

試験の種類	動物種	動物数/群	投与量 (mg/kg 体重) (投与経路)	最大 無作用量 (mg/kg 体重)	最小 作用量 (mg/kg 体重)	結果の概要	
血液	溶血 凝固	日本 白色種 ウサギ	雄 3	0, 78.1, 313, 1,250 (経口)	313	1,250	血漿 Hb 濃度及び PT 時間の極軽微 な増加

注) 検体は、経口投与試験及び腹腔内投与試験では 5%Tween80 水溶液に懸濁して用いた。

8. 急性毒性試験

アラクロール (原体) の急性毒性試験が実施された。結果は表 10 に示されている。(参照 8)

表 10 急性毒性試験結果概要 (原体)

投与 経路	動物種	LD ₅₀ (mg/kg 体重)		観察された症状
		雄	雌	
経口	SD ラット 雌雄各 5 匹	1,500	1,150	鼻汁、流涎、眼分泌物、糞尿による着染、運動失調、軟便、摂餌量減少 雌雄：930 mg/kg 体重以上で死亡例
	dd マウス 雄 10 匹	1,100		運動低下、呼吸促迫、横転、振戦、痙攣 845 mg/kg 体重以上で死亡例
経皮	NZW ウサギ 雌雄各 2 匹	13,300	13,300	浮腫を伴った紅斑、活動低下、運動失調、鼻汁 雌雄：11,000 mg/kg 体重以上で死亡例
	dd マウス 雄 10 匹	>3,000		症状及び死亡例なし
吸入	SD ラット 雌雄各 5 匹	LC ₅₀ (mg/L)		分泌性刺激、軽度の呼吸刺激作用 死亡例なし
		>1.04	>1.04	

代謝物[48]ナトリウム塩のラット (系統・雌雄不明) を用いた急性経口毒性試験が実施され、LD₅₀ は 6,000 mg/kg 体重より高かった。(参照 18)

9. 眼・皮膚に対する刺激性及び皮膚感作性試験

NZW ウサギを用いた眼刺激性試験及び皮膚刺激性試験が実施された。その結果、アラクロールは眼及び皮膚に対して軽度の刺激性を示した。

Hartley モルモットを用いた皮膚感作性試験 (Buehler 法) が実施された結果、アラクロールは皮膚感作性を示した。(参照 5、9)

10. 亜急性毒性試験

(1) 90日間亜急性毒性試験（マウス）

ICR マウス（一群雌雄各 10 匹）を用いた混餌（原体：0、1,000、1,500、2,000 及び 2,500 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、2,500 ppm 投与群の雌で肝絶対及び比重量の増加が、2,000 ppm 以上投与群の雄で肝絶対及び比重量⁴増加が、それぞれ認められたので、無毒性量は雄で 1,500 ppm（274 mg/kg 体重/日）、雌で 2,000 ppm（504 mg/kg 体重/日）であると考えられた。（参照 9）

(2) 6か月間亜急性毒性試験（イヌ）

ビーグル犬（一群雌雄各 6 匹）を用いたカプセル経口（原体：0、5、25、50 及び 75 ⁵mg/kg 体重/日）投与による 6 か月間亜急性毒性試験が実施された。

各投与群に認められた毒性所見は表 11 に示されている。5 mg/kg 体重/日投与群の雄で肝比重量の増加が認められたが、対応する病理組織学的所見及び血液生化学的検査項目の変化が観察されなかったことから、毒性影響とは考えられなかった。

本試験において、25 mg/kg 体重/日以上投与群の雌雄で死亡率増加等が認められたので、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 5、9）

表 11 6か月間亜急性毒性試験（イヌ）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
75 mg/kg 体重/日	・全動物死亡	
50 mg/kg 体重/日以上	・TP 減少 ・肝絶対重量増加 ・肝胆管増生	・肝脂肪変性
25 mg/kg 体重/日以上	・死亡率の増加 ・体重減少、摂餌量及び食餌効率減少 ・ALT、ALP、BUN 増加 ・肝比重量増加 ・肝脂肪変性	・死亡率の増加 ・体重減少、摂餌量及び食餌効率減少 ・ALT、ALP 増加、TP 減少 ・肝比重量増加 ・肝胆管増生
5 mg/kg 体重/日	毒性所見なし	毒性所見なし

(3) 21日間亜急性経皮毒性試験（ウサギ）

NZW ウサギ（一群雌雄各 10 匹）を用いた経皮（原体：0、200、1,000 及び

⁴ 体重比重量を比重量という（以下同じ）。

⁵ 試験開始時は、0、25、50 及び 100 mg/kg 体重/日で投与群が設定されたが、試験開始 3 週間後に 100 mg/kg 体重/日投与群で重篤な臨床症状が観察されたため、最高用量が 75 mg/kg 体重/日とされた。また、投与開始後 7 週間で、無毒性量が設定できないことが明らかとなったため、5 mg/kg 体重/日投与群が設定された。この群の設定と同時に、新たな対照群が設定された。

4,000 mg/kg 体重/日、6 時間/日、5 日/週) 投与による 21 日間亜急性経皮毒性試験が実施された。

4,000 mg/kg 体重/日投与群の雌で死亡率の増加が、1,000 mg/kg 体重/日以上投与群の雌雄で潰瘍性皮膚炎が認められたので、本試験における無毒性量は雌雄とも 200 mg/kg 体重/日であると考えられた。(参照 9)

(4) 90 日間亜急性毒性試験 (ラット及びマウス) <参考資料>

SD ラット及び ICR マウス (一群雌雄各 10 匹) を用いた混餌 (原体: 0、100、200、400 及び 800 ppm、給餌量: ラット雄: 25 g/日、ラット雌: 20 g/日、マウス雌雄: 5 g/日) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

ラットでは、検体投与の影響は認められなかった。

マウスでは、400 ppm 以上投与群の雌で腎絶対及び比重量増加が、200 ppm 以上投与群の雌で肝絶対及び比重量の増加が認められた。

(参照 9)

(5) 91 日間亜急性毒性試験 (ラット) (代謝物[48]ナトリウム塩)

F344 ラット (生物及び匹数不明) を用いた飲料水 (原体: 0、200、2,000 及び 10,000 ppm、平均検体摂取量は表 12 参照) 投与による 91 日間亜急性毒性試験が実施された。

表 12 91 日間亜急性毒性試験 (ラット) (代謝物[48]ナトリウム塩) の平均検体摂取量

投与群		200 ppm	2,000 ppm	10,000 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	16	157	896
	雌	23	207	1,110

本試験において、10,000 ppm 投与群雌雄で自発運動減少、呼吸促進、浅呼吸、糞減少、脱水、尿汚染、削瘦、円背、粗毛、眼の分泌物、眼周囲の脱毛並びに前肢、眼、口及び鼻周囲の汚れが、同投与群雄ではこれらの所見に加え体重増加抑制が認められたことから、無毒性量は、雌雄とも 2,000 ppm (雄: 157 mg/kg 体重/日、雌: 207 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 18)

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 6 匹) を用いたカプセル経口 (原体: 0、1、3 及び 10 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 13 に示されている。

本試験において、3 mg/kg 体重/日以上投与群の雌雄で下痢、粘液便、流涎等

が認められたので、無毒性量は雌雄とも 1 mg/kg 体重/日であると考えられた。
(参照 5、9)

表 13 1 年間慢性毒性試験試験（イヌ）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
10 mg/kg 体重/日	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制 ・ RBC、Hb 及び Ht 減少、網状赤血球数及び MCV 増加 ・ 肝絶対及び比重量増加 ・ 肝門脈又は脈管周辺肝細胞へモジデリン沈着 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 死亡（1 例）
3 mg/kg 体重/日以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ 下痢、粘液便、流涎 ・ 脾臓及び腎臓のへモジデリン沈着 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 下痢、粘液便、流涎
1 mg/kg 体重/日	毒性所見なし	毒性所見なし

（2）2 年間慢性毒性/発がん性併合試験（ラット）①

Long-Evans ラット（一群雌雄各 50 匹）を用いた混餌（原体：0、14、42 及び 126 mg/kg 体重/日）投与による 2 年間（雄：27 か月間、雌：25 か月間）慢性毒性/発がん性併合試験が実施された。

各投与群に認められた毒性所見は表 14 に、投与により増加した腫瘍性病変の発生頻度は表 15 に示されている。

胃で認められた腫瘍について、パネルミーティング⁶による再評価が実施された。結果は表 16 に示されている。胃で認められた腫瘍の多くは神経内分泌細胞（ECL 細胞）由来の悪性神経内分泌細胞腫と診断され、126 mg/kg 体重/日投与群では、雌雄において腺胃腫瘍発生動物数及び悪性神経内分泌細胞腫発生頻度の有意な増加が認められた。

本試験において、14 mg/kg 体重/日以上投与群の雌雄でぶどう膜の障害等が認められたので、無毒性量は雌雄とも 14 mg/kg 体重/日未満であると考えられた。

（胃腫瘍の再評価については[14. (7)⑨]参照、胃、鼻腔及び甲状腺の腫瘍発生機序については[14. (7)]参照）（参照 5、9、12）

⁶ アラクロール及び類似物質ブタクロールで認められた胃腫瘍について、一貫性のある診断を実施し、腫瘍がどのような細胞を起源としたものか明らかにするために、病理学専門家によるパネルミーティングが開催された（2009 年 5 月）。ミーティングでは既存の HE 染色、NSE 染色及びクロモグラミン A 染色標本を用い、アラクロール及びブタクロールにおける長期試験で認められた胃腫瘍について再評価が実施された[11. (2)及び(4)並びに 14. (7)]。

表 14 2年間慢性毒性/発がん性併合試験（ラット）で認められた毒性所見
（非腫瘍性病変）

投与群	雄	雌
126 mg/kg 体重/日	<ul style="list-style-type: none"> ・角膜混濁 ・肝絶対及び比重量増加、脾比重量増加 ・白内障、網膜変性、虹彩萎縮 ・膀胱移行上皮過形成 	<ul style="list-style-type: none"> ・角膜混濁 ・肝及び脾絶対及び比重量増加 ・白内障、網膜変性、虹彩萎縮 ・肝細胞細胞質層状構造 ・小葉中心性肝細胞壊死 ・肝表面（Dimpling of liver surface）の陥凹 ・膀胱移行上皮過形成
42 mg/kg 体重/日以上	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・小葉中心性肝細胞肥大 ・肝細胞細胞質すりガラス様変性 ・肝細胞細胞質層状構造 ・小葉中心性肝細胞壊死 	<ul style="list-style-type: none"> ・甲状腺絶対及び比重量増加 ・小葉中心性肝細胞肥大 ・肝細胞細胞質すりガラス様変性
14 mg/kg 体重/日以上	<ul style="list-style-type: none"> ・死亡率増加 ・ぶどう膜の障害 	<ul style="list-style-type: none"> ・死亡率増加（42 mg/kg 体重/日投与群を除く） ・飲水量減少 ・ぶどう膜の障害

表 15 腫瘍性病変の発生頻度（全動物）

投与群(mg/kg 体重/日)	雄				雌			
	0	14	42	126	0	14	42	126
腺胃 検査動物数	49	50	50	50	50	50	50	49
平滑筋腫	0	0	0	1	0	0	0	1
骨肉腫	0	0	0	3	0	0	0	4
胃腺癌	0	0	0	2	0	0	0	1
悪性混合胃腫瘍	0	0	0	11**	0	0	1	17**
鼻腔 検査動物数	46	46	41	42	49	47	45	48
腺腫(呼吸上皮)	0	0	10**	23**	0	0	4*	10**
腺癌(呼吸上皮)	0	0	1	0	0	0	1	0
甲状腺 検査動物数	48	50	49	50	49	44	46	49
ろ胞腺腫	1	0	1	11**	0	0	2	2
ろ胞腺癌	0	0	0	2	0	0	0	2

Fisher の直接確率法、* : p<0.05、** : p<0.01

表 16 パネルミーティングの再評価による胃腫瘍診断名及び発生頻度

投与群(mg/kg 体重/日)	雄				雌			
	0	14	42	126	0	14	42	126
胃:検査動物数	49	50	50	50	50	50	50	49
・限局性粘膜過形成を伴った胃炎	0	0	0	1	0	0	0	0
・神経内分泌細胞過形成	0	0	0	1	0	0	0	0
腺胃腫瘍発生動物数	0	0	0	15**	0	0	1	23**
・骨肉腫	0	0	0	1#	0	0	0	2#
・悪性混合胃腫瘍	0	0	0	4#	0	0	1#	1#
・悪性神経内分泌細胞腫	0	0	0	10*	0	0	0	20**

注) 8 例については再評価できなかったため、オリジナルの診断名で分類した。

#: 再評価できず、オリジナルの診断名で分類
Fisher の直接確率検定法 *: $p<0.01$ 、**: $p<0.001$

(3) 2年間慢性毒性/発がん性併合試験②(ラット)

先に実施された2年間慢性毒性/発がん性併合試験(ラット)[12.(2)]において雌雄とも無毒性量が設定できなかったため、Long-Evansラット(一群雌雄各50匹)を用いた混餌(原体:0、0.5、2.5及び15 mg/kg 体重/日)投与による2年間慢性毒性/発がん性併合試験(2年間慢性毒性/発がん性併合試験①の追加試験)が実施された。

15 mg/kg 体重/日投与群の雌で死亡率増加傾向及びびどう膜変性が認められた。病理組織学的検査において、非腫瘍性病変として、15 mg/kg 体重/日投与群の雌雄で鼻粘膜下腺過形成及び鼻腔の炎症が認められた。

鼻腔呼吸上皮腺腫及び胃の腺癌の発生頻度については、表17に示されている。

中間用量群である2.5 mg/kg 体重/日投与群の雄1例に胃の腺癌が認められたが、高用量群(15 mg/kg 体重/日)では同腫瘍の発生はなく、また、ラットを用いた2年間慢性毒性/発がん性併合試験①[11.(2)]の低用量群(14 mg/kg 体重/日)で認められなかったことから、投与に関連しないと考えられた。また、2.5 mg/kg 体重/日投与群の雌1例で呼吸上皮腺腫が認められたが、同群では鼻腔の炎症又は過形成が認められないことから、投与に関連しないと考えられた。

本試験において、15 mg/kg 体重/日投与群の雌雄で鼻腔の腫瘍等が認められたので、無毒性量は雌雄とも2.5 mg/kg 体重/日であると考えられた。(参照5、9)

表17 鼻腔呼吸上皮腺腫及び胃腺癌の発生頻度(全動物)

投与群(mg/kg 体重/日)	雄				雌			
	0	0.5	2.5	15	0	0.5	2.5	15
検査動物数	50	50	50	50	49	50	50	49
鼻腔呼吸上皮腺腫	0	0	0	11**	0	0	1	9**
胃腺癌	0	0	1	0	0	0	0	0

Fisher の直接確率法、**: $p<0.01$

(4) 2年間慢性毒性/発がん性併合試験③(ラット)

先に実施された2年間慢性毒性/発がん性併合試験(ラット)①[12.(2)]において雌雄で認められた腫瘍及び眼病変について、回復効果及び潜伏期間を検討するため、Long-Evansラット(投与群:雌雄各100匹、対照群:雌雄各6匹)を用いた最長2年間混餌(原体:0及び126 mg/kg 体重/日)投与による慢性毒性/発がん性併合試験(追加試験)が実施された。各試験群及び試験条件は表18に示されている。

表 18 試験群及び試験条件

試験群	試験条件	個体数
I 群	試験終了時まで検体を混餌投与。8～24 か月後に死亡又はと殺した動物	雄 70 匹、雌 31 匹
II 群	試験開始時から 8 か月後まで検体を混餌投与。混餌投与開始 5～8 か月後に死亡又はと殺した動物	雄 10 匹、雌 20 匹
III 群	試験開始から 5～6 か月間混餌投与後、試験終了時まで基礎飼料を給餌した動物	雄 20 匹、雌 49 匹

I～III群の死亡率は表 19 に示されている。

I 群の雌は、III群の雌に比べて、体重増加抑制が認められた。

I 群雄において同系統の背景データと比較して副腎、肝及び甲状腺絶対重量の増加が認められた。雌は背景データが少なく、比較できなかった。

各試験群で認められた病理所見は、表 20 に示されている。

III群の雌雄で眼の病変が認められたことから、アラクロール投与による眼の変化は、投与を停止しても回復しないことが示唆された。

病理組織学的検査において、非腫瘍性病変として、III群の雌の約半数、I 群の雌全例に眼の網膜症が認められた。雄では、眼の病変に関しては雌より罹患率が低かった。I 群及びIII群の雌雄で骨髄球系細胞過形成が、I 群の雄及びIII群の雌雄で変異肝細胞巣及び鼻甲介粘膜下腺過形成等も認められた。

腫瘍の発生頻度は表 21 に示されている。I 群では雌雄とも腺胃の癌肉腫が認められたことから、腺胃の腫瘍は長期投与によって発生したものと考えられた。また、甲状腺腺腫及び腺癌も、投与期間の長期化により発生が増加すると考えられた。

また、胃腫瘍に関するパネルミーティングによる再評価結果は表 22 に示されている。(参照 5、9、12)

表 19 2年間慢性毒性/発がん性併合試験③(ラット)における死亡率

	雄			雌		
	I 群	II 群	III 群	I 群	II 群	III 群
個体数 (匹)	70	10	20	31	20	49
死亡率 (%)	74	—	70	87	—	67

表 20 各群で認められた病理所見（非腫瘍性病変）

投与量	試験群	雄	雌
126 mg/kg 体重/日	I 群	<ul style="list-style-type: none"> ・眼両眼房への血漿の漏出 ・鼻粘膜下腺増生、前胃及び膀胱粘膜の増生 ・甲状腺ろ胞上皮嚢胞/腺腫様嚢胞 	<ul style="list-style-type: none"> ・眼小型化及び角膜混濁 ・眼虹彩、網膜内のメラニン色素過剰 ・眼球萎縮及び崩壊 ・網膜変性及び剥離 ・白内障/水晶体線維変性 ・水晶体鉍質化/眼房への漏出
	II 群	<ul style="list-style-type: none"> ・眼変性性病変 	<ul style="list-style-type: none"> ・眼変性性病変
	III 群	<ul style="list-style-type: none"> ・眼変性性病変 ・肝変異肝細胞巣 ・鼻粘膜下腺の増生 	<ul style="list-style-type: none"> ・眼変性性病変 ・肝退色、変性巣及び腫瘍 ・胃及び鼻の腫瘍 ・甲状腺肥大 ・鼻粘膜下腺の増生

表 21 2年間慢性毒性/発がん性併合試験③（ラット）における腫瘍の発生頻度

		I 群				III 群			
		雄		雌		雄		雌	
投与量 (mg/kg 体重/日)		0	126	0	126	0	126	0	126
鼻腔/ 鼻 甲 介	検査匹数	4	61	4	25	4	17	4	46
	乳頭状腺腫	0	42*	0	11	0	10	0	19*
	腺癌	0	7	0	2	0	0	0	1
胃	検査匹数	4	68	4	31	4	20	4	48
	腺胃腫瘍発生动物数	0	3	0	19*	0	0	0	1
	混合癌肉腫 (Mixed Carcinosarcoma)	0	2	0	6	0	0	0	0
	退形成肉腫 (Anaplastic Sarcoma)	0	1	0	1	0	0	0	0
	腺癌	0	0	0	3	0	0	0	0
	平滑筋肉腫	0	0	0	3	0	0	0	0
	未分化的肉腫	0	0	0	5	0	0	0	0
	未分化の癌	0	0	0	1	0	0	0	1
甲 状 腺	検査匹数	4	68	4	31	4	10 ¹⁾	4	49
	ろ胞腺腫	1	8	0	4	1	1	0	2
	ろ胞腺癌	0	10	0	0	0	1	0	2

Fisher の直接確率法 * : p<0.05

1) : 甲状腺小胞状腺癌に関しては、検査匹数は 20 例

表 22 パネルミーティングの再評価による胃腫瘍診断名及び発生頻度

投与量 (mg/kg 体重/日)	雄		雌		
	0	126	0	126	
I 群	再評価動物数 ¹⁾	0	3	0	17*
	・悪性神経内分泌細胞腫	0	3	0	17*
III 群	再評価動物数	0	0	0	1
	・悪性神経内分泌細胞腫	0	0	0	1

Fisher の直接確率法 * : p<0.05

注) 1) : I 群又はIII群において胃に腫瘍が認められた個体のうち、パネルミーティングによる再評価に供された動物数。I 群の 126 mg/kg 体重投与群の雌で、未分化の肉腫と診断されたうち 2 例は、再評価に供されなかった。

(5) 18 か月間発がん性試験 (マウス) ①

ICR マウス (一群雌雄各 60 匹) を用いた混餌 (原体 : 0、100、400 及び 1,600 ppm) 投与による 18 か月間発がん性試験が実施された。

死亡率に検体投与の影響は認められなかった

各投与群で認められた毒性所見は表 23 に示されている。

検体投与に関連して発生頻度の増加した腫瘍性病変は認められなかった。肺の細気管支・肺胞腺腫が 400 ppm 投与群の雄において統計学的に有意な増加を示した。しかし、1,600 ppm 投与群の雄では発生頻度に対照群と有意な差は認められなかったため、用量相関性は認められなかったことから、400 ppm 群における増加は、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、400 ppm 以上投与群の雄で小葉中心性肝細胞肥大が、1,600 ppm 投与群の雌で肝絶対及び比重量増加等が認められたので、無毒性量は雄で 100 ppm (16.4 mg/kg 体重/日)、雌で 400 ppm (90.3 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 5、9)

表 23 18 か月間発がん性試験 (マウス) ①で認められた毒性所見 (非腫瘍性病変)

投与群	雄	雌
1,600 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・肝絶対及び比重量増加 ・鼻甲介嗅上皮好酸性化 ・慢性腎炎 ・腎尿細管上皮鉍質沈着 	<ul style="list-style-type: none"> ・肝絶対及び比重量増加 ・胸骨線維性骨異栄養症
400 ppm 以上	・小葉中心性肝細胞肥大	400 ppm 以下毒性所見なし
100 ppm	毒性所見なし	

(6) 18 か月間発がん性試験 (マウス) ②

ICR マウス (一群雌雄各 50 匹) を用いた混餌 (原体 : 0、26、78 及び 260 mg/kg 体重/日) 投与による 18 か月間発がん性試験が実施された。

死亡率に検体投与の影響は認められなかった。

各投与群で認められた毒性所見は表 24 に示されている。

検体投与に関連して発生頻度の増加した腫瘍性病変は認められなかった。

本試験において、78 mg/kg 体重/日以上投与群の雄で腎絶対及び比重量増加が、260 mg/kg 体重/日投与群の雌で肝絶対及び比重量増加等が認められたので、無毒性量は雄で 26 mg/kg 体重/日、雌で 78 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 9）

表 24 18 か月間発がん性試験（マウス）②で認められた毒性所見（非腫瘍性病変）

投与群	雄	雌
260 mg/kg 体重/日	・飲水量増加 ・肝絶対及び比重量増加	・体重増加抑制 ・飲水量増加 ・肝絶対及び比重量増加
78 mg/kg 体重/日以上	・腎絶対及び比重量増加	78 mg/kg 体重/日以下、毒性所見なし
26 mg/kg 体重/日	毒性所見なし	

1 2. 生殖発生毒性試験

(1) 3 世代繁殖試験（ラット）

SD ラット（一群雄各 12 匹、雌 24 匹）を用いた混餌（原体：0、3、10 及び 30 mg/kg 体重/日）投与による 3 世代繁殖試験が実施された。各世代とも 2 回交配及び出産させ、2 回目の出産による児動物（F_{1b} 及び F_{2b}）を次世代の親動物とした。

親動物では、死亡率、体重変化に検体投与の影響は認められなかった。30 mg/kg 体重/日投与群の雄（F₂ 世代）で腎絶対及び比重量増加並びに慢性腎炎増加が、同群の雌で卵巣絶対重量及び対脳重量比の減少（P 世代）並びに腎絶対重量増加（F₂ 世代）が認められた。

児動物では、30 mg/kg 体重/日投与群（F_{3b} 世代雄）において腎比重量増加が認められた。

本試験における無毒性量は、親動物の雌雄及び児動物で 10 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 9）

(2) 発生毒性試験（ラット）

SD ラット（一群雌 25 匹）の妊娠 6～19 日に強制経口（原体：0、50、150 及び 400 mg/kg 体重/日、溶媒：コーン油）投与し、発生毒性試験が実施された。

母動物では 400 mg/kg 体重/日投与群で死亡（4 例）、肛門及び生殖器周辺の被毛のもつれ、着色、脱毛、鼻口部及び前肢の乾性赤色物質、軟便並びに体重増加抑制が認められた。

胎児では 400 mg/kg 体重/日投与群で初期及び後期胚吸収の軽微な増加による平均着床後死胚数の軽微な増加並びに平均生存胎児数減少が認められた。

本試験における無毒性量は、母動物及び胎児で 150 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 5、9)

(3) 発生毒性試験 (ウサギ)

NZW ウサギ (一群雌 18 匹) の妊娠 7~19 日に強制経口 (原体: 0、50、100 及び 150 mg/kg 体重/日、溶媒: コーン油) 投与し、発生毒性試験が実施された。

母動物では、150 mg/kg 体重/日投与群で体重増加抑制及び摂餌量減少が認められた。

胎児では、検体投与の影響は認められなかった。

本試験の無毒性量は母動物で 100 mg/kg 体重/日、胎児で 150 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 5、9)

(4) 発生毒性試験 (ラット) (代謝物[48]ナトリウム塩)

SD ラット (匹数不明) の妊娠 6~15 日に強制経口 (原体: 0、150、400 及び 1,000 mg/kg 体重/日、溶媒: コーン油) 投与し、発生毒性試験が実施された。

検体投与による影響は認められなかったことから、無毒性量は母動物及び胎児とも本試験の最高用量である 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 18)

1.3. 遺伝毒性試験

アラクロール (分析用標準品及び原体) の遺伝毒性に関しては、標準的な試験を始め、多くの種類の試験が実施されており、結果は表 25 に示されている。DNA 傷害誘発性に関しては、枯草菌を用いる試験で陰性、*in vivo/in vitro* の UDS 試験においても総合判断として陰性、腫瘍が認められたラット鼻部でのコメットアッセイでも陰性であり、DNA に直接傷を付けるものではないものと考えられた。細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる *Hgpert* 試験の結果は陰性であり、遺伝子突然変異誘発性はないものと考えられた。一方、*in vitro* における染色体異常誘発性に関しては、複数の試験で陽性が確認された。ただし、ラット及びマウスを用いて、最大耐量まで実施された、*in vivo* における染色体異常誘発性を検出する試験系においては全て陰性であり、*in vitro* で観察された染色体異常誘発が生体内で起こるとは考え難い。また、鼻部腫瘍が遺伝毒性に起因するとも考え難い。以上を総合的に判断すると、アラクロールに生体にとって問題となる遺伝毒性はないものと考えられた。(参照 5、9)

表 25 遺伝毒性試験概要 (分析用標準品及び原体)

試験	対象	処理濃度・投与量	結果	
in vitro	DNA 修復試験*	<i>Bacillus subtilis</i> (H17、M45 株)	20~2,000 µg/7 [°] 1株	陰性
	復帰突然変異試験*	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538 株) <i>Escherichia coli</i> (WP2 <i>hcr</i> 株)	10~5,000 µg/7 [°] レット (+/-S9)	陰性
	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538 株)	50~5,000 µg/7 [°] レット (+/-S9) ラット、マウス、サル nasal turbinate S9 使用	陰性
	遺伝子突然変異試験 (Hprt 遺伝子座)	チャイニーズハムスター 卵巣由来細胞 (CHO)	①15~200 µg/mL (+S9 2%) 15~150 µg/mL (-S9) ②30~330 µg/mL (+S9 5%)	陰性
	染色体異常試験	チャイニーズハムスター 肺由来細胞 (CHL/IL)	①5~20 µg/mL (+/-S9) ②20~80 µg/mL (+/-S9) マウス S9	陽性
		チャイニーズハムスター 卵巣由来細胞 (CHO)	1.25~20 µg/mL (+/-S9)	陽性
		ヒトリンパ球	1~40 µg/mL	陽性
		ヒトリンパ球	1~20 µg/mL	陽性
		ヒトリンパ球	①1~20 µg/mL (-S9) ②40~320 µg/mL (+/-S9) 動物由来 S9	陽性
		ヒトリンパ球 ヒトリンパ球	5~20 µg/mL 1~20 µg/mL	陽性 陽性
in vivo/ in vitro	UDS 試験	Fischer ラット (肝細胞) (一群雄 3 匹)	50、200、1,000 mg/kg 体重 (単回強制経口投与) (投与 2 及び 12 時間後にと殺)	陽性 ¹⁾
	UDS 試験*	Fischer ラット (肝細胞) (一群雄 5 匹)	50、200、500、1,000 mg/kg 体重 (単回経口投与) (投与 2 及び 12 時間後にと殺)	陰性 ²⁾
in vivo	小核試験	Long-Evans ラット (骨髄細胞) (一群雌雄各 5 匹)	150、300、600 mg/kg 体重 (単回腹腔内投与) (処理 24、48 及び 72 時間後にと殺)	陰性
		ICR マウス (骨髄細胞) (一群雄各 5 匹)	250、500、1,000 mg/kg 体重 (単回経口投与) (処理 24 及び 48 時間後にと殺)	陰性
	染色体異常試験	SD ラット (骨髄細胞) (一群雌雄各 24 匹)	100、330、1,000 mg/kg 体重 (単回経口投与) (投与 6、12 及び 24 時間後にと殺)	陰性
	コメットアッセイ	Wistar ラット (鼻部上皮細胞) (雄、使用匹数不明)	126 mg/kg 体重/日 (1 週間混餌投与)	陰性

注) +/-S9 : 代謝活性化系存在下及び非存在下 (特に記載の内場合はラット肝)

* : 分析用標準品を用いて試験が実施された。他の試験は原体が用いられた。

1) 1,000 mg/kg 体重投与群で UDS が誘発されたが、LD₅₀ 値に相当する用量群であり、動物個体差が大きく、また用量相関性も認められなかった。

2) 1,000 mg/kg 体重投与群では、個々のラット数例においては、弱い UDS 反応が誘発された可能性があった。

代謝物[19] (動物由来)、[24] (動物及び土壌由来)、[25] (動物、植物及び土壌由来)、[26] (動物、植物及び土壌由来)、[27] (動物及び植物由来)、[33] (動物及び土壌由来)、[34] (動物、植物及び土壌由来)、[35] (動物及び植物由来)、[39] (動物、土壌及び水中由来)、[48] (植物及び土壌由来)、[55] (植物由来)、[57] (植物由来)、[59] (植物及び土壌由来) 並びに代謝中間体[31]及び A の細菌を用いた復帰突然変異試験並びに代謝物[27]及び[48]のマウスを用いた小核試験が実施された⁷。

結果は表 26 に示されている。代謝物[27]、[35]及び代謝中間体 A は、細菌を用いた復帰突然変異試験において、*S. typhimurium* TA100 株に対し代謝活性化存在下及び非存在下で復帰突然変異誘発性を示した。代謝中間体 A は最高濃度で溶媒対照の 2 倍程度の弱い陽性反応であった。また、ラットの尿中の主要代謝物である代謝物[27]及び[35]についても、非常に高用量で溶媒対照の 2 倍程度の弱い陽性反応であったこと、アカゲザルによる体内運命試験では尿中の主要代謝物ではなかったこと、原体では陰性の結果であったこと等、これらの代謝物等に関して、生体にとって特段問題となる遺伝毒性があるとは考えがたい。代謝物[19]及び代謝中間体[31]は、細菌を用いた復帰突然変異試験において弱陽性の結果となっているが、アカゲザルによる体内運命試験では尿中の主要代謝物としては検出されていないこと、原体の結果等から、これらの代謝物では、生体にとって特段問題となる遺伝毒性があるとは考えがたい。その他の代謝物の試験結果は全て陰性であった。(参照 5、9、18)

表 26 遺伝毒性試験概要 (代謝物)

試験		対象	処理濃度	結果
代謝物[19]	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA100, TA1535 株)	20~10,000 µg/7 ⁷ レット (+/-S9) マウス nasal turbinate S 9 使用	弱 陽性
代謝物[24]	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100 株)	10~10,000 µg/7 ⁷ レット (+/-S9)	陰性
代謝物[25]	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100 株)	10~10,000 µg/7 ⁷ レット (+/-S9)	陰性
代謝物[26]	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100 株)	10~10,000 µg/7 ⁷ レット (+/-S9)	陰性

⁷ [48]、[55]及び[59]は、ナトリウム塩を用いた。

試験		対象	処理濃度	結果
代謝物[27]	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株)	10~10,000 µg/7 ^o レット (+/-S9)	陽性 ¹⁾
	小核試験	ICR マウス (骨髄細胞) (一群雄 5 匹)	1,250 mg/kg 体重 (単回腹腔内投与) (投与 24 及び 48 時間後に と殺)	陰性
代謝物[33]	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100 株)	10~10,000 µg/7 ^o レット (+/-S9)	陰性
代謝物[34]	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100 株)	10~10,000 µg/7 ^o レット (+/-S9)	陰性
代謝物[35]	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100 株)	10~10,000 µg/7 ^o レット (+/-S9)	陽性 ¹⁾
代謝物[39]	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株)	10~10,000 µg/7 ^o レット (+/-S9)	陰性
代謝物[48]	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株)	10~10,000 µg/7 ^o レット (+/-S9)	陰性
	小核試験	CD-1 マウス (骨髄細胞) (一群雄 5 匹)	500, 1,000, 2,000 mg/kg 体重 (単回強制経口投与) (投与 24 及び 48 時間後に と殺)	陰性
代謝物[55]	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株)	10~10,000 µg/7 ^o レット (+/-S9)	陰性
代謝物[57]	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株)	10~10,000 µg/7 ^o レット (+/-S9)	陰性
代謝物[59]	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株)	10~10,000 µg/7 ^o レット (+/-S9)	陰性
代謝中間体 [31]	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA1535 株)	20~10,000 µg/7 ^o レット (+/-S9) マウス nasal turbinate S9 使用	弱 陽性
代謝中間体 A	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100 株)	10~10,000 µg/7 ^o レット (+/-S9)	陽性 ²⁾

注) +/-S9 : 代謝活性化系存在下及び非存在下

1)TA100 に対し、代謝活性下系存在下及び非存在下で陽性

2)TA100 に対し、代謝活性下系存在下最高用量のみで陽性

1.4. その他の試験

(1) 全身オートラジオグラフィによる検討

アラクロールの組織中の局在及び蓄積性について種差を検討する目的で、全身オートラジオグラフィを実施した。

① ラット、マウス及びサル

Long-Evans ラット（一群雌 2 匹）、ICR マウス（一群雌 2 匹）及びリスザル（一群雄 2 匹）に[phe-¹⁴C]アラクロールを 7、70 若しくは 700 mg/kg 体重で単回経口投与し、又は Long-Evans ラット（一群雌 2 匹）に[phe-¹⁴C]アラクロール（乳剤に調製）を 7 若しくは 70 mg/kg 体重で単回経皮投与して、全身オートラジオグラフィが実施された。

経口投与群では、投与 24 時間後にはどの動物においても、血液中に放射能が存在し、ラット及びマウスで放射能の残存が認められた組織は、肝臓、腎臓、鼻毛、体毛、口唇部、舌の表面、歯外面及び歯根、眼窩周囲脂肪並びに眼窩周囲のハーダー腺であった。また、ラット及びマウスで腸及び鼻甲介に放射能の蓄積が認められたが、ラットにおいて特に顕著であった。投与 120 時間後には、血液中にラット及びマウスでは放射能が存在したが、サルでは検出されなかった。サルではラット及びマウスよりも組織中放射能濃度は低く、排泄が速やかで排泄率が高いことが示唆された。

経皮投与群では、経口投与群のラットと放射能の分布の違いは認められなかった。（参照 5、9）

② ラット及びハムスター

アラクロールの鼻部への局在を検討するために、Long-Evans ラット、SD ラット、Fischer ラット及びゴールデンハムスター（いずれも一群雌 2 匹）に[phe-¹⁴C]アラクロールを 7 又は 70 mg/kg 体重で単回経口投与し、全身オートラジオグラフィが実施された。

投与後 48 時間の尿及び糞中排泄率は表 27 に示されており、ラットでは系統により僅かな差が認められた。また、ゴールデンハムスターでは、主要排泄経路は尿中であった。

ラットでは、投与 24 時間後には、肝臓、肺、心臓、腎臓、副腎及び脾臓で放射能濃度が高く、また、放射能が鼻部に局在することが認められた。局在化は、Long-Evans ラットで最も顕著であり、SD ラット及び Fischer ラットでは Long-Evans ラットほどではなかった。

投与 120 時間後には、肝臓、腎臓、副腎、心臓及び肺で放射能濃度が高く、系統による差は認められなかった。SD ラット及び Fischer ラットでも鼻部への放射能の局在化が顕著となった。

ゴールデンハムスターでは、投与 24 時間後では糞、胃内容物、膀胱及び肝臓に放射能が分布し、投与 120 時間後では肝臓で放射能濃度が高かった。いずれの用量及び測定時期でも、鼻部組織への放射能の局在化は認められなかった。

（参照 5、9）

表 27 投与後 48 時間の尿及び糞中排泄率 (%TAR)

動物	Long-Evansラット		SDラット		Fischerラット		ゴールデンハムスター	
	尿	糞	尿	糞	尿	糞	尿	糞
排泄率	34.6	46.7	37.6	46.8	44.2	35.6	65.9	13.8

③ ラット (代謝物[24])

Long-Evans ラット (一群雌 2 匹) に ^{14}C -[24] を 0.7 又は 7.9 mg/kg 体重で単回経口投与し、全身オートラジオグラフィが実施された。

投与 24 時間後に、放射能濃度が最も高かったのは鼻甲介であった。また、投与量にかかわらず、胃、腸、肝臓、腎臓、眼窩及びハーダー腺に放射能が検出された。投与 120 時間後においても、放射能の鼻甲介への局在化は顕著であった。(参照 5、9)

④ ラット及びマウス (代謝物[19])

SD ラット及び ICR マウス (いずれも一群雌 2 匹) に ^{14}C -[19] (ジエチルアニリン) を 7 又は 70 mg/kg 体重で単回経口投与し、全身オートラジオグラフィが実施された。

ラットでは、投与 24 時間後に、鼻部への放射能の局在化が顕著に認められた。また、腸内容物、舌表面、食道内壁、肝臓、腎臓、心臓、肺、ハーダー腺等で放射能濃度が高かった。胃内壁にも放射能の局在化が認められたが、70 mg/kg 体重投与群よりも 7 mg/kg 体重投与群でより顕著であった。

マウスでは、投与 24 時間後に、いずれの投与群でも鼻部への局在化は認められなかった。胆嚢、舌の表面、食道内壁、腸内容物、肝臓、胃の内容物及び内壁、心臓、肺並びに腎臓で放射能濃度が高かった。マウスでは、ラットに比べ、肝臓への局在化がより顕著であった。(参照 5、9)

(2) *In vitro* 代謝試験

アラクロールの代謝経路をより詳細に検討し、また代謝に関する種差を明確化する目的で、*in vitro* 代謝試験が実施された。

① ラット (肝臓及び腎臓)

ラット (系統不明) 腎から調製した S9 画分又は肝サイトソール及びミクロソーム画分を、アラクロール又はアラクロール代謝物存在下、37°C でインキュベートする試験が実施された。

反応の基質、反応系及び生成物は表 28 に示されている。(参照 9)

表 28 *in vitro*代謝試験における基質、反応系及び生成物

基質	反応系	生成物
アラクロール	ラット肝サイトソール	[2]
	ラット肝マイクロソーム	[8]、[13]、[16]、[72]
	ラット肝マイクロソーム	[7]、[8]、[12]、[13]、[16]、[40]、[72]、 [73]
代謝物[2]	ラット腎S9	[3]、[4]、[5]
代謝物[13]	ラット肝マイクロソーム	[19]
代謝物[19]	ラット肝マイクロソーム	[68]、[74]
代謝物[68]	ラット肝サイトソール	[20]、[75]
代謝物[24]	ラット肝マイクロソーム	[25]、[26]、[27]、[30]
代謝物[26]	ラット肝マイクロソーム	[27]、[43]

② ラット（反復及び単回投与による影響）

アラクロールを 0 及び 700 mg/kg 体重で単回経口投与したラット 0 及び 350 mg/kg 体重/日で 15 日間反復経口投与したラット（系統、性別及び匹数不明）よりそれぞれ調製した、肝サイトソール及びマイクロソーム画分を、アラクロール存在下、37°Cでインキュベートする試験が実施された。

単回投与群では、サイトソール画分の代謝反応速度が増加したが、マイクロソーム画分は代謝反応速度に投与の影響は認められなかった。

反復投与群では、サイトソール画分及びマイクロソーム画分とも、代謝反応速度が 1.5～2.1 倍増加した。

単回投与群及び反復投与群のラットの肝臓 GSH 濃度を測定したところ、単回投与群では対照群に比べやや減少した（対照群の約 58%）が、反復投与群では増加した（対照群の約 181%）。（参照 9）

③ ラット、マウス及びサル（肝臓及び腎臓）

Long-Evans ラット（雄 1 匹、雌 2 匹）、ICR マウス（雌雄各 1 匹）及びアカゲザル（雄 2 匹、雌 1 匹）から調製した肝サイトソール及び肝マイクロソーム画分を、アラクロール存在下、37°Cでインキュベートする試験が実施された。

肝サイトソール（GST が含まれる）による反応速度は、雌雄マウスで最も大きく（59.8～68.8 nmol/分/mg タンパク）、次いで雄ラット（54.2 nmol/分/mg タンパク）、雌ラット（24.2～24.3 nmol/分/mg タンパク）、雌雄サル（11.0～16.0 nmol/分/mg タンパク）の順であった。

肝マイクロソーム（CYP が含まれる）による反応速度は、ラットでは雄で 17.5 nmol/分/mg タンパク、雌で 1.1～1.2 nmol/分/mg タンパクと、性差が大きかった。最も速度が大きかったのは雌マウス（23.2 nmol/分/mg タンパク）で、次いで雄ラット、雄マウス（10.2 nmol/分/mg タンパク）、雌雄サル（5.5～9.7 nmol/分/mg タンパク）、雌ラットの順であった。

また、雄ラット及びサルから調製した腎 S9 画分を、アラクロール存在下でインキュベートした試験では、ラットとサルに種差は認められなかった。しかし、腎及び肝 S9 画分をアラクロール及びアセチル CoA 存在下でインキュベートした試験では、ラットでは肝臓、腎臓ともに高い活性を示したのに対し、サルでは腎臓で僅かに活性を示し、肝臓ではほとんど活性がなかった。（参照 9）

④ ラット（肝臓、腎臓、肺、鼻部及び胃）

Long-Evans ラット（雄、匹数不明）から調製した肝臓、腎臓、肺、鼻甲介及び胃（前胃及び腺胃）の S9、ミクロソーム及びサイトソール画分を、アラクロール存在下、37°C でインキュベートする試験が実施された。

各組織における S9 画分（GST が含まれる）及びミクロソーム画分（CYP が含まれる）によるアラクロールとの反応活性を比較したところ、肝臓及び鼻甲介組織においては活性が高かったが（S9 画分、NADPH 存在下での反応初速度が、肝臓及び鼻甲介でそれぞれ 3.25 及び 1.41 nmol/分/mg タンパク）、ほかの組織では有意な反応は認められなかった（反応初速度が <0.1 nmol/分/mg タンパク）。腎組織でのみ、アラクロールのグルタチオン抱合体を分解する GGT 活性が認められた。

また、肝臓及び鼻甲介における様々な基質を用いた反応速度が比較された。結果は表 29 に示されている。

[19]から[68]が生成される速度は、肝臓より鼻甲介で大きかった。このことから、[19]から[68]を生成する CYP 活性が鼻甲介において肝臓より高いことが示唆された。[68]は更に酸化を受け、活性中間体 2,6-ジエチルベンゾキノニンイミン（DEBQI、代謝物[76]）が生成されることが知られている。（参照 5、9）

表 29 *in vitro* 代謝試験における肝臓及び鼻甲介の反応速度の比較

基質	生成物	画分	反応速度 (nmol/分/mgタンパク)	
			肝臓	鼻甲介
代謝物[8]	[7]	ミクロソーム	0.38	0.01
代謝物[68]	[46]	ミクロソーム	0.49	5.83
代謝物[13]	[19]	ミクロソーム	0.12	0.14
代謝物[19]	[68]	ミクロソーム	0.22	11.5
代謝物[24]	[27][35]	ミクロソーム	6.43	1.78
代謝物[68]	[20]	サイトソール	0.16	0.02

⑤ ラット及びマウス（肝臓及び鼻部）

Long-Evans ラット（雄 20 匹）及び ICR マウス（雄 100 匹）から調製した肝臓及び鼻甲介のミクロソーム及びサイトソール画分を、アラクロール存在下

でインキュベートする試験が実施された。

鼻甲介組織では、アラクロールの酸化による[8]の生成、[13]及び[24]からの[19]の生成、[19]からの[68]の生成に関しては、ラットでの反応初速度がマウスの2.2~63.9倍であった。

[68]は、主として[20]に代謝されて排泄されると考えられているが、[68]から[20]が生成される反応初速度は、マウスでは肝臓及び鼻部で同程度であったが、ラットでは肝臓での反応初速度が鼻部の8倍に達した。

以上から、ラットでは[76]の前駆体である[68]がマウスより多く生成し、さらに肝臓では[20]に代謝され排泄されやすいが、鼻部では滞留する可能性が示唆された。(参照5、9)

⑥ ラット、マウス及びサル (肝臓)

Long-Evans ラット (雄)、ICR マウス (雌) 及びアカゲザル (雄2匹、雌1匹) から調製した肝切片 (0.2 mm 厚) を、[phe-¹⁴C]アラクロール存在下 (0.05 及び 0.5 mM)、37°Cで4時間インキュベートする試験が実施された。

試験開始後2時間のアラクロール代謝速度は、ラット、マウス及びサルでそれぞれ0.17、0.19及び0.19 nmol/分/mgタンパクであった。0.05 mM添加群では、試験開始後2時間で、ラット、マウス及び雄サルで81~87% TAR、雌サルで98% TARのアラクロールが、試験開始後4時間では、全動物種で94.7~99.4% TARのアラクロールが、それぞれ代謝された。0.5 mM添加群では、試験開始後2時間で、ラット、マウス、雄サル及び雌サルでそれぞれ36.9、47.8、44.2及び53% TARのアラクロールが、4時間で45.3~50.3% TARのアラクロールが代謝された。

試験開始4時間後に、0.5 mM添加群では、未変化のアラクロールが51.9~54.7% TAR存在し、最も多い代謝物は、[8] (14.8~21.3% TAR)であったのに対し、0.05 mM添加群では、未変化のアラクロールは3.1~5.9% TAR存在し、最も多かったのは極性代謝物 (31.9~54.2% TAR) 及び2種類の未同定代謝物 (17.6~24.2 及び 6.7~13.4% TAR)であったことから、0.05 mM添加群の方が、より広範に代謝されたと考えられた。代謝物[2]、[8]及び[13]は、生成量は異なるものの、0.5 及び 0.05 mM添加群両方に存在した。

ラット、マウス及びサルで代謝物[2]の生成量は、それぞれ7.8、16.0及び0.9% TAR、未同定代謝物1の生成量は、それぞれ8.6、13.4及び6.7% TAR、極性代謝物の生成量は、それぞれ32.2、31.9及び54.2% TARであった。(参照5、9)

⑦ ラット及びサル (肝臓及び鼻部)

Long-Evans ラット (雄) 及びリスザル (雄2匹、雌1匹) から調製した肝臓及び鼻甲介のサイトソール及びマイクロソーム画分を、[phe-¹⁴C]アラクロール、

^{14}C -[19]又は ^{14}C -[31]存在下、 37°C でインキュベートする試験が実施された。

アラクロールのグルタチオン抱合化（反応 1）、[31]の加水分解による[19]の生成（反応 2）、[19]の水酸化による[68]の生成（反応 3）に関して、ラット及びサルの反応速度が表 30 に示されている。また、ラットとマウスを比較した試験[1. (11)⑤]の結果も表 30 に示されている。

また、熱変性処理した肝臓及び鼻部のサイトソール画分を用いた試験では、アラクロールがグルタチオンと非酵素的に反応した。

本試験及びラット及びマウスの比較試験[1. (11)⑤]の結果より、[31]から[19]を経由した[68]の生成速度を推定したところ、ラット鼻部組織でマウス鼻部組織の 38 倍、サル鼻部組織の 30 倍と算出された。この結果から、アラクロールから[76]が生成される速度が、ラットにおいてマウス及びサルよりも特異的に高いことが示唆された。また、サルでは[76]生成量が少ないために、ラットで観察された鼻部の腫瘍発生機序が霊長類には当てはまらないと考えられた。（参照 5、9）

表 30 ラット及びサルの肝臓及び鼻部の反応速度の比較

反応	組織	反応初速度 (nmol/分/mgタンパク)		ラット/サル比	ラット/マウス比*
		ラット	サル		
反応1	肝臓	19.5	4.98	3.9	0.5
	鼻部	3.43	0.03	114	0.8
反応2	肝臓	0.170	0.189	0.9	2.2
	鼻部	0.008	0.002	4.0	20.0
反応3	肝臓	0.802	0.268	3.0	0.3
	鼻部	1.54	0.20	7.6	1.9

注) *: ラット及びマウスの比較試験[1. (11)⑤]から得られた値

⑧ ラット及びヒト（肝臓及び鼻部）

Long-Evans ラット（雄）及びヒト（死亡した男性及び女性）から調製した肝臓及び鼻甲介のサイトソール及びマイクロソーム画分を、[phe- ^{14}C]アラクロール、 ^{14}C -[13]、 ^{14}C -[19]又は ^{14}C -[31]存在下、 37°C でインキュベートする試験が実施された。

ラット及びヒトの肝臓及び鼻甲介における GST 及び CYP の酵素活性を測定した。両酵素とも、ヒトでは鼻甲介よりも肝臓で活性が高かった。ヒトとラットの比較では、GST は、肝臓及び鼻甲介とも、ヒトとラットでほぼ同等の活性を示した。CYP は、ヒトの方が低く、肝臓ではラットの 5.3%、鼻甲介ではラットの 0.15%であった。

アラクロールのグルタチオン抱合化、[31]の加水分解による[19]の生成、[13]

の加水分解による[19]の生成、[19]の水酸化による[68]の生成に関して、ラット及びヒトの反応速度を比較した場合、いずれもヒトよりラットで大きかった。特に、鼻甲介におけるアラクロールのグルタチオン抱合化に関しては、ラット/ヒト比が 33、[19]から[68]の生成に関しては、ラット/ヒト比が 130 であった。それ以外の反応初速度は、ラット/ヒト比が 4.0~7.5 であった。

本試験の結果より、鼻部組織における、[31]から[19]を経由した[68]の生成速度を推定したところ、ラット/ヒト比は 753 と算出された。また、ラットとマウス又はサルとの比較試験[1. (11)⑤及び⑦]の結果と併せ、アラクロールから[68]が生成される速度を推定したところ、ラット/マウス比、ラット/サル比及びラット/ヒト比は、それぞれ 30、3,480、24,500 と算出された。(参照 5、9)

⑨ ラット及びヒト (鼻部、代謝物[33])

SD ラット (雄 24 匹) から調製した肝臓及び鼻部組織のミクロソーム画分、ヒト (12 例) より調製した鼻部組織の S9 又はミクロソーム画分を、 ^{14}C -[33]存在下 (0.025 mM)、37°C で 4 時間インキュベートする試験が実施された。

鼻部組織のミクロソーム画分によって ^{14}C -[33]は代謝され、[33]のパラヒドロキシ誘導体が生成された。ラット肝臓、ヒト鼻部組織では、代謝物は検出されなかった。(参照 9)

(3) 血液との相互作用

① 各血液画分におけるアラクロール分布 (ラット)

Long-Evans ラット (一群雄 5 匹) に[phe- ^{14}C]アラクロール及び ^{13}C -アラクロールの混合物を 7.4 若しくは 780 mg/kg 体重で単回経口投与し、8.04 若しくは 852 mg/kg 体重で単回経皮投与し、又は 219 mg/kg 体重/日で反復経口投与 (1 日 1 回、10 日間) して、各血液画分におけるアラクロールの分布が検討された。

単回経口及び経皮投与群では、投与 1 時間後より血液中に放射能が認められ、単回経口投与群では、投与 6~24 時間後に血漿及び血球中で C_{\max} に達し、その後血漿中の放射能濃度は減少した。 C_{\max} は投与量とほぼ比例関係にあった。単回経皮投与群では、血漿中の放射能濃度は減少せず、皮膚からの吸収が持続していることが示唆された。いずれの投与群も、血漿中より血球中の放射能濃度が高く、また、血球中の放射能濃度は減少が認められなかった。反復経口投与群では、初回投与 240 時間後に血漿中で C_{\max} に達した後、血漿中放射能濃度は減少したが、血球中放射能濃度は減少しなかった。(参照 9)

② 各血液画分におけるアラクロール分布 (ラット、マウス、サル及びヒト)

アラクロールを投与した Long-Evans ラット、マウス、サル及びヒト (ラット及びマウスの系統、サルの種、性別、例数、アラクロール投与法等詳細不

明)の血液を分画し、各画分における放射能の存在比率を検討された。

結果は表 31 に示されている。

ラットのヘモグロビンでは、ほかの動物種と比べ特異的にアラクロールの結合量が多いことが示された。(参照 9)

表 31 ラット、マウス、サル及びヒト血液の各画分ごとの放射能存在比率 (%)

	ラット	マウス	サル	ヒト
血漿画分	19.5	58.3	45.5	60.9
血漿のヘキササン抽出物	0.1	0.3	1.8	0.6
洗浄食塩水中	19.8	23.4	28.4	20.3
可溶性ヘモグロビン画分	55.3	15.9	19.8	15.8
細胞膜片	5.3	1.5	4.6	2.3

注) 血液中の全放射能に対する、各画分における放射能存在比率

(4) 復帰突然変異試験 (ラット尿)

Long-Evans ラット (一群雌 20 匹) にアラクロールを単回強制経口投与 (純度 99.7% : 0 及び 700 mg/kg 体重、溶媒 : コーン油) し、投与後 24 時間採取した尿を検体として、細菌を用いた復帰突然変異試験が実施された。また陽性対照として、2-アセチルアミノフルオレン (2-AAF) を単回静脈内投与したラットの尿を検体とした試験も実施された。

試験の概要は表 32 に示されている。

試験 I では、代謝活性化系 (S9) 及び抱合体分解酵素系 (β -グルクロニダーゼ/スルファターゼ) の存在下及び非存在下について試験を実施し、試験 II では、ヒスチジン (0.2 及び 0.3 mM) 添加区を設けてヒスチジンの影響が検討された。

試験 I 及び II の結果、アラクロール投与ラットの尿の復帰突然変異誘発性は陰性であった。2-AAF 投与ラットの尿は、TA98 株に対し、復帰突然変異誘発性陽性を示した。(参照 9)

表 32 復帰突然変異試験概要 (ラット尿)

試験	投与検体 (投与量)	動物数	対象	尿処理量
I	アラクロール (700 mg/kg 体重)	雌 4 匹	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株)	5~500 μ L/プレート
	2-AAF (20 mg/kg 体重)	雌 2 匹		
	溶媒 : コーン油	雌 4 匹		
II	アラクロール (700 mg/kg 体重)	雌 20 匹		

(5) 復帰突然変異試験 (ラット胆汁)

胆管カニューレを挿入した Long-Evans ラットにアラクロールを単回静脈内 (純度 99%以上 : 0 及び 70 mg/kg 体重、溶媒 : 80%エタノール水溶液) 投与し、

投与後 3 時間採取した胆汁を検体として、細菌を用いた復帰突然変異試験が実施された。また、陽性対照として、2-AAF を単回静脈内投与 (5 mg/kg 体重) したラットの胆汁を検体とした試験も実施された。

試験の概要は表 33 に示されている。

試験は、代謝活性化系 (S9) 及び抱合体分解酵素系 (β -グルクロニダーゼ/スルファターゼ) の存在下及び非存在下において実施された。

本試験の結果、アラクロール投与ラットの胆汁は、復帰突然変異誘発性陰性であった。2-AAF 投与ラットの胆汁は、TA98 株に対し、復帰突然変異誘発性陽性を示した。(参照 9)

表 33 復帰突然変異試験概要 (ラット胆汁)

投与検体 (投与量)	動物数	対象	胆汁処理量
アラクロール (70 mg/kg 体重)	雌 4 匹	<i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、 TA1535、 TA1537 株)	①TA98、TA100 : 10~200 μ L/プレート
2-AAF (5 mg/kg 体重)	雌 2 匹		②TA98、TA100
溶媒 : 80%エタノール水溶液	雌 3 匹		TA1535、TA1537 : 100、200 μ L/プレート

(6) 肝毒性及び細胞増殖に対する影響 (ラット)

ラットにアラクロールを急性投与した後の肝毒性、細胞増殖及び肝臓のグルタチオン (GSH) 濃度への影響を検討するために、Fischer ラット (一群雄 5 匹) にアラクロールを単回強制経口 (分析用標準品 : 0、50、200、500 及び 1,000 mg/kg 体重、溶媒 : コーン油) 投与し、投与 12 時間後の肝及び血清を試料として、試験が実施された。

50 mg/kg 体重以上投与群で、肝 GSH 濃度及び非タンパクスルフヒドリル濃度がそれぞれ対照群の 44~90 及び 36~70%に減少した。1,000 mg/kg 体重投与群では、血清中 ALT、AST 及び LDH が増加し、500 mg/kg 体重投与群でも増加傾向が認められた。

肝組織における細胞増殖活性を、増殖性細胞核抗原 (PCNA) 免疫染色の標識率を指標に測定したところ、増殖活性の有意な増加は認められなかった。

肝の病理組織学的検査においては、50 mg/kg 体重以上投与群で肝細胞空胞化が、500 mg/kg 体重以上投与群で肝細胞質の好酸球増加、肝細胞変性/壊死等の病変が認められた。

本試験における肝毒性に関する個々の動物間の変動は、Fischer ラットを用いた UDS 試験[14.]における動物間の変動と類似していたため、Fischer ラットで認められた弱い UDS 反応は、肝毒性に関連する可能性が示唆された。(参照 9)

(7) 発がんのメカニズム解明に関する特別試験

① 二段階発がん試験（ラット）

ラットの胃（腺胃胃底腺領域）における腫瘍発生に関して、アラクロールのプロモーション作用を検討するために、Long-Evans ラット（一群雌雄各 20 匹）を用い、*N*-メチル-*N*'-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン（MNNG：150 mg/kg 体重）又は DMSO（5 mL/kg 体重）を単回強制経口した後、アラクロール（原体：0、15 及び 126 mg/kg 体重/日）又はカテコール（8,000 ppm）を 1 年間混餌投与する二段階発がん試験が実施された。

試験群構成は表 34 に示されている。また、単回経口投与せず、基礎飼料を 1 年間給餌した群を N2 群とした。

表 34 二段階発がん試験（ラット）の試験群構成

単回経口投与検体	MNNG			DMSO	—	
投与量	150 mg/kg 体重			5 mL/kg 体重		
混餌投与検体	—	アラクロール		カテコール	基礎飼料のみ	
混餌投与量	—	15 mg/kg 体重/日	126 mg/kg 体重/日	8,000 ppm	126 mg/kg 体重/日	
群の名称	N	T1	T2	P	T3	N2

試験期間中 14 例が死亡したが、そのうち 10 例に胃の腫瘍が認められ、その 10 例中 4 例には腺胃に影響が認められた。

T2 及び T3 群の雌雄で眼の混濁が認められ、雄より雌で顕著であった。T3 群の雄を除き、全投与群で腹部の腫大が認められ、この所見が認められたラット全てで、胃又は腸において巨大な又は多数の腫瘍が認められた。P、T2 及び T3 群雌雄で体重増加抑制が認められた。

血清中ガストリン濃度を測定したところ、T3 群の雌雄で対照群に比べ増加し、雄で対照群の約 7 倍、雌で対照群の約 18 倍であった。

胃液分泌量、pH 及び胃酸分泌速度を測定したところ、T3 群の雌雄で胃液分泌量の減少、胃酸分泌速度の減少が認められた。同群の雌で胃液 pH の上昇が認められたが、対照群と統計学的に有意な差はなかった。

肉眼的病理検査では、N、T1、T2 及び P 群で前胃腫瘍の発生頻度が増加した。各群で認められた胃の腫瘍の発生頻度は表 35 に示されている。

本試験の結果より、アラクロールはプロモーション作用を示すことが明らかとなった。このプロモーション作用は、126 mg/kg 体重/日投与群にのみ認められ、15 mg/kg 体重/日投与群では認められなかった。アラクロールのみ混餌投与した群では、腺胃の腫瘍は認められなかった。また、この試験よりアラクロール

ルは神経内分泌細胞だけでなく、胃粘膜上皮の腫瘍も増加させる可能性が示唆された。(参照 9)

(胃粘膜萎縮については [14. (7)⑨] 参照)

表 35 各群で認められた胃の腫瘍の発生頻度

投与群	N		T1		T2		P		T3	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
胃底腺領域:										
腺腫/腺癌/未分化癌	1	0	0	0	6	12	0	1	0	3
混合腺腫	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1
線維腫	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
扁平上皮細胞乳頭腫	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
幽門腺領域:										
腺腫/腺癌	0	0	3	0	3	4	16	13	0	0
前胃:										
扁平/基底細胞腫瘍*	9	9	12	9	19	14	19	20	0	0
線維腫/線維肉腫	1	0	0	1	0	1	0	4	0	0
平滑筋肉腫	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
担腫瘍動物数										
腺胃 (胃底腺領域)	1	0	0	0	6*	14*	0	2*	0	4
前胃	9	9	12	10	19**	15**	19**	20**	0	0

注) #: 前胃にみられる 1 個以上の下記の腫瘍を含む:

扁平上皮乳頭腫、扁平上皮癌、原位置における癌、未分化腺及び基礎細胞癌

Fisher 直接法、片側検定 *: $p \leq 0.05$ **: $p \leq 0.01$

② 甲状腺ホルモンに対する影響 (ラット)

ラットを用いた 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験 [11. (2)] において、雌雄で甲状腺ろ胞腺腫及び腺癌の発生増加が認められたので、アラクロールの甲状腺ホルモンに対する影響を検討するために、Long-Evans ラット (一群雄 14 又は 20 匹) にアラクロールを 120 日間混餌 (原体: 0 及び 114~157 mg/kg 体重/日) 投与する試験が実施された。また、一部のラットでは、60 日間混餌投与後に 60 日間基礎飼料を給餌し、回復群とされた。

体重に検体投与の影響は認められなかった。

投与開始 7 日後以降試験終了時 (投与開始 120 日後) まで、アラクロール投与群で肝絶対重量の増加が、14 日後以降で甲状腺絶対重量の増加 (対照群の 121~126%) が認められた。この間、血清 TSH が有意に上昇 (対照群の 139~209%) していた。また、血清 T_3 値は増加 (対照群の 109~138%、投与開始 28 日後のみ対照群の 101%) したが、血清中 T_4 は一定の傾向を示さなかった。