

本試験において毒性所見は認められなかったことから、無毒性量は本試験の最高用量 2,000 mg/kg 体重であると考えられた。神経毒性は認められなかった。(参照 2、3、5)

9. 眼・皮膚に対する刺激性及び皮膚感作性試験

ウサギを用いた眼及び皮膚刺激性試験が実施された。眼に対しては、結膜及び角膜にごくわずかな炎症がみられたが、いずれも 72 時間以内に消失した。皮膚に対しては、ごくわずかな炎症がみられたが、48 時間以内に消失した。本剤のウサギの眼及び皮膚に対する刺激性は極めてわずかであると考えられた。

モルモットを用いた皮膚感作性試験 (Maximization 法) が実施された。皮膚感作性は陰性であった。(参照 2、5)

10. 亜急性毒性試験

(1) 90 日間亜急性毒性試験 (ラット) ①

SD ラット (一群雌雄各 10 匹) を用いた混餌 (原体: 0、100、2,000、10,000 及び 15,000 ppm) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

各投与群で認められた毒性所見は表 3 に示されている。

本試験において、2,000 ppm 以上投与群の雄で体重増加抑制等、雌で脾髄外造血亢進が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 100 ppm (雄: 6.56 mg/kg 体重/日、雌: 7.71 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 2、4、5)

表 3 90 日間亜急性毒性試験 (ラット) ①で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
15,000 ppm	・摂餌量低下	
10,000 ppm 以上	・体重低下 ・RBC、Hb 及び Ht 低下 ・網状赤血球数増加 ・肝比重量 ² 増加 ・脾髄外造血亢進 ・腎近位尿管へモジデリン沈着	・体重低下及び体重増加抑制 ・摂餌量及び食餌効率低下 ・RBC、Hb 及び Ht 低下 ・網状赤血球数増加 ・肝比重量増加 ・腎近位尿管へモジデリン沈着
2,000 ppm 以上	・体重増加抑制 ・食餌効率低下	・脾髄外造血亢進
100 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

² 体重比重量を比重量という (以下同じ)。

(2) 90 日間亜急性毒性試験 (ラット) ②

SD ラット (一群雌雄各 10 匹) を用いた混餌 (原体: 0、100、2,000、10,000 及び 15,000 ppm) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

各投与群で認められた毒性所見は表 4 に示されている。

本試験において、2,000 ppm 以上投与群の雌雄で体重低下等が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 100 ppm (雄: 6.20 mg/kg 体重/日、雌: 7.54 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 2、4、5)

表 4 90 日間亜急性毒性試験 (ラット) ②で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
15,000 ppm	・精巣小型化 ・精細管萎縮及び変性 ・精巣上体の精子数減少	・腎尿管上皮細胞萎縮
10,000 ppm 以上	・摂餌量低下 ・Glu 及びビリルビン低下 ・腎へモジデリン沈着	・RBC、Hb 及び Ht 低下 ・網状赤血球数増加 ・Glu 及びビリルビン低下
2,000 ppm 以上	・体重低下及び体重増加抑制 ・食餌効率低下 ・RBC、Hb 及び Ht 低下 ・網状赤血球数増加 ・TP 及び Glob 低下	・体重低下及び体重増加抑制 ・摂餌量及び食餌効率低下 ・腎へモジデリン沈着
100 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

(3) 90 日間亜急性毒性試験 (イヌ)

ビーグル犬 (一群雌雄各 4 匹) を用いた混餌 (原体: 0、100、4,000 及び 8,000 ppm) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

各投与群で認められた毒性所見は表 5 に示されている。

8,000 ppm 投与群の雌 2 例が切迫と殺された。この 2 例には、摂餌量及び体重低下の他、検体投与の影響と考えられる貧血所見 (RBC、Ht 及び Hb 低下、MCV 及び MCHC 増加) が認められた。

本試験において、4,000 ppm 以上投与群の雌雄で肝絶対及び比重量増加等が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 100 ppm (雄: 3.9 mg/kg 体重/日、雌: 3.7 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 2、4)

表5 90日間亜急性毒性試験（イヌ）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
8,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・RBC、Hb及びHt低下 ・網状赤血球数増加 ・精巣絶対及び比重量低下 ・胸骨及び大腿骨骨髓細胞増生 	<ul style="list-style-type: none"> ・切迫と殺（2例） ・体重低下及び体重増加抑制 ・RBC、Hb及びHt低下 ・網状赤血球数増加 ・AST、ALT及びALP増加 ・胸骨及び大腿骨骨髓細胞増生
4,000 ppm以上	<ul style="list-style-type: none"> ・AST、ALT及びALP増加 ・肝絶対及び比重量増加 ・類洞マクロファージ褐色色素沈着 ・精細管壊死、精子形成欠如 ・精巣上体の精子数減少、無精子、細胞残屑 	<ul style="list-style-type: none"> ・肝絶対及び比重量増加 ・類洞マクロファージ褐色色素沈着 ・胆汁栓
100 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

(4) 90日間亜急性神経毒性試験（ラット）

SDラット（一群雌雄各11匹）を用いた混餌（原体：0、100、750、1,500及び3,000 ppm）投与による90日間亜急性神経毒性試験が実施された。なお、各群6匹については神経病理組織学的検査が実施された。

対照群の雌1例が52日に切迫と殺されたが、その他の動物では死亡及び臨床症状はみられなかった。

本試験において、8,000 ppm投与群の雄及び750 ppm以上投与群の雌で体重低下及び体重増加抑制が認められたことから、無毒性量は雄で1,500 ppm (92.7 mg/kg 体重/日)、雌で100 ppm (7.1 mg/kg 体重/日) であると考えられた。神経毒性は認められなかった。（参照2、5）

(5) 21日間亜急性経皮毒性試験（ウサギ）

NZWウサギ（一群雌雄各5匹）を用いた経皮（原体：0、50、300及び1,000 mg/kg 体重/日）投与による21日間亜急性毒性試験が実施された。

本試験において、毒性所見は認められなかったことから、無毒性量は雌雄とも本試験の最高用量1,000 mg/kg 体重/日であると考えられた。（参照2、5）

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5匹）を用いた混餌（原体：0、35、875及び3,500 ppm）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6に示されている。

3,500 ppm投与群の雌雄各1例が切迫と殺され、剖検により、雄では胸腔及び消化管の急性出血、胸腺壊死、雌では肺炎がみられた。

本試験において、3,500 ppm投与群の雌雄で小葉中心性肝細胞肥大等が認められたことから、無毒性量は雌雄とも875 ppm (雄：26.9 mg/kg 体重/日、雌：27.7 mg/kg 体重/日) であると考えられた。（参照2、4、5）

表6 1年間慢性毒性試験（イヌ）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
3,500 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・切迫と殺（1例） ・体重増加抑制 ・RBC、Hb及びHt低下 ・ALP増加 ・肝絶対重量、比重量及び対脳重量比増加 ・小葉中心性肝細胞肥大 	<ul style="list-style-type: none"> ・切迫と殺（1例） ・RBC、Hb及びHt低下 ・肝比重量増加 ・小葉中心性肝細胞肥大
875 ppm以下	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）

SDラット（一群雌雄各62匹）を用いた混餌（原体：0、10、100、750及び1,500 ppm）投与による2年間慢性毒性/発がん性併合試験が実施された。なお、試験後期の生存率が低下したため、十分な数の最終と殺動物を得るために22カ月で終了した。

各投与群で認められた毒性所見は表7、精巣間細胞過形成及び腺腫の発生頻度は表8に示されている。

750 ppm以上投与群の雄で精巣間細胞過形成及び腺腫が増加した。

本試験において、750 ppm以上投与群の雌雄で体重低下等が認められたことから、無毒性量は雌雄とも100 ppmと考えられた。しかし、この投与群については検体の安定性及び混餌飼料の給餌方法に問題があったため、飼料中の検体濃度の分析結果に基づき、数値を分析値の最も低い60%に補正する必要が生じた。したがって、本試験における無毒性量は雌雄とも60 ppm (雄：2.44 mg/kg 体重/日、雌：3.28 mg/kg 体重/日) であると考えられた。（参照2～5）

(雄ラットにおける精巣間細胞腫瘍誘発の機序に関しては[14. (1)～(4)]を参照)

表7 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

投与群	雄	雌
1,500 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・坐骨神経のミエリン及び軸索変性 	<ul style="list-style-type: none"> ・坐骨神経のミエリン及び軸索変性
750 ppm以上	<ul style="list-style-type: none"> ・体重低下及び体重増加抑制 ・RBC、Hb及びHt低下 ・精巣間細胞過形成及び腺腫 	<ul style="list-style-type: none"> ・体重低下及び体重増加抑制
100 ppm以下	毒性所見なし	毒性所見なし

表8 精巣間細胞過形成及び腺腫の発生頻度 (()内は%)

投与群 (ppm)	0	10	100	750	1,500
検査動物数	51	46	47	50	51
精巣	過形成 10(20)	7(15)	11(23)	18*(36)	27*(53)
間細胞	腺腫 0	2(4.3)	1(2.1)	7*(14.0)	7*(13.7)

* : p<0.05 (Cochran-Armitage の傾向検定)

(3) 18 カ月間発がん性試験 (マウス)

ICR マウス (一群雌雄各 80 匹) を用いた混餌 (原体 : 0、10、150、2,500 及び 7,000 ppm) 投与による 18 カ月間発がん性試験が実施された。

各投与群で認められた毒性所見は表 9、肝細胞腺腫及び癌の発生頻度は表 10、その背景データは表 11 に示されている。

雄では、2,500 ppm 以上投与群で肝細胞腺腫の発生頻度が傾向検定で有意に増加した。しかし、その発生頻度は背景データの範囲内であった。

7,000 ppm 投与群の雌雄では P450 が増加した。

本試験において、2,500 ppm 以上投与群の雌雄で肝絶対及び比重量増加等が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 150 ppm であると考えられたが、この投与群では、検体の安定性の問題から飼料中の検体濃度の分析結果に基づき、数値を 70% に補正する必要が生じた。したがって、本試験における無毒性量は雌雄とも 105 ppm (雄 : 14.6 mg/kg 体重/日、雌 : 19.4 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 3~5)

表 9 18 カ月間発がん性試験 (マウス) で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
7,000 ppm		・体重低下 ・肝臓の髓外造血巣
2,500 ppm 以上	・肝絶対及び比重量増加 ・肝臓の髓外造血巣、単細胞壊死 ・肝細胞腺腫増加	・肝絶対及び比重量増加 ・肝変異細胞巣
150 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

表 10 肝細胞腺腫及び癌の発生頻度 (()内は%)

性別	雄					雌				
	0	10	150	2,500	7,000	0	10	150	2,500	7,000
検査動物数	81	80	80	80	80	78	81	79	83	81
肝細胞腺腫	10(12)	4(5)	5(6)	13(16*)	15(19*)	0	0	0	4(5)	1(1)
肝細胞癌	3(4)	3(4)	0	0	1(1)	0	0	0	1(1)	0
肝細胞腺腫+癌	12(15)	7(9)	5(6)	13(16)	16(20*)	0	0	0	5(6**)	1(1)

* : Cochran-Armitage の傾向検定 ** : Fisher の検定

表 11 肝細胞腺腫及び癌の背景データ (%)

	肝細胞腺腫	肝細胞癌	肝細胞腺腫+癌
雄	5.0~21.7	0~7.5	7.5~21.7
雌	0~2.5	0~1.3	0~2.5

12. 生殖発生毒性試験

(1) 2 世代繁殖試験

SD ラット (一群雌雄各 30 匹) を用いた混餌 (原体 : 0、10、100、750 及び 1,500 ppm) 投与による 2 世代繁殖試験が実施された。

親動物では、750 ppm 以上投与群の雌雄で体重低下、体重増加抑制、摂餌量低下及び食餌効率低下が認められた。児動物では、750 ppm 以上投与群の F₁ 世代で低体重 (哺育 14 及び 21 日) が認められ、母乳及び飼料を介した検体摂取による影響と考えられた。

本試験において、750 ppm 以上投与群の親動物で体重低下等、児動物で低体重が認められたことから、無毒性量は親動物及び児動物で 100 ppm (雄 : 5.81 mg/kg 体重/日、雌 : 7.75 mg/kg 体重/日) であると考えられた。繁殖能に対する影響は認められなかった。(参照 2、3)

(2) 発生毒性試験 (ラット)

SD ラット (一群雌 25 匹) の妊娠 7~16 日に強制経口 (原体 : 0、30、120、350 及び 1,000 mg/kg 体重/日、溶媒 : 0.5%MC 水溶液) 投与して発生毒性試験が実施された。

本試験において、350 mg/kg 体重/日以上投与群の母動物で体重増加抑制、摂餌量低下及び食餌効率の低下傾向が認められ、胎児に毒性所見は認められなかったことから、無毒性量は母動物で 120 mg/kg 体重/日、胎児で本試験の最高用量 1,000 mg/kg 体重/日であると考えられた。催奇形性は認められなかった。(参照 2、3)

(3) 発生毒性試験 (ウサギ)

人工授精させた NZW ウサギ (一群雌 20 匹) の妊娠 7~19 日に強制経口 (原体 : 0、15、90、270 及び 800 mg/kg 体重/日、溶媒 : 0.5%MC 水溶液) 投与して発生毒性試験が実施された。

本試験において、270 mg/kg 体重/日以上投与群の母動物で無糞または糞量減少、被毛の汚れ、死亡、流産増加、体重増加抑制及び食餌効率の低下傾向、胎児で体重低下が認められたことから、無毒性量は母動物及び胎児で 90 mg/kg 体重/日であると考えられた。催奇形性は認められなかった。(参照 2、3)

1.3. 遺伝毒性試験

トリフルスルフロメチルの細菌を用いた復帰突然変異試験、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞を用いた遺伝子突然変異試験、ヒトリンパ球を用いた *in vivo* 染色体異常試験及びマウスを用いた小核試験が実施された。

結果は表 12 に示されている。ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験の代謝活性化系存在下でのみ陽性の結果が得られたが、高用量まで実施された *in vivo* 小核試験の結果は陰性であったことから、生体において問題となる遺伝毒性はないものと考えられた。(参照 2、3、5)

表 12 遺伝毒性試験概要

試験	対象	処理濃度・投与量	結果	
<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538 株)	①62.5~1,000 µg/プレート (+/-S9) ②50~3,000 µg/プレート (+/-S9)	陰性
	遺伝子突然変異試験 (HGPRT 座位)	チャイニーズハムスター卵巣由来細胞(CHO)	100~2,000 µg/mL (+/-S9)	陰性
	染色体異常試験	ヒトリンパ球	①0.5~2.0 mg/mL (+/-S9) ②0.1~2.0 mg/mL (+/-S9)	陽性 ¹⁾
<i>in vivo</i>	小核試験	ICR マウス (一群雌雄各 5~6 匹)	1,250, 2,500, 5,000 mg/kg 体重 (単回経口投与)	陰性

注) +/-S9: 代謝活性化系存在下及び非存在下

¹⁾ 代謝活性化系存在下で陽性

また、代謝物 C、E 及び F について、細菌を用いた復帰突然変異試験が実施された結果、いずれも陰性であった。(参照 2)

1.4. その他の試験—精巣間細胞への影響

雄ラットにおける精巣の間細胞腫瘍誘発の機序について調査する目的で、トリフルスルフロメチルが間細胞に及ぼす影響について検討された。

(1) *in vivo*

SD ラット (一群雄 10 匹) に、トリフルスルフロメチルを 0、1,000、1,500 及び 2,000 mg/kg 体重/日 (溶媒: コーン油) で 15 日間強制経口投与する試験が実施された。また、と殺 1 時間前に hCG を投与する試験群 (0 及び 2,000 mg/kg 体重/日) も設定された。

すべての検体投与群において、体重及び摂餌量低下、前立腺、精囊腺及び凝固腺の絶対及び比重量低下、血清中のエストラジオール低下が認められた。また、統計学的有意差はなかったものの、LH、FSH 及びプロラクチンのわずかな増加も認められた。肝臓のβ-酸化能、P450 含有量及びアロマトラーゼ活性に検体投与の影響はみられなかった。

hCG 投与群では、2,000 mg/kg 体重/日投与群でテストステロンの増加及びエストラジオールの低下が認められた。(参照 4、5)

(2) *in vitro* ①

in vitro の試験として、パーフルオロオクタン酸アンモニウムまたは PB によって誘導されたラット肝細胞に、トリフルスルフロメチルを 0.01~0.5 µM の濃度で処理し、アロマトラーゼ活性の測定あるいは P450 との結合領域の究明が実施された。

アロマトラーゼ活性は、最低濃度から用量依存性に低下した。P450 は II 型の結合領域を示した。また、ラットの 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験 [11. (2)] から採取された 1 年分の血液サンプルを用いて、ホルモン分析を実施した結果、統計学的に有意な変動は認められなかった。しかし、750 ppm 以上投与群では、テストステロン及び FSH の増加傾向、エストラジオールの低下傾向がみられた。LH は影響を受けなかった。(参照 4、5)

(3) *in vitro* ②

さらに *in vitro* の試験として、11 週齢の雄ラットから摘出した精巣間細胞に、トリフルスルフロメチルを 0、0.1、0.5、1.0、10、100 及び 1,000 µM の濃度で 2 時間処理し、ホルモン分析が実施された。なお、すべての処理濃度のうち、各 3 培地にはそれぞれ 2 IU の hCG を処理した。

ホルモン濃度に hCG 処理の影響はみられなかった。しかし、トリフルスルフロメチルのみを処理した培地では、テストステロンが顕著に増加 (対照群の 198%) し、エストラジオールは低下した。(参照 4、5)

(4) まとめ

トリフルスルフロメチルは、*in vitro* では用量依存性にアロマトラーゼ活性を低下させ、その結果、アロマトラーゼによる、テストステロンのエストラジオールへの変換を阻害すると考えられたが、*in vivo* では明確な結論は得られなかった。(参照 2、4、5)