

7. 急性毒性試験

トルフェンピラドのSDラットを用いた急性経口毒性試験、急性経皮毒性試験、急性吸入毒性試験、ICRマウスを用いた急性経口毒性試験が実施された。

急性経口毒性試験の結果、LD₅₀値は表7のとおりであった。

表7 トルフェンピラドの急性経口LD₅₀ (mg/kg 体重)

動物種	溶媒の種類	性別	
		雄	雌
ラット	CMC-Na 水溶液	260~386	113~150
	オリーブ油	86	75
マウス	CMC-Na 水溶液	114	107
	オリーブ油	80~100	50~80

経皮LD₅₀はラットの雄で>2000mg/kg 体重、雌で>3000mg/kg 体重、吸入LC₅₀はラットの雄で2.21mg/L、雌で1.50mg/Lであった。(参照 29~35)

8種類の代謝物についてSDラットを用いた急性経口毒性試験が実施された。結果は表8のとおりであった。(参照 36~45)

表8 トルフェンピラドの代謝物の急性経口LD₅₀ (mg/kg 体重)

代謝物	溶媒の種類	性別	
		雄	雌
PT-CA	CMC-Na 水溶液	27.4	15.4
	オリーブ油	62	54
OH-PT	CMC-Na 水溶液	70.8	35.5
	オリーブ油	30~60	
T-CA	CMC-Na 水溶液	600~2000	>2000
T-AM		>2000	
CA-T-CA			
PCA			
OH-T-CA		2024	>2000
OH-PAM		1095	

8. 眼・皮膚に対する刺激性及び皮膚感作性

ニュージーランド白色ウサギを用いた眼一次刺激性試験及び皮膚一次刺激性試験が実施されており、眼及び皮膚に対して軽度の刺激性が認められた。(参照 46~47)

ハートレー系モルモットを用いた皮膚感作性試験 (Maximization 法) が実施されてお

り、皮膚感作性は認められなかった。（参照 48）

9. 亜急性毒性試験

(1) 90 日間亜急性毒性試験（ラット）

Fischer ラット（一群雌雄各 10 匹）を用いた混餌（原体：0, 15, 80, 160ppm）投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

各投与群で認められた主な所見を表 9 に示す。

表 9 ラット 90 日間亜急性毒性試験で認められた所見

160ppm 投与群 雌雄	血清中無機リンの増加、ハーダー腺の褐色化、睪びまん性腺房細胞肥大
雄	摂餌量の減少、MCV、MCH 及び網状赤血球増加、TG 減少、脳、心、脾、副腎及び精巣体重比重量（以下「比重量」とする）増加、肝暗褐色化、腎近位尿細管上皮の硝子滴、ハーダー腺分泌亢進
雌	血小板減少、血清中 γ -GTP、尿素窒素増加、卵巣比重量減少、顎下腺腺房細胞肥大、大腿骨及び胸骨骨髓造血細胞減少、卵巣及び子宮の萎縮
80ppm 以上投与群 雌雄	体重増加抑制、血清中カリウム増加、肺比重量増加、腸間膜リンパ節の肥満細胞増加、びまん性肝細胞肥大
雄	腎比重量増加
雌	摂餌量の減少、MCV 増加、血清中 ALP 及びグルコース増加、白血球数減少、血清中 TG、総蛋白及びアルブミン減少、脳、心、肝及び脾比重量増加、腎近位尿細管上皮の肥大、ハーダー腺分泌亢進
15ppm 以上投与群 雄	肝比重量増加
雌	腎比重量増加

本試験の無毒性量は雌雄で 15ppm 未満（雄：0.91mg/kg 体重/日未満、雌：1.01mg/kg 体重/日未満）であると考えられる。（参照 49～50, 11）

(2) 2 週間亜急性毒性試験-ミトコンドリアの機能及び形態に及ぼす影響-（ラット）

Fischer ラット（一群雌雄各 7 匹）を用いた混餌（0, 15, 100, 200ppm）投与による 2 週間亜急性毒性試験が実施された。

200ppm の雌雄で肝細胞肥大及び肝ミトコンドリア増生が、雌で全血中 L-乳酸濃度の上昇、100ppm 以上投与群の雌雄で体重増加抑制、摂餌量の減少傾向、肝比重量の増加傾向が、雄で全血中 L-乳酸濃度の上昇が認められた。

本試験で認められた全血中 L-乳酸濃度の上昇、肝細胞のミトコンドリア増生は、トルフェンピラド投与によるミトコンドリアのエネルギー代謝異常に起因すると考えられる。

本試験の無毒性量は雌雄で 15ppm (雄 : 1.32mg/kg 体重/日、雌 : 1.27mg/kg 体重/日) であると考えられる。(参照 51, 10)

(3) 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, 15, 100, 300ppm) 投与による 90 日間の亜急性毒性試験が実施された。

300ppm 投与群の雌雄で肝比重量の増加が、雄で摂餌量の減少、AST の増加、心比重量の増加が、雌で MCHC の減少が認められた。

本試験の無毒性量は雌雄で 100ppm (雄 : 15.9mg/kg 体重/日、雌 : 20.2mg/kg 体重/日) であると考えられる。(参照 52)

(4) 90 日間亜急性毒性試験 (イヌ)

ビーグル犬 (一群雌雄各 4 匹) を用いた強制経口 (原体 : 0, 1, 5, 10mg/kg 体重/日) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

10mg/kg 体重/日投与群の雌で軟便及び粘液便、血清中カリウム濃度の増加が、5mg/kg 体重/日以上投与群の雌雄で嘔吐が、雌で尿量の減少が、雄で軟便及び粘液便 (5mg/kg 体重/日のみ) が認められた。

本試験の無毒性量は雌雄で 1mg/kg 体重/日であると考えられる。(参照 53)

(5) 90 日間亜急性毒性試験 (追加) (イヌ)

ビーグル犬 (一群雌雄各 4 匹) を用いた強制経口 (原体 : 0, 10, 30, 100mg/kg 体重/日) 投与による、毒性所見を確認するための 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

ただし、100mg/kg 体重/日投与群は投与 41 日の時点で 5/8 例が死亡ないし瀕死期殺され、生存中の 3/8 例も無排便や消瘦、体重低下及び摂餌量の減少が認められたため、それ以降の投与は困難と判断され投与 49 日で屠殺された。

100mg/kg 体重/日投与群の雌雄で死亡 (雄 1 例、雌 2 例)、瀕死期解剖 (雄 1 例、雌 1 例)、体重低下及び摂餌量の減少が、雄で分葉核好中球比の増加、好酸球比の減少が、雌で血清中遊離脂肪酸の増加、脾重量の減少、胸腺の萎縮、小葉中心性肝細胞空胞化が、30mg/kg 体重/日以上投与群の雌雄で肝細胞質の好酸性増加が、雄で死亡 (1 例)、血清中 ALT 及び尿素窒素の増加または増加傾向、尿量の減少、精巣重量の減少、精細管及び胸腺の萎縮、小葉中心性肝細胞空胞化が、10mg/kg 体重/日以上投与群の雌雄で嘔吐、軟便、粘液便及び流涎が認められ、雌で白血球数の減少、血清中の総コレステロール、TG 及びリン脂質の減少が認められた。(参照 54)

(6) 90 日間亜急性神経毒性試験 (ラット)

SD ラットを用いた混餌 (原体 : 0, 15, 40, 80ppm) 投与による亜急性神経毒性試験が実施された。

80ppm 投与群の雌雄で体重増加抑制、雌で摂餌量の減少が認められた。神経毒性は認められない。

一般毒性に関する無毒性量は雌雄とも 40ppm (雄 : 2.7mg/kg 体重/日、雌 : 3.2mg/kg

体重/日)であると考えられる。(参照 55)

(7) トルフェンピラド、代謝物 PT-CA 及び OH-PT の 4 週間亜急性毒性試験(ラット)

Fischer ラット(一群雌雄各 5 匹)を用いた混餌 (0, 3, 10, 30, 100ppm(トルフェンピラドは 3ppm 投与群を除く)) 投与によるトルフェンピラド、代謝物 PT-CA 及び OH-PT の 4 週間亜急性毒性試験が実施された。

トルフェンピラドの 100ppm 投与群の雌雄で体重増加抑制、摂餌量の減少、雄で血清中総タンパク質の減少、脳比重量の増加、腎尿細管上皮の硝子滴が、雌で慢性肝細胞肥大、膵腺房細胞の肥大が、30ppm 以上投与群の雌雄で肝比重量の増加、雄で腎比重量の増加が認められた。

PT-CA の 100ppm 投与群の雌で体重増加抑制、脳及び腎比重量の増加、慢性肝細胞肥大が、30ppm 以上投与群の雄で腎比重量の増加が、雌で肝比重量の増加が認められた。

OH-PT の 100ppm 投与群の雄で腎比重量の増加が認められた。

本試験の無毒性量は、トルフェンピラドは雌雄で 10ppm (雌雄:0.9mg/kg 体重/日)、PT-CA は雌雄で 10ppm (雄:0.8mg/kg 体重/日、雌:0.9mg/kg 体重/日)、OH-PT は雄で 30ppm (2.5mg/kg 体重/日)、雌で 100ppm (8.8mg/kg 体重/日) であると考えられる。(参照 56)

10. 慢性毒性試験及び発がん性試験

(1) 1 年間慢性毒性試験 (イヌ)

ビーグル犬 (一群雌雄各 4 匹) を用いた強制経口 (原体:0, 1, 5, 10mg/kg 体重/日) 投与による 1 年間慢性毒性試験が実施された。ただし、10 mg/kg 体重/日投与群は投与開始から 5 週まで 20mg/kg 体重/日を投与した。

10mg/kg 体重/日以上投与群の雌雄で死亡 (各 1 例)、体重低下及び摂餌量の減少、肝細胞質の好酸性増加が、雌で嘔吐及び軟便、肝細胞・クッパー細胞色素沈着が、5mg/kg 体重/日以上投与群の雌雄で流涎、血清中総コレステロール及びリン脂質の減少が、雄で嘔吐が、雌で血清中の A/G 比及びアルブミンの増加が認められた。

本試験の無毒性量は、雌雄で 1mg/kg 体重/日であると考えられる。(参照 57)

(2) 104 週間慢性毒性/発がん性併合試験 (ラット)

Fischer ラット (一群雌雄各 50 匹, 中間屠殺群雌雄各 10 匹) を用いた混餌 (原体:0, 15, 40, 80 ppm) 投与による 104 週間の慢性毒性/発がん性併合試験が実施された。

80ppm 投与群の雌雄で脳、肺及び心比重量の増加、ハーダー腺分泌亢進が、雄で体重増加抑制及び摂餌量の減少、白血球数の減少、腸間膜リンパ節の肥満細胞増加及び洞組織球症、腎で近位尿細管上皮の肥大が、雌で肝、腎及び副腎比重量の増加が、40ppm 以上投与群の雄で肝及び腎比重量の増加、腎で近位尿細管上皮の硝子滴が、雌で体重増加抑制及び摂餌量の減少、白血球数の減少、ハーダー腺の褐色化、腸間膜リンパ節の洞組織球症、好塩基性肝細胞小増殖巣の増加及び腎で近位尿細管上皮の肥大が認められた。

本試験の無毒性量は雌雄で 15ppm (雄:0.56mg/kg 体重/日、雌:0.69mg/kg 体重/日)

であると考えられる。発がん性は認められない。(参照 58, 11)

(3) 78 週間発がん性試験 (マウス)

ICR マウス (一群雌雄各 50 匹) を用いた混餌 (原体 : 0, 15, 150, 500/400/300*ppm) 投与による 78 週間の発がん性試験が実施された。

500/400/300ppm 投与群の雌雄で肝比重量の増加が、雄で脳及び副腎比重量の増加、精巣及び精巣上体比重量の減少が、雌で体重増加抑制、卵巣、子宮及び子宮頸の萎縮が、150ppm 以上投与群の雌雄で摂餌量の減少が、雄で体重増加抑制、脾比重量の減少が認められた。

本試験の無毒性量は雌雄で 15ppm (雄 : 2.2mg/kg 体重/日、雌 : 2.8mg/kg 体重/日) であると考えられる。発がん性は認められない。(参照 59)

※最高用量の 500/400/300 の表記は、500ppm で試験を開始した群で雌雄とも体重増加抑制、摂餌量の減少ならびに重篤な症状が認められたことから、用量を投与 13 週時に 400ppm に減じ、その後も症状が継続して認められたことから、投与 20 週時には 300ppm に減じたことを意味する。

1 1. 生殖発生毒性試験

(1) 2 世代繁殖試験 (ラット)

SD ラット (一群雌雄各 30 匹) を用いた混餌 (原体 : 0, 0.75, 1.5, 3mg/kg 体重/日) 投与による 2 世代繁殖試験が実施された。

親動物では、3mg/kg 体重/日投与群の P 世代の雌雄で摂餌量の減少、雌で死亡 (3 例 : 難産死 2、瀕死殺 1)、妊娠期間の延長、分娩異常及び出産率低下が、F₁ 世代の雄で摂餌量の減少が、雌で体重増加抑制、着床数の低下が、1.5mg/kg 体重/日以上投与群の P 世代の雌で体重増加抑制が、F₁ 世代の雌で摂餌量の減少が認められた。

児動物では、3mg/kg 体重/日投与群の F₁ 及び F₂ 世代の雌雄で耳介展開及び眼瞼開裂の遅延が、F₁ 世代で出産生存児数の減少、平面正向反射遅延、脾重量、脳及び胸腺比重量の減少が、F₂ 世代で体重増加抑制、小腸への暗緑色内容物貯留による腹腔内黒色化が、1.5mg/kg 体重/日以上投与群の F₁ 世代で体重増加抑制、小腸への暗緑色内容物貯留による腹腔内黒色化が、0.75mg/kg 体重/日以上投与群の F₂ 世代で胸腺比重量の減少が認められた。

親動物の P 世代で認められた分娩異常は、F₁ 世代や同種の別試験では認められないことから、母動物の内分泌系、神経系あるいは子宮筋へ及ぼす直接的な影響による可能性は低く、交配前から妊娠期間を通じた長期投与により摂餌量の減少及び低体重が示唆する一般毒性学的な影響に分娩時の出血等の負荷が加わった衰弱状態により二次的に発生したためと考えられる。

児動物での胸腺比重量の減少は、次世代免疫毒性検討試験(1 1. 生殖発生毒性試験 (2) 参照)において F₁ 及び F₂ 世代の免疫機能が検討された結果、いずれの世代も成獣においては液性・細胞性免疫機能に異常が認められなかったことより、毒性学的に影響の少ない変化と考えられる。

本試験の親動物及び児動物に対する無毒性量は雌雄で 0.75mg/kg 体重/日であると考えられる。(参照 60, 10)

(2) 2世代繁殖試験 -次世代免疫毒性検討試験- (ラット)

SD ラット (一群雌 (妊娠) 各 15 匹) を用い、妊娠・哺乳期間から F₂ 動物の成熟期まで強制経口 (原体 : 0, 0.75, 3mg/kg 体重/日) 投与し、次世代免疫毒性検討試験が実施された。

親動物では、3mg/kg 体重/日投与群の P 世代で体重増加抑制及び摂餌量の減少が、F₁ 世代では体重低下、体重増加抑制及び摂餌量の減少が、F₂ 世代体では摂餌量の減少、脾比重量の減少が認められた。

児動物では、3mg/kg 体重/日投与群の F₁ 世代で体重増加抑制、胸腺比重量の低下 (生後 4 日の雄では 0.75mg/kg 体重/日投与群でも低下)、小腸への暗緑色内容物貯留による腹腔内黒色、F₂ 世代では摂餌量の減少、胸腺比重量の低下、小腸への暗緑色内容物貯留による腹腔内黒色化、胸腺及び脾臓細胞数の減少、生後 4 日の脾臓の CD3-/CD45RA+ 細胞率の上昇、生後 21 日目における脾臓 CD3+/CD45RA- 細胞率及び CD4+/CD8- 細胞率の低下、生後 10 週の脾臓 CD3+/CD45RA- 細胞率の低下といったリンパ球サブセットの変化が認められた。

上記で認められた変化にも関わらず、成熟動物では液性免疫及び細胞性免疫機能に影響が認められなかったことから、トルフェンピラドの次世代に対する免疫毒性は認められないと考えられる。(参照 61, 10)

(3) 発生毒性試験 (ラット)

SD ラット (一群雌 24 匹) の妊娠 6~15 日に強制経口 (原体 : 0, 1, 3, 4.5mg/kg 体重/日) 投与して発生毒性試験が実施された。

母動物では、3mg/kg 体重/日以上投与群で体重増加抑制及び摂餌量の減少が認められた。胎児では 4.5mg/kg 体重/日投与群で低体重、腰肋の発生率の上昇が認められた。

腰肋の大部分が奇形性の指標としては意義に乏しい短小過剰肋骨であり、さらに腰椎数にも変化がないことから、本変化はトルフェンピラドの催奇形性を示唆する変化ではないと考えられる。

本試験の無毒性量は、母動物で 1mg/kg 体重/日、胎児で 3mg/kg 体重/日であると考えられる。催奇形性は認められない。(参照 62, 10)

(4) 発生毒性試験 (ウサギ)

日本白色種ウサギ (一群雌 16 匹) の妊娠 6~18 日に強制経口 (原体 : 0, 1, 3, 6mg/kg 体重/日) 投与して発生毒性試験が実施された。

母動物では、6mg/kg 体重/日投与群で摂餌量の減少、早産 (1 例) 及び全胚死亡 (1 例)、3mg/kg 体重/日投与群で死亡 (1 例) が認められた。

胎児では 1 及び 6mg/kg 体重/日投与群で骨格変異 (腰肋、過剰胸骨分節) を有する胎児の発生率の上昇が認められたが、過剰胸骨分節については用量に依存する変化が認められないこと、腰肋については腰椎数にも変化がないこと及び背景データの範囲内であ

ることから投与による影響ではないと考えられる。

なお、3mg/kg 体重/日投与群の 1 例の母動物の死亡については、病理組織検査の結果、肺のうっ血、肝臓及び腎臓の脂肪化、脾臓の萎縮などの循環障害、低栄養または衰弱による変化がみられたことから、死因は体重減少、無摂餌あるいは摂餌抑制の状態が持続し、母体の全身状態が悪化したためと考えられる。

本試験の無毒性量は、母動物で 1mg/kg 体重/日、胎児で 6mg/kg 体重/日であると考えられる。催奇形性は認められない。（参照 63, 10）

1 2. 遺伝毒性試験

トルフェンピラドの細菌を用いた DNA 修復試験、復帰突然変異試験、チャイニーズハムスター培養細胞(CHL)を用いた染色体異常試験、マウスを用いた小核試験が実施された。チャイニーズハムスター培養細胞(CHL)を用いた染色体異常試験で陽性反応が認められた。その他の試験はすべて陰性であった。（表 10）

染色体異常試験では数的異常である倍数体の誘発が認められたが染色体の構造異常誘発性は認められず、十分高用量まで検討された *in vivo* 小核試験で陰性であったことから、トルフェンピラドは生体にとって特段の問題となるような遺伝毒性はないものと考えられる。（参照 64～68）

表 10 遺伝毒性試験結果概要（原体）

試験		対象	投与量(mg/kg 体重/日)	結果
<i>in vitro</i>	DNA 修復試験	<i>B. subtilis</i> H17, M45 株	/	陰性
	復帰突然変異試験 (±S9)	<i>S.typhimurium</i> TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537 株 <i>E.coli</i> WP2uvrA 株		陰性
	染色体異常試験 (±S9)	チャイニーズハムスター培養細胞株(CHL)		陽性 (-S9)
<i>in vivo</i>	小核試験	ddY マウス (一群雌雄各 6 匹)	雄 : 0, 3, 6, 12, 24 雌 : 0, 1.8, 3.5, 7, 14 (2 日間連続腹腔内投与)	陰性

注) ±S9 : 代謝活性化系存在下及び非存在下、-S9 : 代謝活性下系非存在下

トルフェンピラドの代謝物 PT-CA、OH-PT、T-CA、T-AM、CA-T-CA、OH-T-CA、OH-PAM 及び PCA の細菌を用いた復帰突然変異試験は、いずれも陰性であった。PT-CA 及び OH-PT のチャイニーズハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いた染色体異常試験及びラットを用いた小核試験はいずれも陰性であった。（表 11）（参照 69～80）