub>0</sub>) (各群雌雄各 50 匹) に OTSA (不純物 100ppm 未満を含有) (0、2.5、25、250 mg/kg 体重/日) 又は OTSA (250 mg/kg 体重/日) +塩化アンモニウム (1%) を飲水投与 (自由摂取) し、投与開始 90 日後に各群内で雌雄を 1:1 で 1 週間交配し、妊娠、出産及び哺育を経て 142 週まで投与を継続した後にと殺するとともに、得られた児動物 (F<sub>1</sub>) (各群雌雄各 49~50 匹) についても、生後 21 日に離乳後、F<sub>0</sub> と同様の投与を 127 週まで継続した後にと殺する試験が実施されている。その結果、250 mg/kg 体重/日投与群において生存胎児数の減少、250 mg/kg 体重/日及び 250 mg/kg 体重/日+塩化アンモニウム 1%投与群において F<sub>1</sub> 児動物の生後 4 日の体重の低値が認められたとされている。そのほか、生殖に係るパラメータにおいて被験物質の投与に関連した変化は認められなかったとされている (参照 5、10、97)。本委員会としては、本試験における NOAEL を 25 mg/kg 体重/日と評価した。

(d) Colson ら (1984) のラット発生毒性試験 (再掲)

上述の Colson ら (1984) の報告によれば、妊娠 Wistar ラット (各群 20 匹) について、対照群のほか OTSA (0.1%) を混餌投与する群を設定し、妊娠 0 日から投与を開始し、妊娠 20 日に帝王切開を行い、胎児の眼球奇形等の程度 (催奇形指数) 及び発生率を見る試験が実施されている (参照 141)。本委員会としては、本報告については試験の詳細が不明であり、本報告の試験成績に基づいて NOAEL を評価することはできないと判断した。

(e) 厚生省 (1998) のラット反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (再掲)

上述の厚生省（当時）の平成9年度既存化学物質安全性点検結果によれば、8週齢のSDラット（各群雌雄各13匹）に、OTSA（0、20、100、500 mg/kg 体重/日）を、雄に対しては交配前14日間、交配期間中14日間及び交配期間終了後14日間の計42日間、雌に対しては交配前14日間及び最長14日間の交配期間を経て哺育3日まで強制経口投与（胃内挿管）し、得られた児動物を哺育4日にと殺する反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験が実施されている。その結果、親動物については、交尾、排卵、受胎、分娩及び哺育において被験物質の投与に関連した変化は認められなかったとされている。児動物については、形態異常は見られなかったが、500 mg/kg 体重/日投与群において、哺育0日の分娩率、生存児数及び生児出産率が低下・減少傾向を示し、哺育0日及び4日の雌雄生存児体重の低値が認められたとされている。以上より、試験担当者は、本試験における生殖発生毒性に係るNOAELを、親動物で雌雄ともに500 mg/kg 体重/日、児動物で100 mg/kg 体重/日としている（参照127）。本委員会としても、本試験における生殖発生毒性に係るNOAELを、親動物で雌雄ともに本試験の最高用量である500 mg/kg 体重/日、児動物で100 mg/kg 体重/日と評価した。

(f) 厚生省（2000）のラット簡易生殖毒性試験（再掲）

上述の厚生省（当時）の平成11年度既存化学物質安全性点検結果によれば、9週齢のSDラット（各群雌雄各13匹）に、OTSA（0、4、20、100 mg/kg 体重/日）を、雄に対しては交配前14日間、交配期間中14日間及び交配期間終了後19日間の計47日間、雌に対しては交配前14日間及び最長14日間の交配期間を経て哺育3日まで強制経口投与（胃内挿管）する簡易生殖毒性試験が実施されている。その結果、親動物については、交尾、排卵、受胎、分娩及び哺育において被験物質の投与に関連した変化は認められなかったとされている。児動物については、生存、一般状態及び体重並びに形態について被験物質の投与に関連した変化は認められなかったとされている。以上より、試験担当者は、本試験における生殖発生毒性に係るNOAELを、親動物で雌雄ともに100 mg/kg 体重/日、児動物でも100 mg/kg 体重/日としている（参照129）。本委員会としても、本試験における生殖発生毒性に係るNOAELを、親動物（雌雄）及び児動物のいずれについても本試験の最高用量である100 mg/kg 体重/日と評価した。

b. PTSA

(a) Colsonら（1984）のラット発生毒性試験（再掲）

上述のColsonら（1984）の報告によれば、妊娠Wistarラット（各群20匹）について、対照群のほかPTSA（0.1%）を混餌投与する群を設定し、妊娠0日から投与を開始し、妊娠20日に帝王切開を行い、胎児の眼球奇形等の程度（催奇形指数）及び発生率を見る試験が実施されている（参照141）。本委員会としては、本報告については試験の詳細が不明であり、本報告の試験成績に基づいてNOAELを評価することはできないと判断した。

(b) 厚生省 (1992) のラット反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (再掲)

上述の厚生省 (当時) の平成 3 年度既存化学物質安全性点検結果によれば、8 週齢の SD ラット (各群雌雄各 13 匹) に、PTSA (0、120、300、750 mg/kg 体重/日) を、雄に対しては交配前 14 日間、交配期間中 14 日間及び交配期間終了後 14 日間の計 42 日間、雌に対しては交配前 14 日間及び最長 14 日間の交配期間を経て哺育 3 日まで強制経口投与 (胃内挿管) し、得られた児動物を哺育 4 日にと殺す反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験が実施されている。その結果、親動物については、750 mg/kg 体重/日投与群の分娩例 10 例のうち 2 例の分娩状態が不良で、いずれも哺育 2 日までに全児が死亡したとされている。そのほか、交尾、排卵、受胎及び哺育において被験物質の投与に関連した変化は認められなかったとされている。児動物については、750 mg/kg 体重/日投与群で出生率の低下、哺育 1 日の雌生存児体重の低値が認められたとされている。これについて試験担当者は、750 mg/kg 体重/日の投与により分娩又は哺育機能の障害及び胚の子宮内発育抑制が惹起される可能性が示唆されたとしている。以上より、試験担当者は、本試験における生殖発生毒性に係る NOAEL を、親動物及び児動物ともに 300 mg/kg 体重/日としている (参照 130)。本委員会としても、本試験における生殖発生毒性に係る NOAEL を、親動物及び児動物のいずれについても 300 mg/kg 体重/日と評価した。

c. OSBA

(a) Lederer (1977) のラット発生毒性試験 (再掲)

IARC22 においても引用されている上述の Lederer (1977) の報告によれば、妊娠 Wistar ラット (対照群 52 匹、投与群 24 匹) に、OSBA (0、0.1%) を、妊娠期間中を通じて混餌投与し、妊娠 9 日及び 20 日に帝王切開を行い、胚の吸収率、胎児体重及び胎盤重量の観察並びに胎児の水晶体、網膜及び視神経の組織学的検査を行う試験が実施されている。その結果、胎児体重及び胎盤重量に変化はなかったが、胚吸収率並びに水晶体、網膜及び視神経の形態学的変化に係る指数の増加が認められたとされている (参照 32、139)。IARC22 では、本試験成績について、対照群でも変化が認められていることから、組織学的検査上のアーチファクトである可能性を排除できないとされている (参照 32)。本委員会としても、水晶体等の形態学的変化が認められたとする本試験成績について、組織学的検査上のアーチファクトである可能性を排除することができないものと評価した。

(b) Colson ら (1984) のラット発生毒性試験 (再掲)

上述の Colson ら (1984) の報告によれば、妊娠 Wistar ラット (各群 20 匹) について、対照群のほか OSBA (0.1%) を混餌投与する群を設定し、妊娠 0 日から投与を開始し、妊娠 20 日に帝王切開を行い、胎児の眼球奇形等の程度 (催奇形指数) 及び発生率を見る試験が実施されている (参照 141)。本委員会としては、本報告については試験の詳細が不明であり、本報告の試験成績に基づいて NOAEL を評価することはできないと判断した。

d. PSBA

(a) Colson ら (1984) のラット発生毒性試験 (再掲)

上述の Colson ら (1984) の報告によれば、妊娠 Wistar ラット (各群 20 匹) について、対照群のほか PSBA (0.1%) を混餌投与する群を設定し、妊娠 0 日から投与を開始し、妊娠 20 日に帝王切開を行い、胎児の眼球奇形等の程度 (催奇形指数) 及び発生率を見る試験が実施されている (参照 1 4 1)。本委員会としては、本報告については試験の詳細が不明であり、本報告の試験成績に基づいて NOAEL を設定することはできないと評価した。

e. CBSA 及び CBSA-NH<sub>4</sub>

(a) Lederer (1977) のラット発生毒性試験 (再掲)

IARC22 においても引用されている上述の Lederer (1977) の報告によれば、妊娠 Wistar ラット (対照群 52 匹、投与群 20 匹) に *o*-CBSA 又は *o*-CBSA-NH<sub>4</sub> (0、0.1%) を、妊娠期間中を通じて混餌投与し、妊娠 9 日及び 20 日に帝王切開を行い、胚の吸収率、胎児体重及び胎盤重量の観察並びに胎児の水晶体、網膜及び視神経の組織学的検査を行う試験が実施されている。その結果、胎盤重量 (CBSA 投与群を除く。)、胎児体重及び胚吸収率並びに水晶体、網膜及び視神経の形態学的変化に係る指数の増加が認められたとされている (参照 3 2、1 3 9)。IARC22 では、本試験成績について、対照群でも変化が認められていることから、組織学的検査上のアーチファクトである可能性を排除できないとされている (参照 3 2)。本委員会としても、水晶体等の形態学的変化が認められたとする本試験成績について、組織学的検査上のアーチファクトである可能性を排除することができないものと評価した。

(b) Colson ら (1984) のラット発生毒性試験 (再掲)

上述の Colson ら (1984) の報告によれば、妊娠 Wistar ラット (各群 20 匹) について、対照群のほか *o*-CBSA (0.1%) 又は *p*-CBSA (0.1%) を混餌投与する群を設定し、妊娠 0 日から投与を開始し、妊娠 20 日に帝王切開を行い、胎児の眼球奇形等の程度 (催奇形指数) 及び発生率を見る試験が実施されている (参照 1 4 1)。本委員会としては、本報告については試験の詳細が不明であり、本報告の試験成績に基づいて NOAEL を評価することはできないと判断した。

(5) アレルゲン性

① サッカリン

a. マウスを用いた局所リンパ節試験 (LLNA)

Warbrick ら (2001) の報告によれば、8~12 週齢の CBA/Ca マウス (各群 4 匹) にサッカリン (純度 98%) DMSO 溶液 (0、25、50、75%) 25  $\mu$ L を 3 日間両耳背部に局所投与し、投与 5 日目にと殺する局所リンパ節試験が実施されている。その結果、本試験におけるサッカリンの EC<sub>3</sub> 値は 75% 超であり、陰性であったとされている。(参照 1 4 2)

## ② 不純物

### a. モルモットを用いたマキシミゼーション試験 (GPMT)

SCCNFP (2004) の報告書における引用によれば、Quintiles England (1997) は、BIT (含量 79.8% (そのほか水分 19.2%)) についての Dunkin Hartley モルモット (対照群 10 匹、投与群 20 匹) を用いたマキシミゼーション試験 (OECD TG406) (感作 1 回目 0.1%皮内、感作 2 回目 20%閉塞皮膚貼付、惹起 10%閉塞皮膚貼付) を実施している。その結果、閉塞貼付剥離 24 及び 48 時間後ともに投与群の 9/20 匹に陽性反応が見られたことから、BIT には中等度の皮膚感作性があるとしている。(参照 7 1)

### b. マウスを用いた局所リンパ節試験 (LLNA)

SCCNFP (2004) の報告書においても引用されている Basketter ら (1999) の報告によれば、BIT についてのマウスを用いた局所リンパ節試験が実施されており、その結果、本試験における BIT の EC3 値<sup>43)</sup>は 10.4%であったとしている。Basketter らは、同時に他のイソチアゾリノン類 (CMI 及び MTI) についても比較検討を実施しており、その結果、それらの EC3 値は 0.01%及び 2.0%であったとしている (参照 7 1、1 4 3) ことから、LLNA における EC3 値を用いた相対皮膚感作性分類によれば、CMI は強い皮膚感作性物質に分類されるが、BIT は弱い皮膚感作性物質に分類される (参照 1 4 4)。

## (6) ヒトにおける知見

### ① 膀胱癌に係る疫学的知見

膀胱癌に係る疫学的知見として以下のような報告がある。なお、糖尿病患者における膀胱癌に係る疫学研究の成果が、IARC22 における引用によれば Kessler (1970)、Armstrong & Doll (1975)、Armstrong ら (1976) により報告されている (参照 3 2) が、糖尿病患者のライフスタイルは一般人口集団とのそれと多くの点で異なると考えられること等から、当該報告については本評価において用いないこととした。

### a. 膀胱癌等に係る症例対照研究

#### (a) Morgan & Jain (1974) のカナダにおける病院ベースの症例対照研究

IARC22 及び IARC73 における引用によれば、Morgan & Jain (1974) は、カナダの病院における膀胱癌症例 232 例 (男性 158 例及び女性 74 例) (うち 19 例 (男性 2 例及び女性 17 例) については解析を行うことができなかったとしている。) 並びに当該症例と年齢及び性別でマッチングを行った同数の病院対照 (良性前立腺肥大の男性及び緊張性尿失禁の女性) (うち 35 例 (男性 18 例及び女性 17 例) については解析を行うことができなかったとしている。) を基に、質問票の郵送による病院ベースの症例対照研究を実施している。その結果、1 年間を超える卓上用人工甘味料の摂取に係るオッズ比は、男性で 1.0、女性で 0.4 ( $p < 0.01$ ) であったとしている。IARC ワーキンググループは、対照の疾患が人工甘味料の摂取に影響 (例: 緊張性尿失禁のための飲水量自制等) した可

<sup>43</sup> LLNA において耳介リンパ節細胞増殖を溶媒対照のその 3 倍に増加させるのに必要な用量。



能性等を指摘している。(参照5、32)

(b) Simonら(1975)のマサチューセッツ州及びロードアイランド州における病院ベースの症例対照研究

IARC22及びIARC73においても引用されているSimonら(1975)の報告によれば、1965～1971年に米国のマサチューセッツ州(ボストンを除く。)及びロードアイランド州の都市部の病院10施設において病理組織学的検査で下部尿路移行上皮癌と診断された白人女性症例135例(当初対象とした216例のうち、死亡していた40例については除外され、41例については回答が得られなかったとされている。)並びに当該症例1例につき3例の割合で同じ病院から尿路疾患のない者を選定して年齢、居住地域及び症例の診断時期で個人マッチングを行った病院対照390例(当初対象とした者のうち110例は死亡しており、148例については回答が得られなかったとしている。)を基に、質問票の郵送による病院ベースの症例対照研究が実施されている。その結果、コーヒー・紅茶飲用時におけるサッカリン類の摂取に係るオッズ比はほぼ1.0であったとされている。IARCワーキンググループは、人工甘味料の摂取(量、頻度及び期間)に応じたリスクについてデータが示されていないこと、回答が得られなかった者の割合が高率であることを指摘している。(参照5、32、145)

(c) Wynder & Goldsmith(1977)の米国6都市における病院ベースの症例対照研究

IARC22及びIARC73における引用によれば、Wynder & Goldsmith(1977)は、1969～1973年の米国6都市の病院17施設における膀胱癌症例712例(男性574例及び女性138例)並びに当該症例と年齢、性別、人種及び病棟種類(個室、準個室又は相部屋)でマッチングを行った同数の病院対照を基に、面接法による病院ベースの症例対照研究を実施している。症例のうち卓上用人工甘味料の摂取履歴が明らかにされた163例(男性132例及び女性31例)と、病院対照のうち153例(男性124例及び女性29例)について、卓上用人工甘味料の摂取に係るオッズ比を摂取期間別(3階層)に算出したところ、いずれも1.0を下回ったとしている。Wynder & Goldsmithは、サイクラミン酸塩については、米国市場に導入されてから当該調査対象期間まで日が浅いことから、それらに発がん作用があるとしても、当該調査において把握することは困難であるとしている。IARCワーキンググループは、17施設から症例・対照を選定していることについて、個々の施設ごとにマッチングを行っているか否かについて明確に報告されていないことを指摘している。(参照5)

(d) Howeら(1977、1980)のブリティッシュコロンビア州、ニューファンドランド州及びノバスコシア州における一般人口ベースの症例対照研究

IARC73においても引用されているHoweら(1977、1980)の報告によれば、1974年4月～1976年6月にカナダのブリティッシュコロン

ピア州、ニューファンドランド州及びノバスコシア州において新たに膀胱癌と診断され登録された症例 821 例のうち 632 例（男性 480 例及び女性 152 例）並びに当該症例と年齢及び性別で個人マッチングを行った同数の同一居住地域対照を基に、面接法による一般人口ベースの症例対照研究が実施されている。その結果、何らかの人工甘味料の摂取に係るオッズ比は、男性で 1.6 (95%CI 下限値=1.1)、女性で 0.6 (有意差なし) であったとされている。さらに、男性について交絡因子の調整のため、学歴、職業暴露、尿路感染既往歴、喫煙及びインスタントコーヒー摂取で個人マッチングを行ったところ、オッズ比は 1.5~1.8 になったとされている。男性でサッカリン類摂取に係るオッズ比を算出したところ、年間摂取量 2,500 錠未満の者（該当症例 42 例）で 1.5 (95%CI 下限値=1.0)、年間摂取量 2,500 錠超の者（該当症例 16 例）で 2.1 (95%CI 下限値=0.9) であり、摂取期間 3 年以下の者（該当症例 30 例）で 1.4 (95%CI 下限値=0.9)、摂取期間 3 年超の者（該当症例 28 例）で 2.0 (95%CI 下限値=1.2) であったとされている。さらに、年間摂取量が 2,500 錠超で、かつ、摂取期間 3 年超のオッズ比は 5.3 であったとされている。IARC ワーキンググループは、摂取量又は摂取期間に係るオッズ比の算出において、交絡因子を改めて調整したのか否かについて明確に報告されていないことを指摘している（参照 5、146）。本委員会としては、本報告において、男性の人工甘味料摂取者の 84% はサッカリン類のみの摂取者であったとされているため、人工甘味料摂取者の分析で交絡因子を調整しても影響がなかったことから、交絡因子を改めて調整していないとしても問題はないものとする。

(e) Kessler (1976) 及び Kessler & Clark (1978) のボルチモアにおける病院ベースの症例対照研究

IARC22 及び IARC73 における引用によれば、Kessler (1976) 及び Kessler & Clark (1978) は、1972~1975 年に米国のボルチモアの病院 19 施設において新たに膀胱癌と診断された 1,300 例のうち、死亡していた 509 例及び調査時点で特定できなかった 157 例を除き、結果生存して退院した 634 例中面接に応じた 519 例（男性 365 例及び女性 154 例）と、当該症例と年齢、性別、人種及び婚姻で個人マッチングを行い無作為抽出した病院対照（癌又は尿路疾患と診断された者を除く。）を基に、面接法による病院ベースの症例対照研究を実施している。その結果、交絡因子について調整を行って算出した人工甘味料摂取に係るオッズ比については、摂取との関連について一貫性が見いだされなかったとしている。また、サッカリン類摂取に係るオッズ比は 0.7~1.1 であったとしている。喫煙の有無で層化を行うと、人工甘味料摂取に係るオッズ比は喫煙者で 0.84、非喫煙者で 1.4 であったとしている。非喫煙男性での人工甘味料摂取に係るオッズ比 1.7 は、交絡因子の調整を行うと 2.6 (95%CI=1.2~5.7) に増加したとしている。IARC ワーキンググループは、生存した症例のみを対象としたこと及び結果として病院対照よりも症例の学歴が高くなったことによる選択バイアスの可能性を指摘している。（参照 5、32）

(f) Morrison & Buring (1980) のボストンにおける一般人口ベースの症例対照研究

IARC73における引用によれば、Morrison & Buring (1980) は、米国のボストン都市部の病院 66 施設中 65 施設において下部尿路移行上皮の良性腫瘍又は癌と組織学的に確認された症例 741 例のうち調査に参加した 597 例並びに当該症例と年齢及び性別で頻度マッチングを行った同一居住地域対照 677 例のうち調査に参加した 544 例を基に、一般人口ベースの症例対照研究を実施している。その結果、食事制限用飲料及び代替甘味料の摂取に係るオッズ比は、男性でそれぞれ 0.8 (95%CI=0.6~1.1、該当摂取症例 144 例) 及び 0.8 (95%CI=0.5~1.1、該当摂取症例 101 例)、女性でそれぞれ 1.6 (95%CI=0.9~2.7、該当摂取症例 69 例) 及び 1.5 (95%CI=0.9~2.6、該当摂取症例 54 例) であったとしている。また、男性について、年齢、学歴、婚姻、宗教及び喫煙で調整した多変量解析を行ったところ、人工甘味料添加飲料の摂取及び代替甘味料の摂取に係るオッズ比はそれぞれ 0.7 及び 0.8 であったとしている。男女別に食事制限用飲料、代替甘味料及び食事制限用食品の摂取頻度及び摂取期間との関連について分析を行ったところ、食事制限用飲料の摂取期間が 5 年超の女性 (オッズ比 3.7 (95%CI=1.3~10、該当摂取症例 22 例)) を除き、摂取との関連性が一貫して認められた組み合わせはなかったとしている。喫煙の有無について検討を行ったところ、喫煙経験のない女性では食事制限用飲料及び非栄養甘味料の摂取に係るオッズ比がそれぞれ 2.6 (該当摂取症例 19 例) 及び 2.1 (該当摂取症例 15 例) になった一方、喫煙経験のない男性ではオッズ比の高値は見られなかったとしている。IARC ワーキンググループは、女性について多変量解析が行われていないことを指摘している。(参照 5)

(g) Wynder & Stellman (1980) の病院ベースの症例対照研究

IARC73における引用によれば、Wynder & Stellman (1980) は、1977~1979年の膀胱癌症例 367 例及び当該症例と同数の病院対照を基に、面接法による病院ベースの症例対照研究を実施している。その結果、マッチングを行った上で、何らかの人工甘味料の摂取及び食事制限用飲料の摂取に係るオッズ比を算出したところ、いずれも 1.0 を下回ったとしている。10 年間以上の喫煙歴のある者に限定すると、甘味料又は食事制限用飲料の摂取に係るオッズ比は、男性で 0.6 (95%CI=0.3~1.1)、女性で 1.0 (95%CI=0.2~5.1) であったとしている。(参照 5)

(h) Hoover & Harge-Strasser (1980) の米国 10 地域における一般人口ベースの症例対照研究

IARC73における引用によれば、Hoover & Harge-Strasser (1980) は、米国の 10 地域において新たに膀胱癌と組織学的に確認された症例 (良性乳頭腫症例を除く。) 3,000 例 (男性 2,258 例及び女性 742 例) 並びに当該症例と年齢及び性別で頻度マッチングを行った上で無作為抽出された同一居住地域対照 5,776 例 (男性 4,277 例及び女性 1,499 例) を基に、面接法による一般人口ベースの症例対照研究を実施している。その結果、年齢、人種、喫煙、コーヒー摂取及び職業暴露について調整

を行った上で、何らかの人工甘味料の摂取に係るオッズ比を算出したところ、男性で 1.0 (95%CI=0.1~1.1)、女性で 1.1 (95%CI=0.1~1.3) であったとしている。卓上用甘味料の一日摂取量 (6 階層) 又は食事制限用飲料の一日摂取量 (5 階層) との関係について傾向検定を行ったところ、女性の卓上用甘味料の摂取量と膀胱癌発生率との間についてのみ有意差 ( $p=0.03$  (片側)) が認められ、最高摂取量階層 (卓上用甘味料を 1 日 6 回分以上使用) に係るオッズ比は 1.4 (該当摂取症例 16 例) であったとしている。性別、地域、学歴等について調整を行った上で食事制限用飲料及び卓上用人工甘味料の複合摂取量についてロジスティック回帰分析を行ったところ、男女ともに大量摂取者 (一日摂取量が卓上用甘味料 3 回分以上かつ食事制限用飲料 2 本以上又は卓上用甘味料 6 回分以上かつ食事制限用飲料一定量以上) に係るオッズ比はいずれも 1.5 (95%CI=1.0~2.1) であったとしている。

膀胱癌の低リスク集団と考えられた、喫煙歴がなく膀胱癌物質への職業暴露もない白人女性 (症例中 283 例及び対照中 831 例) に限定してオッズ比を算出したところ、(i) 卓上用人工甘味料の摂取量が 1 日 1 回分未満の者では 0.9 (該当摂取症例 15 例) であったのに対し 1 日 3 回分以上の者では 1.8 (該当摂取症例 22 例) に増加 (傾向検定で  $p<0.01$ ) し、(ii) 卓上用人工甘味料の摂取量が 1 日 2 回分以上の者のうち、摂取期間 5 年以下の者では 1.3 (該当摂取症例 14 例)、5 年超 9 年以下の者では 1.8 (該当摂取症例 13 例)、10 年以上の者では 2.7 (該当摂取症例 16 例) に増加した (傾向検定で  $p<0.05$ ) としている。食事制限用飲料の摂取症例でも、摂取量や摂取期間に関連したオッズ比の増加傾向が見られている。

膀胱癌の高リスク集団と考えられた、喫煙本数 1 日 40 本超の白人男性 (症例中 235 例及び対照中 307 例) に限定してオッズ比を算出したところ、卓上用甘味料の摂取量が 1 日 6 回分以上の者で 1.9 (該当摂取症例 7 例)、食事制限用飲料の摂取量が 1 日 3 本以上の者で 2.6 (該当摂取症例 6 例) であったとしている。(参照 5)

IARC73 における引用によれば、Sturgeon ら (1994) は、Hoover & Harge-Strasser (1980) のデータについて、年齢、性別、人種、学歴、人工甘味料摂取、コーヒー摂取、喫煙、職業暴露、膀胱結石、尿路感染、家族の膀胱癌履歴及び居住地域を独立変数とし、それらの膀胱癌の病期分類及び組織学的異型度を従属変数としてロジスティック回帰分析を実施している。その結果、人工甘味料の一日摂取量が 1,680 mg/人/日以上以上の者では、組織学的異型度 III/IV の膀胱癌発生率についてのみ有意な増加 (オッズ比 2.2 (95%CI=1.3~3.6、該当摂取症例 23 例) が認められたとしている。IARC ワーキンググループは、一日摂取量のカットオフ値が非常に高いレベルであるが、その選定理由について報告されていないことを指摘している。(参照 5)

(i) Cartwright ら (1981) の英国における病院ベースの症例対照研究

IARC73 においても引用されている Cartwright ら (1981) の報告によれば、1970 年代の英国ウェスト・ヨークシャーにおける新規診断症

例 219 例（男性 161 例及び女性 58 例）並びに有病症例 622 例（男性 470 例及び女性 152 例）と、各症例と年齢及び性別で個人マッチングを行った病院対照とを基に、病院ベースの症例対照研究が実施されている。その結果、診断又は調査の 5 年以上前にサッカリン類を 1 年間以上摂取した経験のある非喫煙者（禁煙期間 5 年以上の者を含む。）に係るオッズ比は男性で 2.2 (95%CI=1.3~3.8)、女性で 1.6 (95%CI=0.8~3.2) であったとされている。IARC ワーキンググループは、有病症例を利用したことによる暴露の思い出しバイアスや生存に関する選択バイアスの可能性を指摘している。（参照 5、147）

(j) Najem ら (1982) のニュージャージー州における病院ベースの症例対照研究

IARC73 においても引用されている Najem ら (1982) の報告によれば、1978 年に米国ニュージャージー州北部の泌尿器科クリニック 4 施設及び病院 2 施設に入院した白人の症例 75 例（男性 65 例及び女性 10 例）並びに当該症例と年齢、性別、出生地及び居住地域で個人マッチングを行った病院対照 142 例（男性 123 例及び女性 19 例）を基に、病院ベースの症例対照研究が実施されている。その結果、症例中 12 例及び対照中 19 例にサッカリン類（錠剤）摂取履歴があり、平均一日摂取量は症例で 3.6 錠、対照で 2.5 錠、平均摂取期間は症例で 6.4 年、対照で 6.3 年であり、サッカリン類の摂取履歴に係るオッズ比は 1.3 (95%CI=0.6~2.8) であったとされている。（参照 5、148）

(k) Morrison ら (1982) のマンチェスター及び名古屋における一般人口ベースの症例対照研究

IARC73 における引用によれば、Morrison ら (1982) は、英国マンチェスター及び名古屋において新たに下部尿路移行上皮癌と診断された症例 555 例及び 293 例並びに同一居住地域対照 735 例及び 589 例を基に、一般人口ベースの症例対照研究を実施している。その結果、人工甘味料摂取に係るオッズ比は、マンチェスターでは男女ともに 0.9 (95%CI=0.7~1.2、該当摂取症例合計 140 例)、名古屋では男性 0.7 (95%CI=0.5~0.9、該当摂取症例 100 例) 及び女性 0.5 (95%CI=0.3~0.8、該当摂取症例 26 例) であったとしている。人工甘味料の一日摂取量が 10 錠超のマンチェスターの女性に係るオッズ比が 2.3 (該当摂取症例 9 例) であったほかは、人工甘味料の摂取頻度及び摂取期間に関して算出したオッズ比に摂取量との関連は認められなかったとしている。（参照 5）

(l) Møller-Jensen ら (1983) のコペンハーゲンにおける一般人口ベースの症例対照研究

IARC73 においても引用されている Møller-Jensen ら (1983) の報告によれば、1979 年 5 月~1981 年 4 月にデンマークのコペンハーゲン市、フレゼクスベア市及びコペンハーゲン郡の病院 12 施設において新たに膀胱癌としてがん登録された患者（うち 99%が組織学的に膀胱癌と確認されている。）のうち約 2/3 の症例 388 例（男性 290 例及び女性 98

例) 及び当該症例と同一自治体に居住する年齢及び性別がほぼ同様の対照 787 例 (男性 592 例及び女性 195 例) (無作為に抽出された者のうち調査への参加に同意した 75% の者) を基に、一般人口ベースの症例対照研究が実施されている。その結果、コーヒー、茶等の食品からの人工甘味料の摂取に係る年齢で調整したオッズ比は、男性で 0.7 (95%CI=0.5~1.0)、女性で 1.1 (95%CI=0.6~1.9) であり、卓上用人工甘味料の摂取又はコーヒー・茶からの人工甘味料の摂取に限定してもそれらのオッズ比はほぼ同様であったとされている。摂取量で層化を行っても、男性では全階層ともにオッズ比が 1.0 を下回り、女性では摂取量に関連した傾向が見いだされなかったとされている。人工甘味料の摂取期間が 15 年超の者に限定しても、そのオッズ比は男性で 0.5 (95%CI=0.2~1.0)、女性で 0.8 (95%CI=0.3~2.5) であったとされている。膀胱癌の病期分類又は組織学的異型度及び性別で層化を行っても一貫性のある関係は見いだされなかったとされている。喫煙歴のない男性の人工甘味料摂取に係るオッズ比は 1.9 (95%CI=0.5~7.8、該当摂取症例 4 例) であるが、一日喫煙本数が増加するとオッズ比は減少し、一日喫煙本数 25 本以上の男性の同オッズ比は 0.2 (95%CI=0.1~0.5) になったとされている。喫煙歴のある女性については、例数が少なく、一貫性のある値が得られなかったとされている。サッカリン類のみを甘味料として摂取したとする者 (人工甘味料摂取者の 70%) のオッズ比は男性で 0.7、女性で 1.0 であり、サイクラミン酸塩のみを甘味料として摂取したとする者と、オッズ比に差はなかったとされている。(参照 5、149)

(m) Mommsen ら (1983) のオーフスにおける症例対照研究

IARC73 における引用によれば、Mommsen ら (1983) は、デンマークのオーフスにおける病院 1 施設において新たに膀胱癌であると組織学的に確認された症例 (女性 47 例) 並びに当該症例と年齢でマッチングを行った同一居住地域対照 (例数は症例の 2 倍) を基に、症例対照研究を実施している。「サッカリン」の摂取履歴のあった症例 6 例及び対照 2 例について様々な交絡因子の調整を行った上で算出した「サッカリン」摂取に係るオッズ比は 6.7 (95%CI=1.5~30) であり、喫煙歴のない者に限定すると同オッズ比は 3.3 (95%CI=1.4~7.8) になったとしている。IARC ワーキンググループは、本報告中で「人工甘味料」と「サッカリン」が同義の用語として用いられていることを指摘している。(参照 5)

(n) Piper ら (1986) のニューヨークにおける症例対照研究

IARC73 及び FAS32 における引用によれば、Piper ら (1986) は、膀胱癌の発生リスクが低いとされる 20~49 歳の女性を対象に、1975~1980 年に米国のニューヨークにおいて新たに膀胱癌と診断された者 (担当医が面会許可を出さなかった 40 例及び電話インタビューに応じなかった 42 例を除く。) をがん登録から選定して症例とし、当該症例と年齢及び電話のエリアコードで個人マッチングを行った者を対照として、合計 173 組のペア (うち 8 組はデータ欠落) を得て、症例対照研究を実施している。その結果、卓上用人工甘味料又は人工甘味料添加飲料

を 100 回以上摂取したことがある者（症例中 77 例及び対照中 74 例）に係るオッズ比は 1.1 (95%CI=0.7~1.7) であり、それらの摂取との関連は認められなかったとしている。IARC ワーキンググループは、調査不参加者の割合が高く、選択バイアスを生じた可能性を指摘している。また、FAS32 では摂取量階層が 2 階層のみであることが指摘されている。(参照 5、23)

(o) Risch ら (1988) のアルバータ州及びオンタリオ州における症例対照研究

IARC73 においても引用されている Risch ら (1988) の報告によれば、サッカリン類が禁止された 1978 年以降の 1979~1982 年に新たに膀胱癌（膀胱移行上皮癌以外の悪性膀胱腫瘍を含む。）と診断されたカナダのアルバータ州及びオンタリオ州に居住する症例 1,251 例のうち 835 例並びに当該症例と年齢及び性別で個人マッチングを行った同一居住地域対照 1,483 例のうち 792 例を基に、面接法による症例対照研究が実施されている。なお、症例の 32% 及び対照の 9% については、既に死亡しているか疾患のため面接ができなかったとされている。その結果、糖尿病の履歴又は罹患に係るオッズ比は 1.6 (95%CI=1.1~2.4、該当履歴・罹患患者数 131 例) であり、甘味料の摂取有無を変数に加えても値は不変であったとされている。卓上用甘味料の常用、サッカリン類摂取、サイクラミン酸塩摂取、低カロリー食品摂取及び食事制限用飲料摂取について階層化してオッズ比を算出したところ、唯一、女性の低カロリー食品の生涯摂取に係るオッズ比のみが 1.5 (95%CI=1.0~2.3) と 95%CI が 1.0 未満を除外したとされている。なお、男性の低カロリー食品の生涯摂取に係るオッズ比は 1.0 (95%CI=0.8~1.2) であったとされている。サッカリン類の摂取に係るオッズ比には摂取量との一貫した関連は見られなかったとされている。(参照 5、150)

(p) Akdas ら (1990) のトルコにおける病院ベースの症例対照研究

IARC73 及び FAS32 における引用によれば、Akdas ら (1990) は、トルコにおいて、膀胱癌と新たに診断され、又は罹患していた症例 194 例（男性 168 例及び女性 26 例）並びに当該症例と年齢及び性別でマッチングを行った同数の病院対照を基に、病院ベースの症例対照研究を実施している。その結果、人工甘味料の摂取履歴を報告したのは症例中 19 例及び対照中 8 例であった ( $p < 0.05$ ) としている（オッズ比は算出されていない。）。IARC ワーキンググループは、病院対照が罹患していた疾患について報告されていないことを指摘している。また、FAS32 では、人工甘味料の種類が区別されていないこと、交絡因子について調査がなされていないことが指摘されている。(参照 5、23)

(q) Elcock & Morgan (1992) によるメタアナリシス

FAS32 における引用によれば、Elcock & Morgan (1992) は、Morgan & Wong (1985) がレビューを行った疫学研究に関する一連の報告に新たに 2 報を追加し、合計 15 報についてメタアナリシスを実施している。その結果、サッカリン類の摂取と膀胱発がんとの間に関連性は認められ

なかったとしている。(参照 2 3)

(r) Momas ら (1994) のフランスにおける人口ベースの症例対照研究  
黒川及び梅村 (1996) のレビューにおける引用によれば、Momas ら (1994) は、膀胱がん多発地域のフランス地中海地方での疫学研究でがん患者と健常人との間にサッカリン類消費量の差が認められないとしている。(参照 1 5 1)

(s) Gallus ら (2006) のイタリアにおける病院ベースの症例対照研究レビュー

Gallus ら (2006) の報告によれば、1991～2004 年の間にイタリアの 4 地域における表 8 のような口腔・咽頭癌、食道癌、結腸癌、直腸癌、喉頭癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌及び腎細胞癌と診断された症例及びそれに対応する病院対照 (急性の非腫瘍性疾患患者) を基にした面接法による病院ベースの症例対照研究が実施されている。具体的には、年齢、性別、教育期間、アルコール摂取、喫煙、体重、総エネルギー摂取量及び熱い飲料の摂取といった交絡因子について調整を行った上で無条件多重ロジスティック回帰分析が実施されている。その結果、診断 (症例) 又は入院 (対照) の 2 年前の時点における何らかの人工甘味料の摂取に係るオッズ比については、喉頭癌においてのみ、一日摂取量が 2 錠・包/人/日以下の者で 1.23 (95%CI=0.59～2.57)、2 錠・包/人/日超の者で 2.34 (95%CI=1.20～4.55) と摂取量に関連した有意な傾向が認められたとされている。サッカリン類の摂取に係るオッズ比は摂取に関連して増加しなかったとされている。Gallus らは、本調査において、サッカリン類及びその他の人工甘味料 (主としてアスパルテーム) の摂取により、対象としたいくつかの癌の発生が増加するという証拠は得られなかったと結論している。(参照 1 5 2)

表 8 Gallus ら (2006) の症例対照研究

癌種種類	症例	対照	サッカリン類摂取者 (症例:対照)	サッカリン類摂取に係る オッズ比 (95%CI)
口腔・咽頭癌	598	1,491	6:26	0.83 (0.30～2.29)
食道癌	304	743	8:19	1.58 (0.59～4.25)
結腸癌	1,225	4,154	44:150	0.95 (0.67～1.35)
直腸癌	728		25:150	0.93 (0.60～1.45)
喉頭癌	460	1,088	17:29	1.55 (0.76～3.16)
乳癌	2,569	2,588	113:120	1.01 (0.77～1.33)
卵巣癌	1,031	2,411	24:126	0.46 (0.29～0.74)
前立腺癌	1,294	1,451	42:49	0.91 (0.59～1.40)
腎細胞癌	767	1,534	26:60	0.79 (0.49～1.28)

(t) Andreatta ら (2008) のアルゼンチンにおける病院ベースの症例対照研究

Andreatta ら (2008) の報告によれば、1999～2006 年にアルゼンチンのコルドバ周辺の病院 10 施設において組織学的に尿路移行上皮腫瘍<sup>(44)</sup>と確認され、泌尿器科専門医により診療録に記録された 250 例<sup>(45)</sup>の

<sup>44</sup> 内訳は腎盂、尿管又は膀胱の腫瘍とされている。

<sup>45</sup> がん登録制度が未整備のため、専門医の診療録から症例を選定したとされている。



うち面接に応じた症例 197 例 (約 80%) 及びその病院対照 397 例 (癌履歴のない急性疾患患者 (腫瘍、尿路疾患、消化器疾患若しくは糖尿病の患者又は長期間食事制限した者を除く。)) を基に、面接法による病院ベースの症例対照研究が実施されている。その結果、人工甘味料の摂取履歴のある者は 138 例 (症例の 51 例 (26%) 及び対照の 87 例 (22%)) であり、尿路移行上皮腫瘍について年齢、性別、BMI 及び社会的ステータスの調整を行った上で人工甘味料摂取履歴に係るオッズ比を算出したところ、1~9 年間の摂取経験者 (該当摂取症例 21 例) で 1.10 (95%CI=0.61~2.00)、10 年間以上の摂取経験者 (該当摂取症例 30 例) で 2.18 (95%CI=1.22~3.89) であったとされている。Andreatta らは、人工甘味料の 10 年間以上の摂取と尿路移行上皮腫瘍の発生との間に関連が認められたとしている。(参照 1 5 3)

(u) Bosetti ら (2009) のイタリアにおける病院ベースの症例対照研究レビュー

Bosetti ら (2009) の報告によれば、(i) 1997~2007 年に拡大ミラノ地域において新たに胃癌と組織学的に確認された症例 230 例及びその病院対照 547 例、(ii) 1991~2007 年に拡大ミラノ地域及びポルデノーネ県において新たに膵臓癌と組織学的に確認された症例 326 例及びその病院対照 652 例、(iii) 1992~2006 年に拡大ミラノ地域、ウディネ県、ポルデノーネ県及びナポリ都市部において新たに子宮体癌と組織学的に確認された症例 454 例及びその病院対照 908 例 (女性のみ) を基にした面接法による病院ベースの症例対照研究が実施されている。各対照については、症例と同じ病院ネットワークに急性の非腫瘍性疾患で入院した患者の中から年齢、性別及び調査センターで頻度マッチングを行った上で選定されている。具体的には、年齢、性別、教育期間、喫煙、体重、糖尿病履歴、総エネルギー摂取量及び熱い飲料の摂取といった交絡因子について調整を行った上で無条件多重ロジスティック回帰分析が実施されている。その結果、診断 (症例) 又は入院 (対照) の 2 年前の時点におけるサッカリン類の摂取経験に係るオッズ比は、胃癌で 0.65 (95%CI=0.25~1.68)、膵臓癌で 0.19 (95%CI=0.08~0.46)、子宮体癌で 0.71 (95%CI=0.36~1.38) であったとされている。Bosetti らは、本調査においてサッカリン類を含む人工甘味料の摂取に関連した胃癌、膵臓癌又は子宮体癌の発生の増加は認められないと結論している。(参照 1 5 4)

b. 膀胱癌に係るその他の観察研究

膀胱癌に係る観察研究として以下のような報告がある。なお、IARC ワーキンググループは、こうした一般人口集団での死亡率や発生率を基にした研究について、(i) 一般人口中に占める人工甘味料大量摂取者の割合は小さいこと、(ii) 一般人口の他の危険因子 (喫煙、職業等) への暴露の変化の影響を受けること、(iii) 医学的診断の早期実施又は改善が発生率の増加や死亡率の低下に寄与する可能性があることから、サッカリン類の摂取による膀胱癌発生率等の変化を把握するには感度は十分ではないことを指摘している。(参照 3 2)

(a) Burbank & Fraumeni (1970) : 米国における膀胱癌死亡率の経時変化

IARC22における引用によれば、Burbank & Fraumeni (1970) は、1950～1967年の米国における膀胱癌死亡率について、年齢ごと及び年齢で調整を行った上で、年次傾向の継続性を分析している。その結果、人工甘味料（主としてサイクラミン酸塩及びサッカリン類の10:1混合物）が市場に広く導入された1962年以降においても明確な変化は認められなかったとしている。また、コネティカット州及びニューヨーク州における膀胱癌発生率の年次傾向の継続性についても明確な変化は認められなかったとしている。（参照32）

(b) Armstrong & Doll (1974) : イングランド及びウェールズにおける膀胱癌死亡率の経時変化

IARC22における引用によれば、Armstrong & Doll (1974) は、1911～1970年のイングランド及びウェールズにおける膀胱癌死亡率についてコホート分析を実施している。その結果、男性及び女性のいずれにおいても、サッカリン類の市場導入による膀胱癌死亡率傾向の継続性の変化は認められなかったとしている。（参照32）

(c) Jensen & Kamby (1982) のデンマークにおける膀胱癌出生コホート研究

IARC73における引用によれば、Jensen & Kamby (1982) は、砂糖不足のためサッカリン類使用量が4～5倍に増加した1941～1945年のデンマークにおいて出生した者における膀胱癌発生について、その10年前に出生した者におけるそれと比較したところ、34歳以下の者に係る相対危険度は男性で1.0 (95%CI=0.7～1.6)、女性で0.3 (95%CI=0.1～1.0) であったとしている。（参照5）

c. その他の膀胱癌に係る疫学研究

(a) Auerbach & Garfinkel (1989) の膀胱組織標本を用いた断面研究

FAS32における引用によれば、Auerbach & Garfinkel (1989) は、膀胱について組織学的変化（細胞層の数、異型細胞核の程度及び頻度）が報告されていた282剖検例の膀胱組織標本6,503検体を検査し、人工甘味料の摂取と膀胱移行上皮の変化との間に相関は認められなかったとしている。（参照23）

② その他の疫学的知見

FAS17における引用によれば、NAS/NRC (1955) は、サッカリン類 (0.4～0.5 g/人/日) を15～24年間摂取した糖尿病患者に有害影響は認められなかったとしている。（参照10）

IARC22における引用によれば、Stoneら (1971) は、精神遅滞のない子供を出産した女性975例と、精神遅滞のある子供を出産した女性247例について調査を実施している。その結果、1959～1961年、1962～1964年及

び1965～1969年に出産した母親で妊娠中に人工甘味料を摂取していた者は、ダウン症及びその他の精神遅滞のある子供を出産した者では14/79例(17.7%)、26/115例(22.6%)及び19/53例(35.8%)、精神遅滞のない子供を出産した者では9/78例(11.5%)、35/242例(14.5%)及び141/655例(21.5%)であったとしている。IARCワーキンググループはこれら精神遅滞のある子供の出生に係るオッズ比を1.7、1.7及び2.0と算出している。そのほか、「行動の問題」の発生率が、人工甘味料を摂取した母親の子供で10/185例(5.4%)、摂取していない母親の子供で15/790例(2.0%)であり、骨・腰関節等の異常の発生率が、それぞれ9/185例(4.8%)、12/790例(1.5%)であったとしている。IARCワーキンググループは、年齢、出産経歴、喫煙、糖尿病罹患、社会経済的状態について調整がなされていないこと、人工甘味料の摂取の程度について把握されていないことから、本研究結果のみでは妊娠中の人工甘味料摂取の胎児への影響について結論を出すことはできないとしている。(参照32)

IARC22における引用によれば、Klineら(1978)は、自然流産(妊娠28週未満)した女性545例を症例とし、当該症例と最終月経時年齢の差が2歳以内になるようにマッチングを行った対照(妊娠28週後出産女性)308例を基に、サッカリンの摂取について症例対照研究を実施している。本人及びその夫の使用言語、婚姻状態、人種及び学歴において、症例と対照との間に有意な差はなかったが、職業的地位及び平均収入は症例の方がわずかに高く、対照中には主たる収入を公的扶助に拠っている者が症例よりも多かったとしている。これら職業的地位及び平均収入については調整がなされていないが、最終月経時の年齢、流産歴、喫煙及び体重については多変量ロジスティック回帰分析により調整を行ったとしている。その結果、サッカリン摂取に係るオッズ比は0.94(95%CI=0.5～1.8、該当摂取症例30例)であったとしている。IARCワーキンググループは、人工甘味料添加飲料・食品の摂取について把握されていないこと、サッカリンの摂取量及び摂取時期(妊娠前か妊娠中か)が明らかにされていないこと、染色体異常の大きい異常妊娠の場合には本人が気づかないままごく早期に流産する可能性があるがそうした事例が対照に含まれている可能性があることを指摘している。(参照32)

### ③ その他のヒトにおける知見

#### a. サッカリン類

Taub(1972)は、症例報告を根拠に、サッカリン類等のスルホンアミドの大量摂取は一般的に皮膚、消化管等にアレルギー反応を引き起こす可能性があることを指摘している。(参照10、155)

IARC73における引用によれば、Roberts & Renwick(1985)は、ヒト15例にサッカリンナトリウム(0、1g/人/日)を1か月間摂取させ、摂取の前後に尿中のインジカン(インドールの代謝物)を毎日測定したところ、対照群と投与群との間に有意な差を認めなかったとしている。(参照5)

#### b. 不純物

Chew & Maibach(1997)の報告によれば、BIT(0.002、0.01%含有水

溶性ジプロピレングリコール、0.1%含有ワセリン)を、皮膚疾患のない健康なヒト56例(18歳超)の上腕又は背中に2日間貼付し、3日目又は4日目に判定を行い、陽性者には3日間再貼付し、3日目又は4日目に判定を行うパッチテストが実施されている。その結果、0.01%以下の貼付で皮膚刺激性及びアレルギー反応を呈した者は認められなかったとされている。0.1%の貼付で初回に陽性とされた10/56例について再貼付を行ったところ、うち9例は陰性とされた。残る1例の陽性反応については、黄斑であったことから、アレルギー反応ではなく皮膚刺激性によるものであると推定されている。Chew & Maibachは、BITは0.1%の濃度で皮膚刺激性を有すること、本試験条件下においてBITは感作を誘発しないことを結論している。また、Chew & Maibachは、別途BITについての職業暴露に係る症例報告及びパッチテストに関する文献15報についてレビューを実施している。その結果、用量設定、対照群の設定、貼付期間及び観察時期、再試験の未実施といった不備があること等から、BITが皮膚刺激性を引き起こす最少用量及びBITの感作性の有無について結論が出されていない。(参照156)

#### ④ ヒトにおける知見のまとめ

以上のとおり、入手した膀胱癌に係る疫学的知見のほとんどは症例対照研究によるものであったが、サッカリン類摂取の有無について適切に把握がなされ、当該摂取による膀胱癌等の発生に係るオッズ比が有意な高値を示したものはHoweら(1980)及びCartwrightら(1981)の2報のみであると考えられた。これらのうち、Cartwrightらの報告については病院ベースの調査であるため対照の多くが有病例である。同じく病院ベースの調査であるSimonら(1975)及びNajemら(1982)の報告ではオッズ比の有意な増加を認めていない。一般的に病院ベースの調査は過小評価の危険性があると考えられるが、一般人口の代表性という面からも、これらの結果からサッカリン類の摂取による膀胱癌等の発生率の増加について明確な結論を得ることは困難である。一般人口を対照とした調査においては、Howeら(1980)の報告ではサッカリン類摂取による膀胱癌の発生に係るオッズ比の増加が認められているが、Møller-Jensenら(1983)及びRischら(1988)の報告では有意な増加は認められておらず、お互いに矛盾する結果となっている。Gallusら(2006)及びBosettiら(2009)の報告では、それ以外の様々な癌の発生に係るオッズ比について、サッカリン類の摂取に関連した増加は認められていない。

その他の膀胱癌に係る疫学研究に係る報告については、必ずしも感度が十分な調査デザインではないものの、サッカリン類等人工甘味料の摂取に係る膀胱癌及びその他の膀胱移行上皮病変の増加を示唆する結果は得られていない。

癌の発生以外に係る疫学研究として、精神遅滞児出産及び自然流産に係る症例対照研究等が実施されており、前者において1.0を上回るオッズ比が報告されているが、交絡因子について調整が行われていないこと、サッカリンの摂取の程度について把握されていないこと等から、サッカリン類の摂取による影響について解釈を行うことは困難である。

そのほか、疫学的知見以外の知見として、サッカリン類等の大量摂取によ