

## 7. 一般薬理試験

マウス、ラット及びウサギを用いた一般薬理試験が実施された。結果は表 4 に示されている。(参照 20)

表 4 一般薬理試験

試験の種類	動物種	動物数 匹/群	投与量 mg/kg 体重 (投与経路)	無作用量 mg/kg 体重	作用量 mg/kg 体重	結果の概要	
中枢神経系	一般状態	ラット	雄 5	0, 200, 600, 2000 (経口)	2000	>2000	影響なし
	自発運動量	マウス	雄 8	0, 200, 600, 2000 (経口)	2000	>2000	影響なし
	痙攣誘発	マウス	雄 8	0, 200, 600, 2000 (経口)	600	2000	2000 mg/kg 体重群で強直性屈曲痙攣の抑制が認められた。
呼吸循環器系	収縮期血圧	ラット	雄 6	0, 200, 600, 2000 (経口)	2000	>2000	影響なし
	心拍数	ラット	雄 6	0, 200, 600, 2000 (経口)	2000	>2000	影響なし
腎機能	尿量、尿中電解質、尿浸透圧	ラット	雄 6	0, 200, 600, 2000 (経口)	600	2000	2000 mg/kg 体重群で尿浸透圧の上昇が認められた。
血液系	溶血作用	ウサギ	雄 6	1×10 <sup>6</sup> g/ml 1×10 <sup>5</sup> g/ml 1×10 <sup>4</sup> g/ml (in vitro)	1×10 <sup>4</sup> g/ml	>1×10 <sup>4</sup> g/ml	影響なし

・マウス及びラットについてはベンチアバリカルブイソプロピル原体を CMC・Na 水溶液(0.5%w/v)に懸濁したものを検体として単回強制経口投与した。

## 8. 急性毒性試験

ベンチアバリカルブイソプロピルの Wistar ラット及び ICR マウスを用いた急性経口毒性試験、Wistar ラットを用いた急性経皮毒性試験、SD ラットを用いた急性吸入毒性試験において、急性経口 LD<sub>50</sub>はラット及びマウスの雌雄で>5000 mg/kg 体重、経皮 LD<sub>50</sub>はラットの雌雄で>2000 mg/kg 体重、吸入 LC<sub>50</sub>はラットの雌雄で>4.6 mg/L であった。(参照 21~24)

代謝物 M-1、M-3、M-4、M-5、M-15 及び混在物 S-L、I-1 (R)、I-1 (S)、I-4、I-12、I-13 の Fischer ラットを用いた急性経口毒性試験の実施結果は表 5 に示すとおり。(参照 25~31)

表 5 代謝物及び混在物の急性経口 LD<sub>50</sub> (mg/kg 体重)

被験物質	雄	雌
代謝物 M-1	545	467
代謝物 M-3	>2000	>2000
代謝物 M-4	>2000	>2000
代謝物 M-5	605	545
代謝物 M-15	>2000	>2000
混在物 S-L	>2000	>2000
混在物 I-1 (R)	>2000	>2000
混在物 I-1 (S)	>2000	>2000
混在物 I-4	>2000	>2000
混在物 I-12	1200	840
混在物 I-13	>2000	>2000

## 9. 眼・皮膚に対する刺激性及び皮膚感作性

NZW 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た。眼粘膜に対してはわずかな刺激性を有し、皮膚刺激性は認められなかった。(参照 32~33)

モルモットを用いた皮膚感作性試験を実施した。Buehler 法では陰性であったが、Maximization 法では陽性であった。(参照 34~35)

## 10. 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 又は 20 匹) を用いた混餌 (原体 : 0, 50, 200, 5000, 20000 ppm, 雄 : 0, 3.5, 14.1, 353, 1440, 雌 : 0, 3.9, 15.3, 379, 1550 mg/kg 体重/日に相当) 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は表 6 に示されている。

表 6 ラット 90 日間亜急性毒性試験で認められた所見

投与群	雄	雌
20000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> <li>赤血球数減少、血小板数増加</li> <li>遊離コレステロール、リン脂質及びアルブミン増加</li> <li>肝肥大、肝黒色化及び肝細胞肥大</li> <li>腎及び精巣体重比重量（以下「比重量」とする）増加</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>アルブミン増加、ビリルビン減少</li> <li>血清中総蛋白量及びカルシウム増加</li> <li>肝肥大、肝黒色化及び肝細胞肥大</li> <li>心絶対重量増加</li> </ul>
5000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ht 及び Hb 減少</li> <li>血清中総コレステロール及び <math>\gamma</math>-GTP 増加</li> <li>血清中総蛋白量及びカルシウム増加</li> <li>肝比重量増加</li> <li>副腎比重量増加</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>血小板数、Ht 及び Hb 減少</li> <li>血清中総コレステロール、血清中総遊離コレステロール、リン脂質の増加及び <math>\gamma</math>-GTP 増加</li> <li>A/G 比減少</li> <li>肝比重量増加</li> <li>腎及び副腎絶対重量増加</li> </ul>
200 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

本試験における無毒性量は、5000 ppm 投与群の雌雄で肝比重量増加、 $\gamma$ -GTP の増加等が認められたため、雌雄で 200 ppm（雄：14.1 mg/kg 体重/日、雌：15.3 mg/kg 体重/日）であると考えられた。（参照 36）

## （2）90 日間亜急性毒性試験（イヌ）

ビーグル犬（一群雌雄各 4 匹）を用いた強制経口（原体：0, 40, 200, 1000 mg/kg 体重/日）投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

各投与群で認められた主な所見は表 7 に示されている。

表 7 イヌ 90 日間亜急性毒性試験で認められた所見

投与群	雄	雌
1000 mg/kg 体重/日	<ul style="list-style-type: none"> <li>赤血球数、血小板数、Hb、Ht、MCV、MCHC、網状赤血球率及び血清中カルシウム減少</li> <li>血清中総蛋白量及びアルブミン減少、血清中 ALP、総ビリルビン及び <math>\gamma</math>-GTP 増加</li> <li>貧血による結膜蒼白</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>赤血球数、血小板数、Hb、Ht、MCV、MCHC、網状赤血球率及び血清中カルシウム減少</li> <li>血清中 ALP、総ビリルビン及び <math>\gamma</math>-GTP 増加</li> <li>肝細胞肥大及び肝クッパー細胞色素沈着</li> </ul>

	・ 肝比重量増加、肝細胞肥大及び肝クッパー細胞色素沈着	
200 mg/kg 体重/日 以上	200 mg/kg 体重/日 以下、毒性所見なし	・ 血清中総蛋白量、アルブミン、血清中アルブミン分画及び分画量減少、A/G 比減少 ・ 肝比重量増加
40 mg/kg 体重/日 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

40ppm 以上投与群の雌で胸腺比重量減少が認められたが、背景データの範囲内であり、胸腺の病理組織学的所見では生理的退縮像と同様であったので、投与による影響とは考えられなかった。

本試験における無毒性量は、1000 mg/kg 体重/日の雄、200 mg/kg 体重/日の雌でアルブミンの減少等が認められたので、雄で 200 mg/kg 体重/日、雌で 40 mg/kg 体重/日であると考えられた。(参照 37)

### (3) 28 日間亜急性神経毒性試験 (ラット)

SD ラット (一群雌雄各 10 匹) を用いた混餌 (原体 : 0, 200, 2000, 20000 ppm, 雄 : 0, 17.7, 174, 1850, 雌 : 0, 19.3, 186, 1850 mg/kg 体重/日に相当) 投与による 28 日間亜急性神経毒性試験が実施された。

20000ppm 投与群の雄で体重増加抑制、食餌効率の低下が認められた。

本試験における無毒性量は、20000ppm 投与群の雄で体重増加抑制が認められたことから、雄で 2000 ppm (174mg/kg 体重/日)、雌で 20000 ppm (1850 mg/kg 体重/日) であると考えられた。神経毒性は認められなかった。(参照 38)

### (4) 28 日間亜急性毒性試験 (マウス)

B6C3F1 マウス (一群雌雄各 5 匹) を用いた混餌 (原体 : 0, 50, 500, 7000, 20000, 50000ppm, 雄:0, 10.7, 105, 1410, 3970, 9470, 雌:0, 12.7, 120, 1610, 4380, 10800 mg/kg 体重/日に相当) 投与による 28 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は表 8 に示されている。

表 8 マウス 28 日間亜急性毒性試験で認められた所見

投与群	雄	雌
50000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 摂餌量減少、体重増加抑制</li> <li>・ MCV 及び MCH 減少</li> <li>・ 副腎比重量増加及び副腎皮質/髄質細胞肥大</li> <li>・ 胸腺比重量減少及び胸腺萎縮</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 摂餌量減少</li> <li>・ 赤血球数、Hb、MCV、MCH、及び MCHC 減少、血小板増加</li> <li>・ 胸腺比重量減少</li> <li>・ 副腎比重量増加及び副腎皮質/髄質細胞肥大</li> </ul>

20000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ MCH 減少</li> <li>・ 肝比重量増加</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ Ht 減少</li> <li>・ 卵巣比重量減少</li> <li>・ 肝細胞分裂像増加、肝細胞核異型化</li> </ul>
7000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 血小板増加</li> <li>・ 小葉中心性肝細胞肥大、肝細胞巣状細胞壊死及び肝細胞核異型化</li> <li>・ 前胃角化亢進</li> <li>・ 腎比重量減少</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 小葉中心性肝細胞肥大、肝比重量増加及び肝細胞空胞化</li> <li>・ 前胃角化亢進</li> </ul>
500 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 肝細胞単細胞壊死、肝細胞巣状細胞壊死、肝細胞空胞化及び肝細胞分裂像増加</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 肝細胞単細胞壊死</li> </ul>
50 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

本試験における無毒性量は、500 ppm 投与群の雌雄で肝細胞単細胞壊死が認められたので、雌雄で 50 ppm (雄：10.7 mg/kg 体重/日、雌：12.7 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 39, 79)

#### (5) 28 日間亜急性毒性試験(ラット)

Fischer ラット (一群雌雄各 5 匹) を用いた混餌 (原体：0, 50, 500, 7000, 20000, 50000 ppm, 雄：0, 4.5, 45.1, 621, 1870, 4920, 雌：0, 4.6, 47.8, 656, 1860, 4890 mg/kg 体重/日に相当) 投与による 28 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は表 9 に示されている。

表 9 ラット 28 日間亜急性毒性試験で認められた所見

投与群	雄	雌
50000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 死亡 (1 例)</li> <li>・ 体重増加抑制</li> <li>・ 血清中総コレステロール、コレステロールエステル及びリン脂質増加</li> <li>・ 甲状腺ろ胞細胞過形成</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ Ht 及び Hb 減少</li> <li>・ 甲状腺ろ胞細胞過形成</li> </ul>
20000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ Hb、MCV、MCH 及び MCHC 減少</li> <li>・ 血清中遊離コレステロール増加</li> <li>・ 肝肥大、小葉中心性肝細胞肥大、肝細胞単細胞壊死、肝細胞分裂像増加及び肝細胞空胞化</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ MCV 減少</li> <li>・ 総蛋白、<math>\gamma</math>-GTP、血清中遊離コレステロール増加、総コレステロール及びリン脂質増加</li> <li>・ 肝比重量増加、肝肥大、小葉中心性肝細胞肥大、肝細胞単細胞壊</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>腎比重量増加</li> <li>精巣比重量増加</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>死、肝細胞分裂像増加</li> <li>腎比重量増加</li> </ul>
7000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> <li>血小板増加</li> <li>血清中総蛋白増加</li> <li>肝比重量増加</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>血小板増加</li> <li>コレステロールエステル増加</li> <li>遊離脂肪酸減少</li> </ul>
500 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

本試験における無毒性量は、7000 ppm 投与群の雌雄で血小板増加等が認められたことから、雌雄で 500 ppm(雄：45.1 mg/kg 体重/日、雌：47.8 mg/kg 体重/日)であると考えられた。(参照 40, 79)

## 11. 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, 4, 40, 400 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。

毒性は最高用量まで見られなかった。

本試験における無毒性量は雌雄で 400 mg/kg 体重/日と考えられる。(参照 41)

### (2) 慢性毒性 (18 ヶ月間) / 発がん性 (2 年間) 併合試験 (ラット)

Fischer ラット (慢性毒性試験群：一群雌雄各 30 (26, 52, 78 週にて雌雄各 10 匹ずつ計画殺) 匹、発がん性試験群：一群雌雄各 50 匹) を用いた混餌 (原体：0, 50, 200, 5000, 10000 ppm, 雄：0, 2.5, 9.9, 250, 518, 雌：0, 3.2, 12.5, 318, 649 mg/kg 体重/日に相当) 投与による慢性毒性 (18 ヶ月間) / 発がん性 (2 年間) 併合試験が実施された。

各投与群で認められた主な所見は表 10 に示すとおり。

表 10 ラット慢性毒性/発がん性併合試験で認められた所見(腫瘍性病変以外)

投与群	雄	雌
10000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> <li>食餌効率低下及び軟便尾部結節</li> <li>Ht 及び Hb 減少</li> <li>脾臓萎縮</li> <li>腎リンパ球浸潤、腎硝子様円柱、腎線維化及び腎移行上皮過形成</li> <li>ハーダー腺腔拡張</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>食餌効率低下及び摂餌量増加</li> <li>脾臓萎縮</li> <li>腎リンパ球浸潤及び好塩基性尿細管</li> </ul>
5000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> <li>摂餌量増加</li> <li>MCV 及び MCH 減少、血小板数増加</li> <li>血清中総蛋白量及び<math>\gamma</math>-GTP 増加</li> <li>肝比重量増加、肝細胞脂肪化、肝</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>赤血球数、血小板数、Ht、Hb、MCV 及び MCH 減少</li> <li>血清中カルシウム、総・遊離コレステロール、リン脂質、血清中総蛋白量及び<math>\gamma</math>-GTP 増加</li> </ul>

	細胞肥大、肝海綿性変性及び肝変異細胞巢 ・ 腎及び副腎比重量増加、腎結石、慢性腎症、尿細管拡張、腎硝子滴変性 ・ 甲状腺ろ胞上皮細胞過形成	・ 肝比重量増加、肝細胞脂肪化、肝細胞肥大及び肝マクロファージ/泡沫細胞集簇 ・ 甲状腺ろ胞上皮細胞過形成 ・ ハーダー腺腔拡張 ・ 腎及び副腎比重量増加、糸球体硬化、腎結石、腎硝子様円柱及び腎褐色色素沈着
200 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

腫瘍性病変としては、10000 ppm 投与群の雄で肝細胞腺腫、5000 ppm 以上投与群の雌で子宮腺癌の有意な増加が認められた (表 11)。

表 11 ラットを用いた慢性毒性/発がん性併合試験で認められた腫瘍性病変

投与量	雄					雌				
	0	50	200	5000	10000	0	50	200	5000	10000
所見/検査動物数	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
肝細胞腺腫	1	2	2	2	8*	4	0	2	1	2
肝細胞腺癌	0	2	0	0	2	0	0	0	1	0
子宮腺腫	-	-	-	-	-	1	0	2	2	0
子宮腺癌	-	-	-	-	-	3	3	4	13*	12*

Fisher の直接確率検定、\* :  $p \leq 0.05$

検査動物数は、発がん性試験群及び慢性毒性試験群 (52 週、78 週) の合計である。

本試験における無毒性量は、5000 ppm 投与群の雌雄で肝、腎及び副腎比重量増加等が認められたので、雌雄で 200 ppm (雄 : 9.9 mg/kg 体重/日、雌 : 12.5 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 42, 80)

### (3) 2 年間発がん性試験 (マウス)

B6C3F<sub>1</sub> マウス (発がん性試験群 : 一群雌雄各 50 匹、衛生群 : 一群雌雄各 20 匹 (52, 78 週にて雌雄各 10 匹ずつ計画殺) を用いた混餌 (原体 : 0, 20, 100, 2500, 5000 ppm, 雄 : 0, 2.7, 13.7, 358, 731, 雌 : 0, 3.7, 18.6, 459, 928 mg/kg 体重/日に相当) 投与による 2 年間発がん性試験が実施された。

腫瘍性病変以外では、表 12 の所見が認められた。腫瘍性病変としては、5000 ppm 投与群の雄で甲状腺ろ胞細胞腺腫が、2500 ppm 以上投与群の雌雄で肝細胞腺腫が、雄で肝芽細胞腫、肝細胞癌の有意な増加が認められた (表 13)。

表 12 マウスを用いた発がん性試験で認められた所見 (腫瘍性病変以外)

投与群	雄	雌
-----	---	---

5000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 死亡率増加</li> <li>・ 削瘦、立毛、蒼白及び呼吸促迫</li> <li>・ 腎尿細管空胞変性減少及び腎褐色色素沈着</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 肝細胞核大小不同性、肝マクロファージ集簇、肝炎症性細胞浸潤、肝細胞巢状壊死及び肝細胞単細胞壊死</li> <li>・ 卵巢萎縮</li> </ul>
2500ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 体重増加抑制</li> <li>・ 食餌効率の低下</li> <li>・ 血小板数及び骨髓巨核球増加</li> <li>・ 前胃潰瘍、前胃リンパ球浸潤及び扁平上皮過形成</li> <li>・ 肝比重量増加、肝小葉中間帯肝細胞脂肪化、肝細胞肥大、肝変異細胞巢、肝血管拡張、肝細胞核大小不同性、肝多核肝細胞、肝細胞巢状壊死、肝細胞単細胞壊死、肝マクロファージ集簇、肝炎症性細胞浸潤、肝小肉芽腫、肝細胆管/胆管増生、肝髓外造血、びまん性肝細胞脂肪化減少及び多核肝細胞出現増加</li> <li>・ 甲状腺ろ胞拡張及びろ胞細胞過形成</li> <li>・ 腎鉍質沈着減少、副腎皮質限局性肥大/過形成及び副腎皮質肥大/過形成</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 血小板数増加</li> <li>・ 肝比重量増加、肝小葉中間帯肝細胞脂肪化、肝細胞肥大及び肝変異細胞巢</li> <li>・ 甲状腺ろ胞拡張及びろ胞細胞過形成</li> <li>・ 副腎皮質肥大/過形成</li> <li>・ 卵巢比重量減少</li> </ul>
100ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

表 13 マウスを用いた発がん性試験で認められた所見（腫瘍性病変）

投与群	雄					雌				
	0	20	100	2500	5000	0	20	100	2500	5000
所見/検査動物数	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
甲状腺ろ胞細胞腺腫	0	1	0	4	9*	0	0	1	2	2
肝細胞腺腫	21	9*	17	51**	64**	5	3	4	27**	29**
肝芽細胞腫	0	0	0	12**	11**	0	0	0	0	0
肝細胞癌	12	13	12	36**	43**	3	3	3	7	6

Fisher の直接確率検定、\* :  $p \leq 0.05$ 、\*\* :  $p \leq 0.01$



本試験における無毒性量は、2500 ppm 投与群の雄で体重増加抑制、肝細胞肥大等が認められたため、雌雄で 100 ppm (雄：13.7 mg/kg 体重/日、雌：18.6 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 43)

## 12. 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 25 匹) を用いた混餌 (原体：0, 100, 1000, 10000 ppm：平均検体摂取量は表 14 参照) 投与による 2 世代繁殖試験が実施された。

親動物では 10000 ppm 投与群の雌雄で肝重量の増加 (P、F<sub>1</sub>)、肝細胞肥大 (P、F<sub>1</sub>) が、1000 ppm 投与群の雄で肝重量の増加 (P)、肝細胞肥大 (P、F<sub>1</sub>) が認められた。児動物では 10000 ppm 投与群の雌雄で肝重量の増加 (F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>) が認められた。

本試験における無毒性量は、親動物 (P、F<sub>1</sub>) の 1000 ppm 投与群の雄及び 10000 ppm 投与群の雌で肝細胞肥大等が認められたので、親動物の雄で 100ppm (P：6.9 mg/kg 体重/日、F<sub>1</sub>：10.0 mg/kg 体重/日)、雌で 1000 ppm (P：76.0 mg/kg 体重/日、F<sub>1</sub>：106 mg/kg 体重/日)、児動物 (F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>) の 10000 ppm 投与群の雌雄で肝細胞肥大等が認められたので、児動物の雌雄で 1000 ppm (F<sub>1</sub>雄：68.5 mg/kg 体重/日、F<sub>1</sub>雌：76.0 mg/kg 体重/日、F<sub>2</sub>雄：99.7 mg/kg 体重/日、F<sub>2</sub>雌：106 mg/kg 体重/日) であると考えられた。繁殖に対する影響は認められなかった。(参照 44)

表 14 2 世代繁殖試験における検体摂取量

投与量(ppm)		100	1000	10000
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	親 P 雄	6.90	68.5	702
	親 P 雌	7.70	76.0	771
	親 F <sub>1</sub> 雄	10.0	99.7	1060
	親 F <sub>1</sub> 雌	9.90	1069	1120

### (2) 発生毒性試験 (ラット)

SD ラット (一群雌 25 匹) の妊娠 7~19 日に強制経口 (原体：0, 10, 100, 1000 mg/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 1000 mg/kg 体重/日投与群で肝比重量増加が、100 mg/kg 体重/日以上投与群で副腎絶対重量及び比重量の増加、肝肥大が認められた。胎児動物では投与による影響は認められなかった。

本試験の無毒性量は、母動物の 100 mg/kg 体重/日投与群で副腎比重量増加等が認められたため、母動物で 10 mg/kg 体重/日、胎児動物で 1000 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 45)

### (3) 発生毒性試験 (ウサギ)

NZW 白ウサギ (一群雌 22 匹) の妊娠 6~28 日に強制経口 (原体：0, 10, 20, 40 mg/kg

体重/日) 投与し、発生毒性試験が実施された。

母動物では、40 mg/kg 体重/日投与群で流産 (2 例)、肝肥大、肝比重量の増加が認められた。1 例は妊娠期間の後半に摂餌がみられず、母体の栄養状態悪化に起因したものと考えられた。胎児動物の内臓及び骨格所見には投与による影響は認められなかった。

本試験の無毒性量は、母動物の 40 mg/kg 体重/日投与群で肝比重量増加等が認められたため、母動物で 20 mg/kg 体重/日、胎児動物で 40 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 46)

### 13. 遺伝毒性試験

ベンチアバリカルブイソプロピルの細菌を用いた復帰突然変異試験、ラット肝初代培養細胞を用いた *in vitro* 不定期 DNA 合成試験、マウスリンフォーマ TK 試験、チャイニーズハムスター肺線維芽細胞 (CHL) を用いた染色体異常試験、ヒトリンパ球を用いた単細胞ゲル電気泳動法試験 (コメット試験)、BALB/c3T3 細胞を用いた二段階形質転換試験、ラット肝細胞を用いた *in vivo* / *in vitro* 不定期 DNA 合成試験、マウス肝臓における酸化的 DNA 損傷試験、ラット肝臓・子宮における酸化的 DNA 損傷試験、マウスを用いた小核試験及びトランスジェニックマウスの肝を用いた遺伝子突然変異試験が行われた。細菌を用いた復帰突然変異試験の TA98 株において S9 mix 存在下で 500~1000  $\mu$ g/プレート の用量で対照の 3~4.8 倍の復帰変異コロニー数の増加が認められたが、その他の試験はすべて陰性であった (表 15)。

TA98 株の S9 mix 存在下で再現性のある陽性反応が認められたが、培養細胞においては DNA 損傷性や遺伝子突然変異の誘発性は見られなかったこと、*in vivo* での評価においてマウス、ラットの肝臓等における酸化的 DNA 損傷性が見られなかったこと、十分高用量まで試験されたラット肝細胞を用いた不定期 DNA 合成試験及び肝を標的としたトランスジェニックマウスを用いた遺伝子突然変異試験の *in vivo* 試験で陰性であったこと、さらに染色体異常の誘発性に関しては *in vitro*、*in vivo* ともに認められないこと、二段階形質転換試験は陰性であったことから生体にとって特に問題となるような遺伝毒性はないものと考えられた。(参照 47~58)

表 15 遺伝毒性試験概要 (原体)

試験		対象	投与量・処理濃度	結果
<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験 (参照 47)	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537 株 <i>E. coli</i> WP2uvrA 株	1 回目: 8~5000 $\mu$ g/7° レット (+/-S9) 2 回目: 32~5000 $\mu$ g/7° レット (+/-S9)	陽性 TA98 (+S9)
	不定期 DNA 合成試験 (参照 48)	ラット肝細胞	実験 1: 5~ 50 $\mu$ g/mL 実験 2: 15.625~500 $\mu$ g/mL	陰性
	マウスリンフォーマ TK 試験 (参照 49)	マウスリンパ腫細胞 (L5178Y)	3.75~120 $\mu$ g/mL (+/-S9)	陰性

試験	対象	投与量・処理濃度	結果	
染色体異常試験 (参照 50)	チャイニーズハムスタ ー肺由来細胞 (CHL)	955~3820 $\mu$ g/mL (+/-S9)	陰性	
単細胞ゲル電気泳動 法試験 (参照 51)	ヒトリンパ球	62.2~173 $\mu$ g/mL (-S9) 173~800 $\mu$ g/mL (+S9)	陰性	
二段階形質転換試験 (参照 52)	BALB/c3T3 細胞	10.4~80.0 $\mu$ g/mL	陰性	
<i>in vivo</i> / <i>in vitro</i>	不定期 DNA 合成試験 (参照 53)	Fischer ラット(肝細胞) (一群雄 4 匹)	1000, 2000 mg/kg 体重 (単回経口投与)	陰性
<i>in vivo</i>	酸化的 DNA 損傷試験 (肝臓) (参照 54)	B6C3F1 マウス (一群雌雄各 5 匹)	0, 100, 500 ppm (混餌投与) 雄 : 0, 19.4, 1031 mg/kg 体 重 雌 : 0, 26.1, 1204 mg/kg 体 重	陰性
	酸化的 DNA 損傷試験 (肝臓) (参照 55)	Fischer ラット (一群雌雄各 5 匹)	0, 200, 10000 ppm (混餌投 与) 雄 : 0, 17.4, 798 mg/kg 体重雌 : 0, 17.1, 915 mg/kg 体重	陰性
	酸化的 DNA 損傷試験 (肝臓・子宮) (参照 56)	Fischer ラット雌 10 匹	0, 200, 10000 ppm (混餌投 与) 0, 11.6, 576.4 mg/kg 体重	陰性
	小核試験 (参照 57)	ICR マウス雄 8 匹	2000 mg/kg 体重 (1 日 2 回経口投与)	陰性
	遺伝子突然変異試験 (参照 58)	トランスジェニックマ ウス (Muta <sup>TM</sup> Mouse) 雄 5 匹、肝臓	1000, 2000 mg/kg 体重 (1 日 1 回 5 日間経口投与)	陰性

注) +/-S9 : 代謝活性化系存在下及び非存在下、+S9 : 代謝活性化系存在下

代謝物 M-1、M-3、M-4、M-5、M-15、混在物 S-L、I-12 の細菌を用いた復帰突然変異試験が実施された。代謝物 M-4 及び混在物 I-12 が TA98 株において S9 mix 存在下で各々対照の 6.0 倍 (1250  $\mu$ g/プレート) 及び 7.8 倍 (320  $\mu$ g/プレート) の増加が認められ、陽性であった。その他はすべて陰性であった (表 16)。

代謝物 M-4 は土壤代謝物で、土壤中半減期が数時間という極めて短時間であること、また、混在物 I-12 は 0.5%以下の低い含有量であることを考えると、これらのものが人に健康被害をもたらすとは考え難い。(参照 59~65)

表 16 遺伝毒性試験概要（代謝物・混在物）

被験物質	試験	対象	投与量・処理濃度	結果
代謝物 M-1	復帰突然変異試験 (参照 59)	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA98, TA1535, TA1537, WP2 <i>uvrA</i> 株	156-5000 $\mu$ g/mL (-S9) 78.1-5000 $\mu$ g/mL (+S9)	陰性
代謝物 M-3	復帰突然変異試験 (参照 60)	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA98, TA1535, TA1537, WP2 <i>uvrA</i> 株	78.1-5000 $\mu$ g/mL (+/-S9)	陰性
代謝物 M-4	復帰突然変異試験 (参照 61)	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA98, TA1535, TA1537, WP2 <i>uvrA</i> 株	156-5000 $\mu$ g/mL (-S9) 78.1~5000 $\mu$ g/mL (+S9)	陽性 TA98 (+S9)
代謝物 M-5	復帰突然変異試験 (参照 62)	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA98, TA1535, TA1537, WP2 <i>uvrA</i> 株	78.1-5000 $\mu$ g/mL (+/-S9)	陰性
代謝物 M-15	復帰突然変異試験 (参照 63)	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA98, TA1535, TA1537, WP2 <i>uvrA</i> 株	156-5000 $\mu$ g/mL (+/-S9)	陰性
混在物 S-L	復帰突然変異試験 (参照 64)	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA98, TA1535, TA1537, WP2 <i>uvrA</i> 株	156-5000 $\mu$ g/mL (+/-S9)	陰性
混在物 I-12	復帰突然変異試験 (参照 65)	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA98, TA1535, TA1537, WP2 <i>uvrA</i> 株	本試験： 0.625-320 $\mu$ g/mL (-S9) 10.0-1280 $\mu$ g/mL (+S9) 追加試験： 0.625-160 $\mu$ g/mL (-S9)	陽性 TA98 (+S9)

注) +/-S9 : 代謝活性化系存在下及び非存在下、+S9 : 代謝活性化系存在下

#### 14. その他の毒性試験

##### (1) 肝腫瘍のメカニズム試験

###### ①ラットを用いた肝2段階発がんイニシエーション試験

Fischer ラット（一群雄 12 匹）を用いた単回経口（原体：2000 mg/kg 体重）投与による 10 週間の発がんイニシエーション試験（イニシエーター陽性対照物質：DEN、プロモーター：PB）が実施された。

GST-P 陽性細胞巢の数および面積が指標としたところ、投与群は陽性巢の数及び面積において溶媒投与群との反応に差がなく、DEN 投与群と比較すると統計学的に有意な低値を

示した。

本試験条件下では、ベンチアバリカルブイソプロピルは肝に対する発がんイニシエーション作用はないと考えられた。(参照 66)

#### ②ラットを用いた肝 2 段階発がんプロモーション試験

Fischer ラット (一群雄 12 匹) を用いた混餌 (原体: 10000 ppm) 投与による 8 週間発がんプロモーション試験 (イニシエーター: DEN、プロモーター陽性対照物質: PB) が実施された。

DEN+ベンチアバリカルブイソプロピル投与群および DEN+PB 群で有糸分裂が増加し、また、GST-P 陽性細胞巢の数および面積が増加した。

本試験条件下では、ベンチアバリカルブイソプロピルは DEN をイニシエーターとした場合にプロモーション作用を示すと考えられた。(参照 67)

#### ③マウスを用いた薬物代謝酵素誘導及び肝細胞増殖確認試験

B6C3F1 マウス (一群雌雄各 8 匹) を用いた 1 日 1 回 7 日間強制経口 (原体: 10, 1000 mg/kg 体重/日) 投与による薬物代謝酵素誘導及び肝細胞増殖確認試験が実施された。

1000 mg/kg 体重投与群の雌雄で肝比重量の増加、総 P450 量の増加、P450 分子種の増加 (CYP1A2(1A1)、CYP2B1(2B2)、CYP3A2)、肝細胞肥大、雄で肝細胞壊死が認められた。BrdU 免疫組織染色の標識率は投与群と対照群で明らかな差は認められなかった。

ベンチアバリカルブイソプロピル投与によりマウスの肝臓に増加した P450 分子種は、フェノバルビタール投与による酵素誘導パターンと類似していた。また、細胞増殖活性に対する影響は極めて弱いと考えられた。(参照 68)

#### ④ラットを用いた薬物代謝酵素誘導及び肝細胞増殖確認試験

Fischer ラット (一群雌雄各 8 匹) を用いた 1 日 1 回 7 日間強制経口 (原体: 10, 1000 mg/kg 体重/日) 投与による薬物代謝酵素誘導及び肝細胞増殖確認試験が実施された。

1000mg/kg 体重投与群の雌雄で肝比重量の増加、P450 分子種の増加 CYP2B1(2B2)、CYP3A2)、雄で (CYP1A1 (1A2)、総 P450 量の増加が認められた。BrdU 免疫組織染色の標識率は投与群と対照群で有意な差は認められなかった。(参照 69)

#### ⑤マウスを用いた肝細胞増殖活性測定

(2) ①の甲状腺腫瘍メカニズム試験 (100 または 500ppm で 14 日間混餌投与) で得られたマウスの肝臓試料を用いて PCNA 免疫組織化学検査が実施された。

PCNA 標識率に有意な差は認められなかった。(参照 70)

#### ⑥ラット及びマウスにおける肝脂質過酸化量測定

Fischer ラット (一群雌雄各 5 匹) 及び B6C3F1 マウス (一群雌雄各 5 匹) を用いて 7 日間混餌 (ラット: 原体: 0, 50, 10000 ppm, 雄: 0, 3.6, 753, 雌: 0, 3.7, 729mg/kg 体重/日に相当, マウス: 原体: 0, 100, 5000 ppm, 雄: 0, 19.4, 1066, 雌: 0, 21.4, 1370mg/kg 体重/日に相当,) 投与し、過酸化脂質量を蛋白量 1mg 当たりのチオバルビツール酸価 (TBA

価)として算出することにより肝中脂質過酸化量の測定が行われた。

ラットの10000 ppm投与群の雌雄で肝比重量増加が、雄でTBA価増加が、マウスの5000 ppm投与群の雌雄で肝比重量増加及びTBA価増加が認められた。

肝脂質過酸化能の程度は、マウス雄>マウス雌・ラット雄であり、酸化ストレスの程度がマウス雄で最も強度であり、マウス雌とラット雄は同程度であった。(参照 79)

#### ⑦マウス及びラット肝臓における肝細胞増殖活性測定

マウス及びラット4週間反復経口投与試験(9(4)及び9(5))、ラット90日間亜急性毒性試験(9(1))並びにマウス13週間反復投与試験(マウス発がん性試験(10(3))の予備試験)から得られた保存肝臓資料を用いて、肝臓におけるPCNA標識率の測定が行われた。

マウス4週間では、20000及び50000 ppm群でPCNA標識率の有意な増加がみられ、高投与群における細胞増殖活性が認められた。

マウス13週間では、20000 ppm群に増加傾向がみられたが、有意ではなかった。

ラット4週間では、50000 ppm群に増加傾向がみられたが、有意ではなかった。

ラット13週間では対照群とほぼ同等であった。

以上のことより、肝細胞腫瘍が誘発されたマウスでは、高用量を投与すると肝細胞の増殖活性が増加すると考えられた。(参照 71)

### (2) 甲状腺腫瘍発生メカニズム試験

#### ①マウスの肝中UDP-GT活性、血清中TSH、T3及びT4の測定

B6C3F1マウス(一群雄各6匹)を用いた混餌(原体:0, 100, 5000 ppm, 0, 17.0, 855, mg/kg体重/日に相当)投与による7及び14日間の甲状腺腫瘍メカニズム試験が実施された。

5000ppm投与群で肝ミクロソーム中のUDP-GT活性の増加、血清中T4の減少、肝比重量の増加、肝肥大、肝臓の暗色化が認められた。血清中TSH及びT3には変化が認められなかった。(参照 72)

#### ②マウス血清中TSH測定試験

B6C3F1マウス(一群雄各12匹)を用いた混餌(原体:0, 100, 5000 ppm, 0, 15.7, 809.8, mg/kg体重/日に相当)投与による16週間の甲状腺腫瘍メカニズム試験において、5000ppm投与群で血清中TSHの増加が認められた。14.(2)①の試験で肝ミクロソーム中のUDP-GT活性の増加、血清中T4の減少が認められたことに加え、本試験で血清中TSH濃度の増加が認められたことから、ベンチアバリカルブイソプロピルによる甲状腺腫瘍の発生は、内分泌ホルモンのフィードバック調節の結果に起因することが一因であると考えられた。(参照 73)

#### ③ラットの肝中UDP-GT活性、血清中TSH、T3及びT4の測定

Fischerラット(一群雄各10匹)を用いた混餌(原体:0, 200, 10000 ppm, 0, 13.3, 661.4, mg/kg体重/日に相当)投与による14日間の甲状腺機能亢進メカニズム試験が実施された。

10000 ppm投与群で摂餌量の増加、肝ミクロソーム中のUDP-GT活性の増加、血清中

T4 の減少、肝比重量の増加、肝肥大が認められた。血清中 TSH は有意ではないが増加傾向が認められ、血清中 T3 には変化は認められなかった。

ベンチアバリカルブイソプロピルはラット肝臓の UDP-GT を誘導することにより血清中 T4 を減少させ、そのフィードバック機構により甲状腺を刺激した（ろ胞上皮過形成）と考えられた。（参照 74）

### （3）子宮腫瘍発生メカニズム試験

#### ①卵巣摘出ラットを用いた子宮肥大試験

卵巣摘出 Fischer ラット（一群雌各 6 匹）を用いた 1 日 1 回 14 日間の強制経口（原体：0, 10, 100, 1000 mg/kg 体重）投与による子宮肥大試験が実施された。

子宮重量はいずれの投与群でも溶媒対照群と同程度であり、組織学検査においても萎縮した子宮組織以外に所見は観察されなかった。子宮内膜細胞の BrdU 標識率にも差は認められなかった。

本試験条件下では、ベンチアバリカルブイソプロピルの子宮肥大作用及び子宮の細胞増殖作用は認められず、エストロゲン作用を示唆する変化は認められないと考えられた。（参照 75）

#### ②ラットの卵巣、子宮及び肝中アロマトラーゼ活性、肝のエストロゲン代謝酵素測定及び血清中ホルモン測定

Fischer ラット（一群雌各 10 匹）を用いた混餌（原体：0, 200, 10000 ppm, 0, 11.6, 576.4, mg/kg 体重/日に相当）投与による 8 週間の子宮癌発生メカニズム試験が実施された。

10000ppm 投与群で肝臓中の酵素（アロマトラーゼ、エストラジオール・2・ヒドロキシラーゼ及びエストラジオール・4・ヒドロキシラーゼ）活性の増加、肝比重量の増加、肝臓の暗色化が認められた。卵巣及び子宮中のアロマトラーゼ活性、血清中の黄体形成ホルモン、17β-エストラジオール及びプロゲステロンの濃度、17β-エストラジオール/プロゲステロン比、卵巣及び子宮の重量変化は認められなかった。（参照 56, 76～77）