

ジフェニルアルシン酸（DPAA）の毒性試験報告書
（第2版）

平成23年6月

環境省総合環境政策局環境保健部 環境安全課

環境リスク評価室

リサイクル適正の表示：紙へリサイクル可

本冊子は、グリーン購入法に基づく基本方針における「印刷」に係る判断の基準にしたがい、印刷用の紙へのリサイクルに適した材料【A ランク】のみを用いて作製しています。

総合 評価値	92	古紙パルプ配合率	100%
		森林認証材パルプ利用割合および間伐材パルプ利用割合	0%
		その他の持続可能性を目指したパルプ利用割合	0%
		白色度	68%
		坪量	66 g/m ²

1. 目次

1.	目次	2
2.	緒言	5
3.	試験リスト	6
4.	ジフェニルアルシン酸 (DPAA) データ	8
5.	試験概要	9
5.1	一般毒性試験	9
5.1.1	DPAA ラット 28 日反復経口毒性試験	9
5.1.2	DPAA ラット 91 日反復経口毒性試験	15
5.1.3	DPAA 新生児ラット 28 日反復経口毒性試験	22
5.1.4	DPAA ラット 7 日反復経皮毒性試験	26
5.1.5	PMAA ラット 28 日反復経口毒性試験	26
5.1.6	MPAA ラット 28 日反復経口毒性試験	30
5.2	生殖毒性試験	30
5.2.1	DPAA ラット催奇形性試験	30
5.2.2	DPAA ラット初期胚発生 (受胎能～着床) に関する試験	30
5.2.3	DPAA ラット出生前後の発生・母動物に関する試験	30
5.2.3	DPAA ラット出生前後の発生・母動物に関する試験 (低用量追加試験)	30
5.3	遺伝毒性試験	30
5.3.1	DPAA 細菌を用いた復帰突然変異試験	30
5.3.2	DPAA ほ乳類細胞を用いた染色体異常試験	30
5.3.3	DPAA ラット小核試験	30
5.4	薬物動態試験	30
5.4.1	¹⁴ C 標識 DPAA を用いたラット単回投与時の血液・血漿中濃度試験	30
5.4.2	¹⁴ C 標識 DPAA を用いたラット単回投与時の体内分布試験	30
5.4.3	¹⁴ C 標識 DPAA を用いたラット単回投与時の排泄・体内残留性試験	30
5.4.4	¹⁴ C 標識 DPAA を用いた <i>in vitro</i> 代謝試験	30
5.4.5	¹⁴ C 標識 DPAA を用いたラット単回投与時の胎盤・胎児移行性試験	30
5.4.6	¹⁴ C 標識 DPAA を用いたラット単回投与時の乳汁移行性試験	30
5.4.7	¹⁴ C 標識 DPAA を用いた幼若ラット単回投与時の体内分布試験	30
5.4.8	¹⁴ C 標識 DPAA を用いたラット 7 日反復投与時の体内分布試験	30
5.4.9	¹⁴ C 標識 DPAA を用いたラット脳内分布試験	30

5.4.10	¹⁴ C 標識 DPAA を用いた <i>in vitro</i> 血球移行性試験	30
5.4.11	¹⁴ C 標識 DPAA を用いた <i>in vitro</i> 血漿蛋白結合性試験	30
5.4.12	DPAA ラット 91 日反復経口毒性試験での肝薬物代謝酵素試験	30
5.4.13	¹⁴ C 標識 DPAA を用いたラット 21 日反復投与時の脳内分布試験	30
5.4.14	¹⁴ C 標識 DPAA を用いたラット単回投与時の胆汁中排泄試験	30
5.4.15	¹⁴ C 標識 DPAA を用いたラット単回腹腔内投与時における治療候補物質併用投与時の排泄および体内残留性試験	30
5.4.15	¹⁴ C 標識 DPAA を用いたラット反復経口投与時の胎盤・胎児移行性試験（出生前後における反復投与時の児動物への移行）	30
5.5	物質特性試験	30
5.5.1	DPAA 解離定数測定試験	30
5.5.2	DPAA 分配係数測定試験	30
6.	総括	30
6.1	DPAA の体内動態	30
6.1.1	吸収	30
6.1.2	分布	30
6.1.3	代謝	30
6.1.4	排泄	30
6.2	DPAA の一般毒性	30
6.2.1	神経毒性	30
6.2.2	血液・造血器毒性	30
6.2.3	肝毒性	30
6.2.4	その他の影響	30
6.2.5	一般毒性試験における無影響量	30
6.3	DPAA の生殖発生毒性	30
6.4	DPAA の遺伝毒性	30
6.5	DPAA 関連物質（PMAA および MPAA）の毒性	30

【監修】

本報告書は環境省からの請負事業の毒性試験および薬物動態試験の結果に基づき，DPAA 毒性ワーキングチームによる監修を経て作成された。DPAA 毒性ワーキングチームのメンバーを以下に示す。

- | | |
|---------|---|
| 青山 博昭 | 財団法人 残留農薬研究所 毒性部部长 |
| 井上 達 | 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 新薬審査第一部 テクニカルエキスパート |
| ○ 櫻井 治彦 | 財団法人 産業医学振興財団 理事長
中央労働災害防止協会 労働衛生調査分析センター 技術顧問 |
| 清水 英佑 | 東京慈恵会医科大学 名誉教授 |
| 平野 靖史郎 | 独立行政法人 国立環境研究所 環境リスク研究センター 健康リスク研究室室長 |
| 宮川 宗之 | 独立行政法人 労働安全衛生総合研究所 健康障害予防研究グループ部長 |
| 鰐淵 英機 | 大阪市立大学大学院 医学研究科 教授 |

(座長：○)

2. 緒言

茨城県神栖市において、通常自然界に存在しない有機ヒ素化合物であるジフェニルアルシン酸（以下、DPAA）等による環境汚染に起因すると考えられる健康被害が生じたことを契機として、平成15年6月の閣議了解および同年12月の閣議決定に基づき、環境省においては、緊急措置事業として、DPAAによる症候及び病態について解明を図っているところである。

ラットを用いてDPAAに関する毒性試験を実施した結果、多くの知見を得ることができ、平成18年度11月「ジフェニルアルシン酸（DPAA）の毒性試験報告書」をとりまとめた。また、DPAAが中枢および末梢神経に長く留まる傾向が指摘されたこと、DPAAを出生前後に反復投与した試験において、児動物に行動試験の一部で影響が観察されたこと、DPAAの体外排泄に関して、胆汁からの排泄および体外排泄を促進する治療候補物質について検討する必要性が生じたことなど、追加試験が必要な課題についても明らかとなり、その後も毒性試験を実施し多くの知見が得られた。そこで、この度、毒性試験報告書を改訂することとなった。

なお、本報告書では、環境省が試験機関に直接委託し、実施した毒性試験の結果のみをとりまとめており、他の調査研究においてもDPAAの毒性試験が行われていることに留意する。また、本報告書における試験については、OECDのGLP原則に準拠した基準に適合する試験施設にて実施されたものである。

About this report

In 2003, health damages were observed among residents ingesting diphenylarsinic acid (DPAA) in groundwater in Kamisu City (then Kamisu Town). In the absence of knowledge on the toxicity of DPAA, the Ministry of the Environment commissioned several toxicity and pharmacokinetics tests of DPAA and other related substances, including 28 and 91 day repeated dose tests and reproductive toxicity tests. This report, first published in 2006 and revised in 2011, summarizes the results from these tests conducted by 2011.

3. 試験リスト

コード	試験略名	試験番号
一般毒性試験 (A)		
A-1	DPAA ラット 28 日反復経口毒性試験	B031825
A-2	DPAA ラット 91 日反復経口毒性試験	B041213
A-3	DPAA 新生児ラット 28 日反復経口毒性試験	B041296
A-4	DPAA ラット 7 日反復経皮毒性試験	B040272
A-5	PMAA ラット 28 日反復経口毒性試験	B050132
A-6	MMAA ラット 28 日反復経口毒性試験	B050572
生殖毒性試験 (B)		
B-1	DPAA ラット催奇形性試験	B041215
B-2	DPAA ラット初期胚発生 (受胎能～着床) に関する試験	B041587
B-3	DPAA ラット出生前後の発生・母動物に関する試験	B041589
B-4	DPAA のラット出生前後の発生・母動物に関する試験 (低用量追加試験) *1	SBL801-001
遺伝毒性試験 (C)		
C-1	DPAA 細菌を用いた復帰突然変異試験 (Ames 試験)	B041297
C-2	DPAA ほ乳類細胞を用いた染色体異常試験	B041298
C-3	DPAA ラット小核試験	B041300
薬物動態試験 (D)		
D-1	¹⁴ C 標識 DPAA を用いたラット単回投与時の血液・血漿中濃度試験	B041305
D-2	¹⁴ C 標識 DPAA を用いたラット単回投与時の体内分布試験	B041306
D-3	¹⁴ C 標識 DPAA を用いたラット単回投与時の排泄・体内残留性試験	B041307
D-4	¹⁴ C 標識 DPAA を用いた <i>in vitro</i> 代謝試験	B041308
D-5	¹⁴ C 標識 DPAA を用いたラット単回投与時の胎盤・胎児移行性試験	B050299
D-6	¹⁴ C 標識 DPAA を用いたラット単回投与時の乳汁移行性試験	B050300
D-7	¹⁴ C 標識 DPAA を用いた幼若ラット単回投与時の体内分布試験	B050301
D-8	¹⁴ C 標識 DPAA を用いたラット 7 日反復投与時の体内分布試験	B050302
D-9	¹⁴ C 標識 DPAA を用いたラット脳内分布試験	B050303
D-10	¹⁴ C 標識 DPAA を用いた <i>in vitro</i> 血球移行性試験	B041594
D-11	¹⁴ C 標識 DPAA を用いた <i>in vitro</i> 血漿蛋白結合性試験	B041593
D-12	DPAA ラット 91 日反復経口毒性試験での肝薬物代謝酵素試験	B041592
D-13	¹⁴ C 標識 DPAA を用いたラット 21 日反復投与時の脳内分布試験*1	B091269
D-14	¹⁴ C 標識 DPAA を用いたラット単回投与時の胆汁中排泄試験*1	B091270

薬物動態試験 (D)		
D-15	¹⁴ C 標識 DPAA を用いたラット単回腹腔内投与時における治療候補物質併用投与時の排泄および体内残留性試験 ^{*1}	B090271
D-16	¹⁴ C 標識 DPAA を用いたラット反復経口投与時の胎盤・胎児移行性試験 (出生前後における反復投与時の児動物への移行) ^{*1}	B101275
物質特性試験 (E)		
E-1	DPAA 解離定数測定試験	D050031
E-2	DPAA 分配係数測定試験	D050032

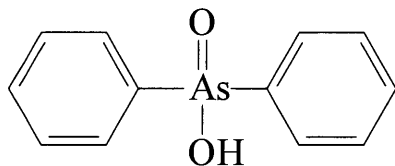
*1：平成 18 年度 11 月に作成した「ジフェニルアルシン酸 (DPAA) の毒性試験報告書」以降に実施した追加試験

4. ジフェニルアルシン酸 (DPAA) データ

Diphenylarsinic acid (DPAA)

分子式 : $C_{12}H_{11}O_2As$

構造式 :



分子量 : 262

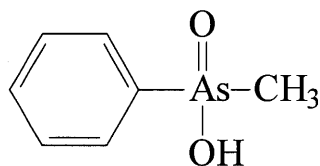
性 状 : 常温において白色の固体

融 点 : 170°C

また, DPAA の関連物質であるフェニルメチルアルシン酸 (PMAA) およびモノフェニルアルソン酸 (MPAA) の情報を以下に示した.

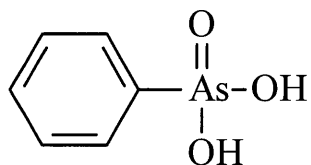
Phenylmethylarsinic acid (PMAA)

構造式 :



Phenylarsonic acid (MPAA)

構造式 :



5. 試験概要

5.1 一般毒性試験

5.1.1 DPAA ラット 28 日反復経口毒性試験

コード番号： A-1

試験番号： B031825

DPAA を 0, 0.3, 1.2 および 5.0 mg/kg の用量（用量設定試験の結果から設定）で雌雄の SD 系ラット [Crj:CD(SD)IGS, SPF] に 28 日間反復経口投与し、現れる生体の機能および形態の変化を観察し、その毒性と回復性を評価した。

群構成

群名	投与期間終了後解剖		回復期間終了後解剖	
	雄	雌	雄	雌
対照	5	5	5	5
0.3 mg/kg	5	5	—	—
1.2 mg/kg	5	5	—	—
5.0 mg/kg	5	5	5	5

観察・測定項目

一般状態

投与期間は 1 日 2 回（投与前，投与後約 30 分）観察した。その他の期間は 1 日 1 回午前中に観察した。

行動検査

以下に示す詳細な症状観察は、投与開始前日に 1 回、投与期間中に毎週 1 回、いずれも午後に行った。機能検査および自発運動量の測定については、第 4 週の午後に 1 回実施した。投与期間中の検査で被験物質の影響が疑われる変化が認められたため、回復期間中にも同様に詳細な症状観察を毎週 1 回午後に、機能検査および自発運動量の測定を第 6 週の午後に 1 回実施した。なお、いずれの検査においても雌については 5.0 mg/kg 群に生存例が存在しなかったため、対照群を含めて検査は実施しなかった。

自発運動量の測定時にはオートクレーブ滅菌したポリカーボネート製ケージ（TR-PC-200, 265W×426D×200H mm, トキワ科学器械株式会社）内に個別飼育とし、自発運動量の測定を除いて、各動物に動物番号とは無関係な検査番号をランダムに付加したブラインド検査とするとともに、可能な限り当該試験の投与および観察に従事していない者が実施した。

(1) 詳細な症状観察

(a) ホームケージ内での観察

ホームケージ内での動物の様子を静かに1分間観察した。

検査項目：振戦，間代性痙攣，強直性痙攣，呼吸

(b) ハンドリング時の観察

動物の体軀をやさしく背側から掴み，ケージから取り出して観察した。

検査項目：ケージからの取り出し易さ，ハンドリングに対する反応，攻撃性，皮膚（外傷，皮膚の色調），被毛（被毛の汚れ），眼（眼球突出，眼瞼閉鎖状態），粘膜（結膜の色調），分泌物，流涙，流涎，立毛，瞳孔径

(c) オープンフィールドでの観察

オープンフィールドの中心に動物をおいてから静かに2分間観察した。オープンフィールドに動物を入れる前に，その床を硬く搾った布で水拭きした。

検査項目：立ち上がり，覚醒度，排尿，排便，体位・姿勢，呼吸，運動協調性，歩行の異常，振戦，間代性痙攣，強直性痙攣，常同行動，異常行動

(2) 機能検査

(a) 刺激に対する反応性

オープンフィールド内で検査した。

検査項目：接近反応，接触反応，聴覚反応，テールピンチ反応，空中正向反射

(b) 握力測定

デジタルフォースゲージ（DPS-5，株式会社イマダ）を用いて測定した。

検査項目：前肢握力，後肢握力

なお，第4週の検査において，一部の動物（動物番号：10405，10409および50406）が握力測定装置を握らなかったため，データが欠失した。また，雄の第6週の検査では5.0 mg/kg群の動物数が2例であったことから，統計学的解析を実施しなかった。

(3) 自発運動量の測定

自発運動量測定装置（SUPERMEX，室町機械株式会社）を用いた。投与後の観察終了後，ポリカーボネート製ケージに動物を移し，ケージ馴化を行った。測定直前に新たなポリカーボネート製ケージに交換し，1時間測定した。なお，測定値は測定開始から10分毎に集計した。なお，雄の第6週の検査では5.0 mg/kg群の動物数が2例であったことから，統計学的解析を実施しなかった。

体重

全例の体重を投与期間中は第1，8，15，22および28日に，回復期間中は第29，36および42日に電子天秤（PB3002-S，メトラー・トレド株式会社）を用いて測定した。また，計画解剖日ならびに死亡動物については死亡発見時にも測定した。

摂餌量

ケージごとに風袋込み重量を電子天秤（PB3002-S，メトラー・トレド株式会社）を用いて測

定し、第1～8, 8～15, 15～22, 22～27, 29～36 および 36～41 日の測定日間における1匹あたりの1日平均摂餌量を算出した。摂餌量は測定期間の終了日で表示した。

血液学的検査

投与および回復期間終了後の計画解剖日（第29 および 43 日）に全対象動物を前日の夕方より絶食し、チオペンタールナトリウム（ラボナール、田辺製薬株式会社）を腹腔内投与して麻酔し、後大静脈より採血した。採取した血液を用いて次に示す項目を測定した。プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間の項目の測定には、凝固阻止剤として3.2w/v%クエン酸三ナトリウム水溶液を使用し、遠心分離（12000 rpm, 約 12000 g, 3 分間, 約 4°C）して得られた血漿を用いた。その他の項目の測定には、凝固阻止剤 EDTA-2K で処理した血液を用いた。

項目	方法	測定機器
赤血球数 (RBC)	球状化処理二次元レーザーFCM 法	(a)
ヘモグロビン濃度 (Hb)	シアンメトヘモグロビン法	(a)
ヘマトクリット値 (Ht)	球状化処理二次元レーザーFCM 法	(a)
平均赤血球容積 (MCV)	RBC と Ht より算出	-
平均赤血球血色素量 (MCH)	RBC と Hb より算出	-
平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	Hb と Ht より算出	-
網赤血球数 (Ret)	RNA 染色によるレーザーFCM 法	(a)
血小板数 (PLT)	球状化処理二次元レーザーFCM 法	(a)
プロトロンビン時間 (PT)	光散乱検出方式	(b)
活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	光散乱検出方式	(b)
白血球数 (WBC)	酸性界面活性剤によるレーザーFCM 法	(a)
WBC 分類 (WBC Diff.)	ペルオキシダーゼ染色による FCM 法および酸性界面活性剤によるレーザーFCM 法	(a)

測定機器：

(a), ADVIA120 (バイエル メディカル株式会社)

(b), CA-510 (シスメックス株式会社)

血清生化学的検査

各計画解剖時に採取した血液の一部を室温で約 30 分間以上静置後、遠心分離（3000 rpm, 2050 g, 10 分間, 約 4°C）し、得られた血清を用いて次の項目を測定した。

項目	方法
ASAT (GOT)	UV-rate 法 (JSCC 改良法)
ALAT (GPT)	UV-rate 法 (JSCC 改良法)
γGT	γ-グルタミル-p-ニトロアニリド基質法 (SSCC 改良法)
ALP	p-ニトロフェニルリン酸基質法 (JSCC 改良法)
アセチルコリンエステラーゼ	アセチルチオコリン-DTNB 法
総ビリルビン	酵素法 (BOD 法)
尿素窒素	酵素-UV 法 (Urease-LEDH 法)
クレアチニン	酵素法 (Creatininase-POD 法)
グルコース	酵素法 (HK-G6PDH 法)
総コレステロール	酵素法 (CO-HDAOS 法)
トリグリセライド	酵素法 (GPO-HDAOS 法, グリセリン消去法)
総蛋白	Biuret 法
アルブミン	BCG 法
A/G 比	総蛋白およびアルブミンより算出
カルシウム	OCPC 法
無機リン	酵素法 (PNP-XOD-POD 法)
ナトリウム	イオン選択電極法
カリウム	イオン選択電極法
クロール	イオン選択電極法

測定機器：TBA-200FR (株式会社東芝)

尿検査

投与期間最終週 (第 27 日) に各群雌雄 5 例 (各群動物番号の小さい順に 5 例) を個別採尿ケージに移し、新鮮尿を採取して以下に示す試験紙法による項目を測定し、また尿沈渣検査を実施した。さらに、第 27~28 日に約 21 時間蓄積尿を採取してその他の項目を測定した。なお、5.0 mg/kg 群の雌 1 例 (動物番号：50401) が蓄積尿の採取時に死亡したため、蓄積尿に関するデータは得られなかった。新鮮尿採取時間は飼料および飲用水を与えなかった。新鮮尿は投与前に採取し、必要量が得られ次第密閉した。

回復期間最終週 (第 41~42 日) に、生存していた対照群の雄 5 例および 5.0 mg/kg 群の雄 2 例 (動物番号：10407, 10408) にも同様の検査を実施した。なお、雌については 5.0 mg/kg 群に生存例が存在しなかったため、対照群を含めて検査を実施しなかった。

項目	方法	測定機器
pH	試験紙法 (マルチスティックス, バイエル メディカル株式会社)	(a)
蛋白	試験紙法 (マルチスティックス, バイエル メディカル株式会社)	(a)
グルコース	試験紙法 (マルチスティックス, バイエル メディカル株式会社)	(a)
ケトン体	試験紙法 (マルチスティックス, バイエル メディカル株式会社)	(a)
ビリルビン	試験紙法 (マルチスティックス, バイエル メディカル株式会社)	(a)
潜血	試験紙法 (マルチスティックス, バイエル メディカル株式会社)	(a)
ウロビリノーゲン	試験紙法 (マルチスティックス, バイエル メディカル株式会社)	(a)
尿量	メスシリンダーで測定	-
比重	屈折法	(b)
ナトリウム	イオン選択電極法	(c)
カリウム	イオン選択電極法	(c)
クロール	電量滴定法	(c)
尿沈渣	Sternheimer-Malbin 染色した標本を鏡検	-

測定機器：

(a), クリニテック 100 (バイエル メディカル株式会社)

(b), ユリコン-JE (株式会社アタゴ)

(c), PVA- α III (株式会社エイアンドティー)

器官重量

全生存動物の下記の器官重量を電子天秤 (AW-120, 株式会社島津製作所) を用いて測定した。両側性の器官はまとめて測定した。また、解剖日の体重に基づいて相対重量 (対体重比) を算出した。

肝臓, 腎臓, 副腎, 精巣, 精巣上体, 卵巣, 胸腺, 脾臓, 脳, 心臓

病理解剖検査

死亡動物については死亡発見後, 速やかに剖検した。計画解剖動物については採血後, 腹大動脈を切断・放血し, 安楽死させた後, 剖検した。

病理組織学的検査

全動物の下記の器官・組織を採取し, 10 vol%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定し, 保存した。ただし, 精巣および精巣上体はブアン液 (Bouin 液) で, 死亡動物以外の眼球とハーダー腺はダビドソン液 (Davidson 液) で固定後, 10 vol%中性リン酸緩衝ホルマリン液で保存した。なお, 脳の固定は常温で 10 vol%中性リン酸緩衝ホルマリン液中にて約 24 時間とした。

脳（大脳，小脳および橋を含む部位），脊髄，胃，十二指腸，空腸，回腸（パイエル板を含む），盲腸，結腸，直腸，肝臓，腎臓，副腎，脾臓，心臓，胸部大動脈，胸腺，眼球およびハーダー腺，下垂体，甲状腺（上皮小体含む），気管および肺，精巣，卵巣，精巣上部，前立腺，子宮，膣，膀胱，下顎リンパ節，腸間膜リンパ節，坐骨神経（大腿筋に付けて採材），骨髓（大腿骨），腸腰筋（腰腸筋），その他，肉眼的異常部位

投与期間終了後解剖動物の対照群および 5.0 mg/kg 群，ならびに投与または回復期間中に死亡した雄 2 例（動物番号：10404，10409），雌 6 例（動物番号：50401，50402，50403，50404，50407，50408）の上記の器官・組織および全試験動物の肉眼的異常部位について，常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し，鏡検した。

その結果，被験物質に起因すると思われる変化または被検物質との関連が疑われる変化が雌雄の肝臓，脾臓，胸腺，下顎リンパ節，腸間膜リンパ節，大腿骨骨髓，腎臓，肺，腺胃，十二指腸，副腎，脊髄（脊髄神経節），大脳と雄の精巣，精巣上部に認められたため，投与期間終了後解剖動物の 0.3 および 1.2 mg/kg 群と回復期間終了後解剖動物の雌雄全例の当該器官・組織について検査を実施した。

投与期間終了後解剖動物の対照群および 5.0 mg/kg 群の脳について，アポトーシス検出のための TUNEL 法，髄鞘を確認するための Kluver-Barrera 染色，神経膠線維を確認するための Holzer 染色，軸索・神経線維を確認するための Bodian's 染色を実施した。肝臓のグリソン鞘にみられた肉芽腫の立体構築を把握するため，肉芽腫の形成が最も顕著な 1 例（動物番号：10402）の肝臓を再度切り出し，間断連続標本を作製した。また，脊髄神経節神経細胞内に沈着物が認められた 3 例のうち 1 例（動物番号：10405）について，頸部，胸前部，腰部の各脊髄神経節を切り出し，ヘマトキシリン・エオジン染色を施すとともに，頸部と腰部の脊髄神経節に Bodian's 染色を施した。

結果および結論

一般状態では，5.0 mg/kg 群の雄 2/10 例（この他に 1 例が事故死），雌 6/10 例が死亡した。また，5.0 mg/kg 群の雌雄に着色尿（黄色），振戦，易刺激性，流涎，活動性の低下，鼻周囲の汚れ，下腹部の汚れ，歩行異常，眼瞼下垂が認められた。

行動検査では，5.0 mg/kg 群の雌雄に振戦，反応性低下または亢進，覚醒度亢進，歩行異常などの神経異常を示唆する所見がみられ，また握力および自発運動量の減少が認められた。

体重および摂餌量では，5.0 mg/kg 群の雌雄に低値が認められた。

血液学的検査では，1.2 mg/kg 群の雌および 5.0 mg/kg 群の雌雄にヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の低値が認められた。また，5.0 mg/kg 群の雄に血小板数の高値が認められた。

さらに，5.0 mg/kg 群の雄に網赤血球数の低値および PT の延長傾向がみられ，同群雌雄に APTT の延長傾向および白血球分画異常が認められた。

血清生化学的検査では，5.0 mg/kg 群の雌雄に ASAT (GOT)，ALAT (GPT)， γ GT，ALP，総ビリルビン，尿素窒素およびクロールの高値または高値傾向がみられ，A/G 比およびナトリウムの低値または低値傾向が認められた。

尿検査では、5.0 mg/kg 群の雌雄にビリルビンおよびウロビリノーゲンの高値または高値傾向が認められた。ビリルビンの高値については 1.2 mg/kg 群の雄にも認められた。

器官重量では、5.0 mg/kg 群の雌雄に肝臓重量の高値、胸腺重量の低値が認められた。

剖検では、5.0 mg/kg 群の雌雄に脾臓および胸腺の小型化、腺胃の赤色・褐色斑が認められた。

病理組織学的検査では、5.0 mg/kg 群の雌雄に肝臓の胆管増生、グリソン鞘における炎症性細胞浸潤、肝細胞の限局性壊死、グリソン鞘内の肉芽腫、脾臓の白脾髄の萎縮、胸腺の急性萎縮、大腿骨骨髓の造血細胞減少および腺胃のびらんなどが認められた。なお、一般状態観察で振戦、易刺激性、流涎など神経系への作用がみられたが、脳のヘマトキシリン・エオジン染色標本では器質的变化は認められなかった。また、脳について TUNEL 法、Kluver-Barrera 染色、Holzer 染色および Bodian's 染色の特殊染色を施し、より詳細に器質的变化を観察したが、何ら異常変化は認められなかった。

上述した変化のうち、雄に発現した変化については回復期間終了時には回復または回復傾向を示し、回復性は良好であった。しかし、雌については死亡例が多発したため、発現した変化の回復性を確認することはできなかった。

以上の結果より、被験物質投与に起因すると考えられる変化が雌雄とも 1.2 mg/kg 以上の群に認められたことから、本試験条件下における DPAA の無影響量 (NOEL) は雌雄とも 0.3 mg/kg/day と判断した。

5.1.2 DPAA ラット 91 日反復経口毒性試験

コード番号： A-2

試験番号： B041213

DPAA を 0, 0.1, 0.3, 0.8 および 2.0 mg/kg の用量 (28 日反復経口毒性試験の結果から設定) で雌雄の SD 系ラット [Crj:CD(SD) IGS, SPF] に 91 日間反復経口投与し、現れる生体の機能および形態の変化を観察し、その毒性と回復性を評価した。

群構成

群名	動物数			
	投与期間終了後解剖		回復期間終了後解剖	
	雄	雌	雄	雌
対照	10	10	5	5
0.1 mg/kg	10	10	-	-
0.3 mg/kg	10	10	-	-
0.8 mg/kg	10	10	-	-
2.0 mg/kg	10	10	5	5

観察・測定項目

一般状態

投与期間は1日2回（投与前，投与後約30分）観察した。その他の期間は1日1回午前中に観察した。

詳細な症状観察

投与開始前に1回，投与期間中に毎週1回（午後），下記の項目について検査を行った。飼育ケージ内で1分間，ハンドリング時およびオープンフィールド内で2分間の観察を行った。検査時には，動物番号とは別の識別番号を記載したラベルを付けて，用量および動物番号を観察者に判らないようにした。なお，投与期間中の検査で被験物質投与による影響が疑われたため，回復期間中も毎週1回（午後）検査した。

- (1) 飼育ケージ内での観察項目
振戦，間代性痙攣，強直性痙攣，呼吸
- (2) ハンドリング時の観察項目
ケージからの取り出し易さ，ハンドリングに対する反応，攻撃性，皮膚（外傷，皮膚の色調），被毛（被毛の汚れ），眼（眼球突出，眼瞼閉鎖状態），粘膜（結膜の色調），分泌物，流涙，流涎，立毛，瞳孔径
- (3) オープンフィールド内での観察項目
立ち上がり，覚醒度，排尿，排便，体位・姿勢，呼吸，運動協調性，歩行の異常，振戦，間代性痙攣，強直性痙攣，常同行動，異常行動

機能検査

第12週に1回（午後）下記の項目について検査を行った。刺激に対する反応性を観察した後，握力測定を行った。握力測定には，デジタルフォースゲージ（DPS-5，株式会社イマダ）を使用した。自発運動量の測定は，自発運動量測定装置（SUPERMEX，室町機械株式会社）を用い1時間行った。なお，運動量測定時にはポリカーボネート製ケージ（床敷含む）を使用した。投与後の観察終了後，動物をポリカーボネート製ケージに移し，ケージ馴化を行った。その後，測定直前に新たなポリカーボネート製ケージに動物を移して測定した。また，測定期間中は餌および飲用水を与えなかった。自発運動量の測定以外の検査時には，動物番号とは別の識別番号を記載したラベルを付けて，用量および動物番号を観察者に判らないようにした。なお，第12週での検査で被験物質投与の影響が疑われる変化は認められなかったことから，回復期間には検査を行わなかった。

- (1) 刺激に対する反応性
接近反応，接触反応，聴覚反応，テールピンチ反応，空中正向反射
- (2) 握力測定
前肢握力，後肢握力
- (3) 自発運動量測定
測定開始から10分毎に集計するとともに1時間の総量を求めた。

体重

全例について、投与期間の第 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85 および 91 日、回復期間の第 92, 99, 106, 113 および 119 日に電子天秤 (BX3200H, EB-3200S : 株式会社島津製作所) を用いて測定した。また、各測定日間の体重増加量を算出した。

摂餌量

個別に飼料の風袋込み重量を電子天秤電子天秤 (BX3200H, EB-3200S : 株式会社島津製作所) を用いて測定し、投与期間中の第 1~5, 8~15, 16~22, 22~29, 29~36, 36~43, 44~50, 50~57, 57~64, 65~71, 71~78, 78~85 および 86~89 日、回復期間中の第 92~99, 99~106, 106~113 および 116~119 日における 1 日平均摂餌量を算出した。また、摂餌量は測定期間の終了日で表示した。

血液学的検査

投与および回復期間終了後の計画解剖日 (第 92 および 120 日) に全対象動物を前日の夕方より絶食し、ペントバルビタールナトリウム (ネンブタール, 大日本製薬株式会社) を腹腔内投与して麻酔し、後大静脈より採血した。採取した血液を用いて次に示す項目を測定した。プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間の測定には、凝固阻止剤として 3.2 w/v%クエン酸三ナトリウム水溶液を使用し、遠心分離 (12000 rpm, 約 12000 g, 3 分間, 約 4°C) して得られる血漿を用いた。その他の項目の測定には、凝固阻止剤 EDTA-2K で処理した血液を用いた。

項目	方法
(1) 赤血球数 (RBC)	球状化処理二次元レーザーFCM 法
(2) ヘモグロビン濃度 (Hb)	シアンメトヘモグロビン法
(3) ヘマトクリット値 (Ht)	球状化処理二次元レーザーFCM 法
(4) 平均赤血球容積 (MCV)	(1), (3)より算出
(5) 平均赤血球血色素量 (MCH)	(1), (2)より算出
(6) 平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	(2), (3)より算出
(7) 網赤血球数 (Ret)	RNA 染色によるレーザーFCM 法
(8) 血小板数 (PLT)	球状化処理二次元レーザーFCM 法
(9) プロトロンビン時間 (PT)	光散乱検出方式
(10) 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	光散乱検出方式
(11) 白血球数 (WBC)	酸性界面活性剤によるレーザーFCM 法
(12) 白血球百分率 (WBC Diff.)	ペルオキシダーゼ染色による FCM 法および酸性界面活性剤によるレーザーFCM 法

測定機器：

(1)-(3), (7), (8), (11), (12) : ADVIA120 (バイエル メディカル株式会社)
(9), (10) : CA-510 (シスメックス株式会社)

血清生化学的検査

計画解剖時に採取した血液の一部を室温で30分間以上静置後、遠心分離(3000 rpm, 約2050 g以上, 10分間, 約4°C)し、得られた血清を用いて下記の項目を測定した。瀕死期解剖動物も可能な限り測定した。

項目	方法
(1) ASAT (GOT)	UV-rate法 (JSCC改良法)
(2) ALAT (GPT)	UV-rate法 (JSCC改良法)
(3) γ GT	γ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法 (SSCC改良法)
(4) ALP	p-ニトロフェニルリン酸基質法 (JSCC改良法)
(5) 総ビリルビン	酵素法 (BOD法)
(6) 尿素窒素	酵素-UV法 (Urease-LEDH法)
(7) クレアチニン	酵素法 (Creatininase-POD法)
(8) グルコース	酵素法 (HK-G6PDH法)
(9) 総コレステロール	酵素法 (CO-HDAOS法)
(10) トリグリセライド	酵素法 (GPO-HDAOS法, グリセリン消去法)
(11) 総蛋白	Biuret法
(12) アルブミン	BCG法
(13) A/G比	(11) および (12) より算出
(14) カルシウム	OCPC法
(15) 無機リン	酵素法 (PNP-XOD-POD法)
(16) ナトリウム (Na)	イオン選択電極法
(17) カリウム (K)	イオン選択電極法
(18) クロール (Cl)	イオン選択電極法

測定機器：TBA-200FR (株式会社東芝)

尿検査

投与および回復期間最終週(第13および17週)に、各群雌雄5匹(各群動物番号の小さい順に5例)の新鮮尿を採取して、下記の試験紙法の項目および尿沈渣を検査した。また、約21時間蓄積尿を採取して、尿量、比重、ナトリウム、カリウムおよびクロールを検査した。ただし、0.1および2.0 mg/kg群の雌各1例(動物番号:50202, 50504)の蓄積尿には、飲用

水が混入したため、これらの動物の尿量および比重については、参考値とした。

項目	方法
(1) PH	試験紙法 (マルティスティックス, バイエル メディカル株式会社)
(2) 蛋白	試験紙法 (マルティスティックス, バイエル メディカル株式会社)
(3) グルコース	試験紙法 (マルティスティックス, バイエル メディカル株式会社)
(4) ケトン体	試験紙法 (マルティスティックス, バイエル メディカル株式会社)
(5) ビリルビン	試験紙法 (マルティスティックス, バイエル メディカル株式会社)
(6) 潜血	試験紙法 (マルティスティックス, バイエル メディカル株式会社)
(7) ウロビリノーゲン	試験紙法 (マルティスティックス, バイエル メディカル株式会社)
(8) 尿量	メスシリンダーで測定
(9) 比重	屈折法
(10) ナトリウム	イオン選択電極法
(11) カリウム	イオン選択電極法
(12) クロール	電量滴定法
(13) 尿沈渣	Sternheimer-Malbin 染色した標本を鏡検

測定機器

(1)~(7) : クリニテック 100 (バイエル メディカル株式会社)

(9) : ユリコン-JE (株式会社アタゴ)

(10)~(12) : PVA- α III (株式会社エイアンドティー)

眼科学的検査

投与開始前 (馴化期間中, 群分け前) には全例, 投与期間最終週 (第 13 週) には対照群および 2.0 mg/kg 群の全例について, 照明を暗くした状態で, 直像鏡を用いて対光反射を検査し, スリットランプ (SL-14, 興和株式会社) を用いて前眼部および中間透光体を, 双眼倒像鏡 (オメガ 200, ハイネ社) を用いて眼底を検査した. 前眼部, 中間透光体および眼底検査は散瞳剤 (ミドリン P, 参天製薬株式会社) 点眼後に行った. 検査の結果, 被験物質投与の影響が認められたことから, 全例の検査を行うとともに回復期間最終週 (第 17 週) にも, 全例について同様の検査を行った.

器官重量

全例について, 下記の器官重量を電子天秤 (AW120 : 株式会社島津製作所, AG204 : メトラー・トレド株式会社) を用いて測定した (両側性の器官はまとめて測定した). 解剖日に体重を測定し, その体重に基づいて相対重量 (対体重比) を算出した.

肝臓, 腎臓, 副腎, 精巣, 精巣上体, 子宮, 卵巣, 胸腺, 脾臓, 脳, 心臓

病理解剖検査

全例について、採血後、腹大動脈を切断・放血し、安楽死させた後、剖検した。

病理組織学的検査

全例の下記器官・組織を採取し、10 vol %中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。ただし、精巣および精巣上体はブアン液で、眼球、ハーダー腺および視神経はダビドソン液でそれぞれ固定後、10 vol %中性リン酸緩衝ホルマリン液で保存した。なお、投与および回復期間終了後の器官重量測定および病理解剖検査後に、各群雌雄5例（動物番号の小さい順に5例）の肝臓については、雄の尾状葉と外側右葉以外の全ての部位、雌の外側左葉および中間葉の一部を採取し、それ以外の部位を当研究所で実施する「ジフェニルアルシン酸をラットに91日間反復経口投与した後の肝薬物代謝酵素に対する影響（試験番号：B041592）」に転用した。

肉眼的異常部位、脳（4断面）、脊髄（頸部、胸部中央、腰部）、下垂体、甲状腺および上皮小体、胸腺、食道、唾液腺（下顎・舌下）、胃、十二指腸、空腸、回腸（パイエル板含む）、盲腸、結腸、直腸、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、脾臓、心臓、気管、肺、胸部大動脈、精巣、精巣上体、前立腺腹葉、精嚢、卵巣、子宮、膣、乳腺（雌のみ）、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、坐骨神経、大腿筋、胸骨および骨髄、大腿骨および骨髄、皮膚、眼球およびハーダー腺および視神経

投与期間終了後解剖動物の対照群と2.0 mg/kg群の雌雄全例の上記器官・組織、ならびに対照群を含む全動物の肉眼的異常部位について、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、鏡検した。その結果、被験物質投与の影響が疑われる変化が肝臓、総胆管、脾臓、腎臓、眼球、胸腺に認められたため、全例の当該器官・組織を検査した。

リンパ球サブセットの測定

投与期間終了後の計画解剖日（第92日）に各群雌雄5匹（各群動物番号の小さい順に5例）について測定した。測定には、計画解剖時に採取した血液の0.5 mLをヘパリン（ナトリウム塩）で抗凝固処理し使用した。解析用プロトコルの確認には、無処置動物（同性の余剰動物を各計画解剖日に1例）より計画解剖動物と同様に採取した血液を用いた。

混在する赤血球をACK Lysing Solution（0.16 mol/L NH₄Cl, 10 mmol/L KHCO₃, 0.1 mmol/L EDTA-2Na, pH 7.2）で溶血した後、自動血球計数装置（Sysmex F-800, シスメックス株式会社）を用いて白血球数の測定を行った。

リンパ球サブセットの測定は、白血球数の測定後、蛍光標識抗体による染色を行い、T細胞（CD3）、B細胞（CD45RA）、NK細胞（NKR-P1A）、ヘルパーT細胞（CD4）およびキラーT細胞（CD8a）の表面マーカーの比率について、フローサイトメーター（EPICS XL-MCL, ベックマン・コールター株式会社）を用いて測定した。結果は、各細胞分画のリンパ球中の比率ならびに血液1 mLあたりの絶対数で表した。

染色抗体は以下のものを用いた。

- FITC 標識抗ラット CD3 抗体 (G4.18 ; BD Pharmingen)
- PE 標識抗ラット CD45RA 抗体 (OX-33 ; BD Pharmingen)
- PE 標識抗ラット NKR-P1A 抗体 (10/78 ; BD Pharmingen)
- FITC 標識抗ラット CD4 抗体 (OX-38 ; BD Pharmingen)
- PE 標識抗ラット CD8a 抗体 (OX-8 ; BD Pharmingen)

コントロール抗体は以下のものを用いた。

- FITC 標識マウス IgG2a, κ 抗体 (BD Pharmingen)
- FITC 標識マウス IgG3, κ 抗体 (BD Pharmingen)
- PE 標識マウス IgG1, κ 抗体 (BD Pharmingen)

結果および結論

投与および回復期間を通じて、死亡動物は認められなかった。

一般状態において、2.0 mg/kg 群の雄に振戦、強直性痙攣、着色尿（黄色）、易刺激性、眼球の混濁および膨大が認められた。また、強直性痙攣後には、一過性の自発運動の低下が認められた。

行動検査において、詳細な症状観察では、2.0 mg/kg 群の雄にケージからの取り出しおよびハンドリング時の反応性の亢進、覚醒度の亢進、振戦が認められた。機能検査（刺激に対する反応性、握力および自発運動量測定）では、被験物質投与に起因した変化は認められなかった。

2.0 mg/kg 群の雄に体重、体重増加量および摂餌量の低値が認められた。

血液学的検査において、2.0 mg/kg 群の雌雄に赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の低値がみられ、2.0 mg/kg 群の雄に血小板数および網赤血球数の高値が認められた。血清生化学的検査において、2.0 mg/kg 群の雌雄に総コレステロールおよび ALP の高値、2.0 mg/kg 群の雄に γ GT、総ビリルビン、総蛋白およびカルシウムの高値と A/G 比の低値、2.0 mg/kg 群の雌に ASAT の高値が認められた。

尿検査において、2.0 mg/kg 群の雄にビリルビンおよびウロビリノーゲンの高値が認められた。眼科学的検査において、2.0 mg/kg 群の雄に角膜血管新生、角膜水腫あるいは角膜変性を伴う角膜混濁が認められた。

器官重量において、2.0 mg/kg 群の雌雄に肝臓の絶対・相対重量の高値がみられ、2.0 mg/kg 群の雄に心臓および脾臓の絶対・相対重量の高値および胸腺の絶対重量の低値が認められた。病理解剖検査において、2.0 mg/kg 群の雌雄に肝臓の腫大がみられ、2.0 mg/kg 群の雄に肝臓の表面顆粒状化および白色斑、総胆管の拡張、胸腺の小型化および眼球の角膜混濁が認められた。

病理組織学的検査において、肝臓では 2.0 mg/kg 群の雌雄に胆管増生およびグリソン鞘の炎症性細胞浸潤、2.0 mg/kg 群の雄にグリソン鞘内の肉芽腫、小葉中心性の肝細胞肥大、小葉辺縁性の肝細胞脂肪化および肝細胞の限局性壊死、2.0 mg/kg 群の雌にグリソン鞘の線維化が認め

られた。総胆管では、2.0 mg/kg 群の雌雄に増殖性炎がみられ、2.0 mg/kg 群の雄に粘膜上皮の空胞化が認められた。また、2.0 mg/kg 群の雄に脾臓の赤血球性髄外造血の発現の増加、腎臓の近位尿細管上皮における好酸性小滴、眼球の角膜の炎症性細胞浸潤および角膜水腫、胸腺の萎縮が認められた。なお、一般状態観察で振戦、強直性痙攣、易刺激性など神経系への作用がみられたが、脳のヘマトキシリン・エオジン染色標本では器質的変化は認められなかった。

リンパ球サブセット測定では、被験物質投与に起因した変化は認められなかった。

本試験で認められたほとんどの変化は、投与の休止により、消失、変化の程度あるいは発現の減少がみられ、回復性が認められた。また、胸腺重量の低値および剖検における総胆管の拡張は、回復期間終了後にも投与期間終了後と同様に認められたが、これらの器官にみられた病理組織学的変化は、回復期間終了後には、消失あるいは軽減していることから、胸腺および総胆管としての変化自体には、回復性が認められた。

以上の結果から、本試験条件下における DPAA の無影響量 (NOEL) は雌雄ともに 0.8 mg/kg/day と判断した。

5.1.3 DPAA 新生児ラット 28 日反復経口毒性試験

コード番号： A-3

試験番号： B041296

DPAA を 0, 0.1, 0.3 および 1.0 mg/kg の用量 (用量設定試験の結果から設定) で雌雄の SD 系新生児ラット [Crj:CD(SD) IGS, SPF] に生後 4 日から 28 日間反復経口投与し、現れる生体の機能および形態の変化を観察し、その毒性を評価した。

観察・測定項目

群名	母動物		児動物	
	雌	雄	雌	雄
対照	3	4	4	4
		4	4	4
		4	4	4
0.1 mg/kg	3	4	4	4
		4	4	4
		4	4	4
0.3 mg/kg	3	4	4	4
		4	4	4
		4	4	4
1.0 mg/kg	3	4	4	4
		4	4	4
		4	4	4

観察・測定項目

一般状態

児動物は投与期間中、1日2回（投与前、投与後約30分）観察した。また、母動物は投与期間中、1日1回観察した。その他の期間は1日1回観察した。

体重

児動物の体重を第1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25 および 28 日に電子天秤（UX4200H, 株式会社島津製作所）を用いて測定した。また、母動物の体重を第1, 8, 15 日および 18 日（離乳日）に同様に測定した。

摂餌量

児動物の離乳後の摂餌量を第18～22 および 22～28 日に測定し、また母動物の摂餌量を第1～8, 8～15 および 15～18 日に測定した。ケージごとに風袋込み重量を電子天秤（UX4200H, 株式会社島津製作所）を用いて測定し、各測定日間の児動物および母動物1匹あたりの1日平均摂餌量を算出した。なお、摂餌量は測定期間の終了日で表示した。

血液学的検査

児動物は、投与期間終了後の計画解剖日（第29日）に全対象動物を前日の夕方より絶食し、ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール, 大日本製薬株式会社）を腹腔内投与して麻酔し、後大静脈より採血した。採取した血液を用いて以下に示す項目を測定した。プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間の測定には、凝固阻止剤として3.2 w/v%クエン酸三ナトリウム水溶液を使用し、遠心分離（12000 rpm, 12100 g, 3分間, 約4°C）して得られた血漿を用いた。その他の項目の測定には、凝固阻止剤EDTA-2Kで処理した血液を用いた。

項目	方法
(1) 赤血球数 (RBC)	球状化処理二次元レーザーFCM法
(2) ヘモグロビン濃度 (Hb)	シアンメトヘモグロビン法
(3) ヘマトクリット値 (Ht)	球状化処理二次元レーザーFCM法
(4) 平均赤血球容積 (MCV)	(1) および (3) より算出
(5) 平均赤血球血色素量 (MCH)	(1) および (2) より算出
(6) 平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	(2) および (3) より算出
(7) 網赤血球数 (Ret)	RNA染色によるレーザーFCM法
(8) 血小板数 (PLT)	球状化処理二次元レーザーFCM法
(9) プロトロンビン時間 (PT)	光散乱検出方式
(10) 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	光散乱検出方式

(11) 白血球数 (WBC)	酸性界面活性剤によるレーザーFCM 法
(12) 白血球百分率 (WBC Diff.)	ペルオキシダーゼ染色による FCM 法および酸性界面活性剤によるレーザーFCM 法

測定機器：

(1)～(3), (7), (8), (11), (12)： ADVIA120 (パイエル メディカル株式会社)
 (9), (10)： CA-510 (シスメックス株式会社)

血清生化学的検査

児動物について、計画解剖時に採取した血液の一部を室温で 30 分間以上静置後、遠心分離 (3000 rpm, 2050 g, 10 分間, 約 4°C) し、得られた血清を用いて以下に示す項目を測定した。

項目	方法
(1) ASAT (GOT)	UV-rate法 (JSCC改良法)
(2) ALAT (GPT)	UV-rate法 (JSCC改良法)
(3) γ GT	γ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法 (SSCC改良法)
(4) ALP	p-ニトロフェニルリン酸基質法 (JSCC改良法)
(5) 総ビリルビン	酵素法 (BOD法)
(6) 尿素窒素	酵素-UV法 (Urease-LEDH法)
(7) クレアチニン	酵素法 (Creatininase-POD法)
(8) グルコース	酵素法 (HK-G6PDH法)
(9) 総コレステロール	酵素法 (CO-HDAOS法)
(10) トリグリセライド	酵素法 (GPO-HDAOS法, グリセリン消去法)
(11) 総蛋白	Biuret法
(12) アルブミン	BCG法
(13) A/G比	(11) および (12) より算出
(14) カルシウム	OCPC法
(15) 無機リン	酵素法 (PNP-XOD-POD法)
(16) ナトリウム (Na)	イオン選択電極法
(17) カリウム (K)	イオン選択電極法
(18) クロール (Cl)	イオン選択電極法

測定機器：TBA-200FR (株式会社東芝)

器官重量

児動物の下記の器官重量を電子天秤 (AW-120, 株式会社島津製作所) を用いて測定した。両

側性の器官はまとめて測定した。また、解剖日に体重を測定し、その体重に基づいて相対重量（対体重比）を算出した。

肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、子宮、卵巣、胸腺、脾臓、脳、心臓

病理解剖検査

児動物の計画解剖動物は採血後、腹大動脈を切断・放血し、安楽死させた後、剖検した。なお、母動物については離乳時に同様に剖検し、全例に異常がないことを確認した。

病理組織学的検査

児動物の下記器官・組織を採取し、10 vol %中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。ただし、精巣および精巣上体はブアン液で、眼球、ハーダー腺および視神経はダビドソン液でそれぞれ固定後、10 vol %中性リン酸緩衝ホルマリン液で保存した。

肉眼的異常部位、脳（4 断面）、脊髄（頸部、胸部中央、腰部）、下垂体、甲状腺および上皮小体、胸腺、食道、唾液腺（下顎・舌下）、胃、十二指腸、空腸、回腸（パイエル板含む）、盲腸、結腸、直腸、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、脾臓、心臓、気管、肺、胸部大動脈、精巣、精巣上体、前立腺腹葉、精嚢、卵巣、子宮、膣、乳腺（雌のみ）、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、坐骨神経、大腿筋、胸骨および骨髄、大腿骨および骨髄、皮膚、眼球およびハーダー腺、視神経

対照群と 1.0 mg/kg 群の雌雄全例の上記器官・組織、ならびに対照群を含む全動物の肉眼的異常部位について、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、鏡検した。検査の結果、1.0 mg/kg 群で被験物質に起因すると考えられる変化が雌雄の肝臓に認められたため、0.1 および 0.3 mg/kg 群の雌雄の肝臓について検査を実施した。

結果および結論

母動物の哺育状況を確認するため、児動物の体重および摂餌量データについて各群の母動物ごとに一元配置分散分析を実施した。その結果、ほとんどのデータで同一群内の母動物間に有意差があることが確認された。しかし、有意差は群に偏ることなく、いずれの群でも認められていることから、児動物の体重および摂餌量データを用いた毒性評価は十分に可能であるものと判断した。

死亡例は認められず、また一般状態および病理解剖所見には何ら異常は認められなかった。

体重では、1.0 mg/kg 群の雌で第 22 日から投与期間終了時まで有意な低値が認められた。

血液学的検査では、0.3 および 1.0 mg/kg 群の雄に赤血球数の低値がみられ、また 1.0 mg/kg 群の雄に単球比の低値が認められた。さらに、1.0 mg/kg 群の雌に血小板数の高値および PT の延長が認められた。

血清生化学的検査では、1.0 mg/kg 群の雄にトリグリセライドの高値および A/G 比の低値が認

められた。

器官重量では、1.0 mg/kg 群の雌に肝臓の相対重量の高値が認められた。

病理組織学的検査では、1.0 mg/kg 群の雌雄全例に胆管増生がみられ、1.0 mg/kg 群の雄 9/12 例、雌 7/12 例にグリソン鞘における炎症性細胞浸潤が認められた。なお、造血系器官である骨髄、脾臓には異常変化はみられず、また脳のヘマトキシリン・エオジン染色標本では器質的变化は認められなかった。

以上の結果より、被験物質投与に起因すると考えられる変化が雄で 0.3 mg/kg 以上の群に、雌では 1.0 mg/kg 群に認められたことから、本試験条件下における DPAA の無影響量 (NOEL) は雄が 0.1 mg/kg/day、雌が 0.3 mg/kg/day と判断した。

5.1.4 DPAA ラット 7 日反復経皮毒性試験

コード番号： A-4

試験番号： B040272

DPAA を 0 および 1000 mg/kg の用量で雄の SD 系ラット [Crj:CD(SD) IGS, SPF] に各群 5 匹ずつ 7 日間反復経皮投与し、現れる生体の機能および形態の変化を観察し、その毒性を評価した。

結果および結論

投与期間を通じて、死亡動物は認められなかった。

一般状態において、着色尿（黄色）が 1000 mg/kg 群に認められた。

体重では、1000 mg/kg 群に低値傾向が認められた。

器官重量において、1000 mg/kg 群に肝臓、脾臓、腎臓および副腎の絶対・相対重量の高値が認められた。

病理解剖検査において、1000 mg/kg 群に肝臓の腫大 (3/5 例)、精巣黄色化 (2/5 例)、副腎の腫大 (2/5 例)、脾臓の暗赤色化・腫大 (1/5 例)、肝臓の褪色・赤色斑 (各 1/5 例)、腎臓の腫大 (1/5 例) が認められた。

以上の結果より、DPAA 投与に起因すると考えられる種々の変化が認められた。したがって、本試験条件下では DPAA は経皮吸収される可能性があるものと判断した。

5.1.5 PMAA ラット 28 日反復経口毒性試験

コード番号： A-5

試験番号： B050132

PMAA を 0, 0.12, 0.3, 1.2 および 5.0 mg/kg の用量で雌雄の SD 系ラット [Crj:CD(SD) IGS, SPF] に 28 日間反復経口投与し、現れる生体の機能および形態の変化を観察し、その毒性と

回復性を評価した。

群構成

群名	動物数			
	投与期間終了後解剖		回復期間終了後解剖	
	雄	雌	雄	雌
対照	5	5	5	5
0.12 mg/kg	5	5	-	-
0.3 mg/kg	5	5	-	-
1.2 mg/kg	5	5	-	-
5.0 mg/kg	5	5	5	5

観察・測定項目

一般状態

投与期間は1日2回（投与前，投与後約30分）観察した。その他の期間は1日1回午前中に観察した。

詳細な症状観察

投与開始前に1回，投与期間中に毎週1回（午後），下記の項目について検査を行った。飼育ケージ内で1分間，ハンドリング時およびオープンフィールド内で2分間の観察を行った。検査時には，動物番号とは別の検査番号を記載したラベルを付けて，用量および動物番号を観察者に判らないようにした。なお，投与期間中の検査で被験物質投与による影響はみられなかったことから，回復期間には検査を行わなかった。

- (1) 飼育ケージ内での観察
振戦，間代性痙攣，強直性痙攣，呼吸
- (2) ハンドリング時の観察
ケージからの取り出し易さ，ハンドリングに対する反応，攻撃性，皮膚（外傷，皮膚の色調），被毛（被毛の汚れ），眼（眼球突出，眼瞼閉鎖状態），粘膜（結膜の色調），分泌物，流涙，流涎，立毛，瞳孔径
- (3) オープンフィールド内での観察
立ち上がり，覚醒度，排尿，排便，体位・姿勢，呼吸，運動協調性，歩行の異常，振戦，間代性痙攣，強直性痙攣，常同行動，異常行動

機能検査

第4週に1回（午後），下記の項目について検査を行った。刺激に対する反応性を観察した後，

握力測定を行った。握力測定には、デジタルフォースゲージ（株式会社イマダ）を使用した。自発運動量の測定は、自発運動量測定装置（SUPERMEX, 室町機械株式会社）を用い1時間行った。なお、運動量測定時にはポリカーボネート製ケージ（床敷含む）を使用した。投与後の観察終了後、動物をポリカーボネート製ケージに移し、ケージ馴化を行った。その後、測定直前に新たなポリカーボネート製ケージに動物を移して測定した。また、測定期間中は餌および飲用水を与えなかった。自発運動量の測定以外の検査時には、動物番号とは別の検査番号を記載したラベルを付けて、用量および動物番号を観察者に判らないようにした。なお、第4週での検査で被験物質投与の影響による変化は認められなかったことから、回復期間には検査を行わなかった。

- (1) 刺激に対する反応性
接近反応, 接触反応, 聴覚反応, テールピンチ反応, 空中正向反射
- (2) 握力測定
前肢握力, 後肢握力
- (3) 自発運動量測定
測定開始から10分毎に集計するとともに1時間の総量を求めた。

体重

全生存例について、投与期間の第1, 8, 15, 22 および 28 日, 回復期間の第 29, 36 および 42 日に電子天秤（BX3200H：株式会社島津製作所）を用いて測定した。

摂餌量

個別に飼料の風袋込み重量を電子天秤（BX3200H：株式会社島津製作所）を用いて測定し、投与期間中の第1～8, 8～15, 15～22, 24～28日, 回復期間中の第29～36 および 38～42日における1日平均摂餌量を算出した。また、摂餌量は測定期間の終了日で表示した。

血液学的検査

投与および回復期間終了後の計画解剖日（第29 および 43 日）に全対象動物を前日の夕方より絶食し、ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール, 大日本製薬株式会社）を腹腔内投与して麻酔し、後大静脈より採血した。採取した血液を用いて次に示す項目を測定した。プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間の測定には、凝固阻止剤として3.2 w/v%クエン酸三ナトリウム水溶液を使用し、遠心分離（12000 rpm, 約 12000 g, 3 分間, 4°C）して得られた血漿を用いた。その他の項目の測定には、凝固阻止剤 EDTA-2K で処理した血液を用いた。

項目	方法
(1) 赤血球数 (RBC)	球状化处理二次元レーザーFCM 法
(2) ヘモグロビン濃度 (Hb)	シアンメトヘモグロビン法
(3) ヘマトクリット値 (Ht)	球状化处理二次元レーザーFCM 法
(4) 平均赤血球容積 (MCV)	(1), (3)より算出
(5) 平均赤血球血色素量 (MCH)	(1), (2)より算出
(6) 平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	(2), (3)より算出
(7) 網赤血球数 (Ret)	RNA 染色によるレーザーFCM 法
(8) 血小板数 (PLT)	球状化处理二次元レーザーFCM 法
(9) プロトロンビン時間 (PT)	光散乱検出方式
(10) 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	光散乱検出方式
(11) 白血球数 (WBC)	酸性界面活性剤によるレーザーFCM 法
(12) 白血球百分率 (WBC Diff.)	ペルオキシダーゼ染色による FCM 法および酸性界面活性剤によるレーザーFCM 法

測定機器：

(1)-(3), (7), (8), (11), (12) : ADVIA120 (バイエル メディカル株式会社)

(9), (10) : CA-510 (シスメックス株式会社)

血清生化学的検査

計画解剖時に採取した血液の一部を室温で30分間以上静置後、遠心分離(3000 rpm, 約2050 g, 10分間, 約4°C)し、得られた血清を用いて下記の項目を測定した。なお、対照群の雌1例(動物番号70109)のカリウムについては、測定上限を越えたため、精製水にて希釈後再測定し、データとした。

項目	方法
(1) ASAT (GOT)	UV-rate法 (JSCC改良法)
(2) ALAT (GPT)	UV-rate法 (JSCC改良法)
(3) γ GT	γ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法 (SSCC改良法)
(4) ALP	p-ニトロフェニルリン酸基質法 (JSCC改良法)
(5) アセチルコリンエステラーゼ	アセチルチオコリン-DTNB法
(6) 総ビリルビン	酵素法 (BOD法)
(7) 尿素窒素	酵素-UV法 (Urease-LEDH法)
(8) クレアチニン	酵素法 (Creatininase-POD法)

(9)	グルコース	酵素法 (HK-G6PDH法)
(10)	総コレステロール	酵素法 (CO-HDAOS法)
(11)	トリグリセライド	酵素法 (GPO-HDAOS法, グリセリン消去法)
(12)	総蛋白	Biuret法
(13)	アルブミン	BCG法
(14)	A/G比	(12) および (13) より算出
(15)	カルシウム	OCPC法
(16)	無機リン	酵素法 (PNP-XOD-POD法)
(17)	ナトリウム (Na)	イオン選択電極法
(18)	カリウム (K)	イオン選択電極法
(19)	クロール (Cl)	イオン選択電極法

測定機器： TBA-200FR (株式会社東芝)

尿検査

投与期間最終週 (第4週) に, 各群雌雄5匹 (各群動物番号の小さい順に5例), 回復期間最終週 (第6週) に, 対照群および5.0 mg/kg 群の全生存動物の新鮮尿を採取して, 下記の試験紙法の項目および尿沈渣を検査した. また, 約21時間蓄積尿を採取して, 尿量, 比重, ナトリウム, カリウムおよびクロールを検査した.

項目	方法
(1) pH	試験紙法 (マルティスティックス, バイエルメディカル株式会社)
(2) 蛋白	試験紙法 (マルティスティックス, バイエルメディカル株式会社)
(3) グルコース	試験紙法 (マルティスティックス, バイエルメディカル株式会社)
(4) ケトン体	試験紙法 (マルティスティックス, バイエルメディカル株式会社)
(5) ビリルビン	試験紙法 (マルティスティックス, バイエルメディカル株式会社)
(6) 潜血	試験紙法 (マルティスティックス, バイエルメディカル株式会社)
(7) ウロビリノーゲン	試験紙法 (マルティスティックス, バイエルメディカル株式会社)
(8) 尿量	メスシリンダーで測定
(9) 比重	屈折法
(10) ナトリウム	イオン選択電極法
(11) カリウム	イオン選択電極法
(12) クロール	電量滴定法
(13) 尿沈渣	Sternheimer-Malbin 染色した標本を鏡検

測定機器

- (1)～(7)：クリニテック 100 (バイエル メディカル株式会社)
(9)：ユリコン-JE (株式会社アタゴ)
(10)～(12)：PVA- α III (株式会社エイアンドティー)

器官重量

全生存例について、下記の器官重量を電子天秤 (AW120, ED-H60：株式会社島津製作所) を用いて測定した (両側性の器官はまとめて測定した)。解剖日に体重を測定し、その体重に基づいて相対重量 (対体重比) を算出した。死亡動物については、体重は測定したが、器官重量は測定しなかった。

肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上部、卵巣、胸腺、脾臓、脳、心臓

病理解剖検査

全計画解剖動物については、採血後、腹大動脈を切断・放血し、安楽死させた後、剖検した。死亡動物については、発見後速やかに剖検した。

病理組織学的検査

全例の下記器官・組織を採取し、10 vol %中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。ただし、精巣および精巣上部はブアン液で、眼球およびハーダー腺はダビドソン液でそれぞれ固定後、10 vol %中性リン酸緩衝ホルマリン液で保存した (死亡動物については10 vol %中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定)。脳の固定については、特殊染色を行うため、10 vol %中性リン酸緩衝ホルマリン液中にて常温で約24時間とした。

脳 (大脳、小脳および橋を含む部位、4断面)、脊髄、胃、十二指腸、空腸、回腸 (パイエル板を含む)、盲腸、結腸、直腸、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、心臓、胸部大動脈、胸腺、眼球およびハーダー腺、下垂体、甲状腺 (上皮小体を含む)、気管および肺、精巣、卵巣、精巣上部、前立腺、子宮、膣、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、坐骨神経 (大腿筋に付けて採材)、骨髄 (大腿骨)、腸腰筋 (腰腸筋)

投与期間終了後解剖動物の対照群と5.0 mg/kg群の雌雄全例および死亡動物の上記器官・組織について、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、鏡検した。検査の結果、被験物質投与に起因すると思われる変化が肝臓に認められたため、全例の肝臓を検査した。なお、投与期間終了後解剖動物の対照群および5.0 mg/kg群の脳について、アポトーシス検出のためのTUNEL法、髄鞘を確認するためのKluver-Barrera染色、神経膠線維を確認するためのHolzer染色、軸索・神経線維を確認するためのBodian's染色を実施した。

結果および結論

被験物質投与群に死亡動物は認められなかった。

5.0 mg/kg 群の雌雄に摂餌量の低値が認められた。

血清生化学的検査において、5.0 mg/kg 群でクロールの低値が雌雄に、トリグリセライドの低値が雄に、総ビリルビンの低値が雌に認められた。

病理組織学的検査において、5.0 mg/kg 群の雌雄に肝臓の胆管増生およびグリソン鞘における炎症性細胞浸潤が認められた。なお、造血系器官である骨髄、脾臓には異常変化はみられず、また脳のヘマトキシリン・エオジン染色標本では器質的变化は認められなかった。

一般状態観察、体重測定、血液学・血清生化学的検査、尿検査および剖検において、被験物質投与に起因した変化は認められなかった。

本試験で認められた変化のうち、肝臓の胆管増生が5.0 mg/kg 群の雄で投与期間終了後にもみられ、回復性が認められなかった。その他の変化については、回復性あるいは回復傾向が認められた。

以上の結果から、本試験条件下におけるPMAAの無影響量(NOEL)は雌雄ともに1.2 mg/kg/dayと判断した。

5.1.6 MPAА ラット 28 日反復経口毒性試験

コード番号： A-6

試験番号： B050572

MPAA を 0, 2, 5 および 15 mg/kg の用量で雌雄ラット [CrI:CD(SD), SPF] に 28 日間反復経口投与し、現れる生体の機能および形態の変化を観察し、その毒性と回復性を評価した。

群構成

群 名	動物数			
	投与期間終了後解剖		回復期間終了後解剖	
	雄	雌	雄	雌
対 照	5	5	5	5
2 mg/kg	5	5	-	-
5 mg/kg	5	5	-	-
15 mg/kg	6	5	4	5

観察・測定項目

一般状態

投与期間は1日2回（投与前，投与後約30分）観察した。その他の期間は1日1回午前中に観察した。

詳細な症状観察

投与開始前に1回、投与期間中に毎週1回（午後）、下記の項目について検査を行った。飼育ケージ内で1分間、ハンドリング時およびオープンフィールド内で2分間の観察を行った。検査時には、動物番号とは別の識別番号を記載したラベルを付けて、用量および動物番号を観察者に判らないようにした。なお、生存動物には被験物質投与による影響はみられなかったことから、回復期間には検査を行わなかった。

- (1) 飼育ケージ内での観察
振戦、間代性痙攣、強直性痙攣、呼吸
- (2) ハンドリング時の観察
ケージからの取り出し易さ、ハンドリングに対する反応、攻撃性、皮膚（外傷、皮膚の色調）、被毛（被毛の汚れ）、眼（眼球突出、眼瞼閉鎖状態）、粘膜（結膜の色調）、分泌物、流涙、流涎、立毛、瞳孔径
- (3) オープンフィールド内での観察
立ち上がり、覚醒度、排尿、排便、体位・姿勢、呼吸、運動協調性、歩行の異常、振戦、間代性痙攣、強直性痙攣、常同行動、異常行動

機能検査

第4週に1回（午後）、下記の項目について検査を行った。刺激に対する反応性を観察した後、握力測定を行った。握力測定には、デジタルフォースゲージ（株式会社イマダ）を使用した。自発運動量の測定は、自発運動量測定装置（SUPERMEX、室町機械株式会社）を用い1時間行った。なお、運動量測定時には滅菌済みポリカーボネート製ケージ（床敷含む）を使用した。投与後の観察終了後、動物をポリカーボネート製ケージに移し、ケージ馴化を行った。その後、測定直前に新たなポリカーボネート製ケージに動物を移して測定した。また、測定期間中は餌および飲用水を与えなかった。自発運動量の測定以外の検査時には、動物番号とは別の識別番号を記載したラベルを付けて、用量および動物番号を観察者に判らないようにした。なお、第4週での検査で被験物質投与の影響が疑われる変化は認められなかったことから、回復期間には検査を行わなかった。

- (1) 刺激に対する反応性
接近反応、接触反応、聴覚反応、テールピンチ反応、空中正向反射
- (2) 握力測定
前肢握力、後肢握力
- (3) 自発運動量測定
測定開始から10分毎に集計するとともに1時間の総量を求めた。

体重

全生存例について、投与期間の第1、8、15、22および28日、回復期間の第29、36および42日に電子天秤（EB-3200S：株式会社島津製作所）を用いて測定した。また、各測定日間の

体重増加量を算出した。

摂餌量

個別に飼料の風袋込み重量を電子天秤（EB-3200S：株式会社島津製作所）を用いて測定し、投与期間中の第1～8, 8～15, 15～22, 23～28日, 回復期間中の第29～36および36～39日における1日平均摂餌量を算出した。また、摂餌量は測定期間の終了日で表示した。

血液学的検査

投与および回復期間終了後の計画解剖日（第29および43日）に全対象動物を前日の夕方より絶食し、ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール、大日本製薬株式会社）を腹腔内投与して麻酔し、後大静脈より採血した。採取した血液を用いて次に示す項目を測定した。プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間の測定には、凝固阻止剤として3.2 w/v%クエン酸三ナトリウム水溶液を使用し、遠心分離（12000 rpm, 約12000 g, 3分間, 4°C）して得られた血漿を用いた。その他の項目の測定には、凝固阻止剤EDTA-2Kで処理した血液を用いた。

項目	方法
(1) 赤血球数 (RBC)	球状化処理二次元レーザーFCM法
(2) ヘモグロビン濃度 (Hb)	シアンメトヘモグロビン法
(3) ヘマトクリット値 (Ht)	球状化処理二次元レーザーFCM法
(4) 平均赤血球容積 (MCV)	(1), (3)より算出
(5) 平均赤血球血色素量 (MCH)	(1), (2)より算出
(6) 平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	(2), (3)より算出
(7) 網赤血球数 (Ret)	RNA染色によるレーザーFCM法
(8) 血小板数 (PLT)	球状化処理二次元レーザーFCM法
(9) プロトロンビン時間 (PT)	光散乱検出方式
(10) 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	光散乱検出方式
(11) 白血球数 (WBC)	酸性界面活性剤によるレーザーFCM法
(12) 白血球百分率 (WBC Diff.)	ペルオキシダーゼ染色によるFCM法および酸性界面活性剤によるレーザーFCM法

測定機器：

(1)～(3), (7), (8), (11), (12)：ADVIA120（バイエルメディカル株式会社）

(9), (10)：CA-510（シスメックス株式会社）

血清生化学的検査

計画解剖時に採取した血液の一部を室温で 30 分間以上静置後、遠心分離 (3000 rpm, 2050 g, 10 分間, 約 4°C) し、得られた血清を用いて下記の項目を測定した。なお、対照群の雄 1 例 (動物番号: 40102) のカリウムについては、測定上限を越えたため、精製水にて 2 倍に希釈した後再測定し、データとした。

項目	方法
(1) ASAT (GOT)	UV-rate法 (JSCC改良法)
(2) ALAT (GPT)	UV-rate法 (JSCC改良法)
(3) γ GT	γ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法 (SSCC改良法)
(4) ALP	p-ニトロフェニルリン酸基質法 (JSCC改良法)
(5) アセチルコリンエステラーゼ	アセチルチオコリン-DTNB法
(6) 総ビリルビン	酵素法 (BOD法)
(7) 尿素窒素	酵素-UV法 (Urease-LEDH法)
(8) クレアチニン	酵素法 (Creatininase-POD法)
(9) グルコース	酵素法 (HK-G6PDH法)
(10) 総コレステロール	酵素法 (CO-HDAOS法)
(11) トリグリセライド	酵素法 (GPO-HDAOS法, グリセリン消去法)
(12) 総蛋白	Biuret法
(13) アルブミン	BCG法
(14) A/G比	(12) および (13) より算出
(15) カルシウム	OCPC法
(16) 無機リン	酵素法 (PNP-XOD-POD法)
(17) ナトリウム (Na)	イオン選択電極法
(18) カリウム (K)	イオン選択電極法
(19) クロール (Cl)	イオン選択電極法

測定機器: TBA-200FR (株式会社東芝)

尿検査

投与期間最終週 (第 4 週) に、各群雌雄 5 匹 (各群動物番号の小さい順に 5 例)、回復期間最終週 (第 6 週) に、対照群および 15 mg/kg 群の全例 (15 mg/kg 群の雄は 3 例、それ以外は各 5 例) の新鮮尿を採取して、下記の試験紙法の項目および尿沈渣を検査した。また、約 21 時間蓄積尿を採取して、尿量、比重、ナトリウム、カリウムおよびクロールを検査した。

項目	方法
(1) pH	試験紙法 (マルティステックス, ハイエル メディカル株式会社)
(2) 蛋白	試験紙法 (マルティステックス, ハイエル メディカル株式会社)
(3) グルコース	試験紙法 (マルティステックス, ハイエル メディカル株式会社)
(4) ケトン体	試験紙法 (マルティステックス, ハイエル メディカル株式会社)
(5) ビリルビン	試験紙法 (マルティステックス, ハイエル メディカル株式会社)
(6) 潜血	試験紙法 (マルティステックス, ハイエル メディカル株式会社)
(7) ウロビリノーゲン	試験紙法 (マルティステックス, ハイエル メディカル株式会社)
(8) 尿量	メスシリンダーで測定
(9) 比重	屈折法
(10) ナトリウム	イオン選択電極法
(11) カリウム	イオン選択電極法
(12) クロール	電量滴定法
(13) 尿沈渣	Sternheimer-Malbin 染色した標本を鏡検

測定機器

(1)~(7) : クリニテック 100 (バイエル メディカル株式会社)

(9) : ユリコン-JE (株式会社アタゴ)

(10)~(12) : PVA- α III (株式会社エイアンドティー)

器官重量

全生存例について、下記の器官重量を電子天秤 (AW120 : 株式会社島津製作所) を用いて測定した (両側性の器官はまとめて測定した)。解剖日に体重を測定し、その体重に基づいて相対重量 (対体重比) を算出した。死亡動物については、体重は測定したが、器官重量は測定しなかった。

肝臓, 腎臓, 副腎, 精巣, 精巣上体, 卵巣, 胸腺, 脾臓, 脳, 心臓

病理解剖検査

全計画解剖動物については、採血後、腹大動脈を切断・放血し、安楽死させた後、剖検した。死亡動物については、発見後速やかに剖検した。

病理組織学的検査

全例の下記器官・組織を採取し、10 vol %中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。ただし、精巣および精巣上体はブアン液で、眼球およびハーダー腺はダビドソン液でそれぞれ固定後、10 vol %中性リン酸緩衝ホルマリン液で保存した (死亡動物については10 vol %中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定)。なお、脳について行った特殊染色では、固定時間の制限

があったため、脳の固定条件は常温で約 24 時間とした。

肉眼的異常部位，脳（大脳，小脳および橋を含む部位，4 断面），脊髓，胃，十二指腸，空腸，回腸（パイエル板を含む），盲腸，結腸，直腸，肝臓，腎臓，副腎，脾臓，心臓，胸部大動脈，胸腺，眼球およびハーダー腺，下垂体，甲状腺（上皮小体含む），気管および肺，精巣，卵巣，精巣上体，前立腺，子宮，膣，膀胱，下顎リンパ節，腸間膜リンパ節，坐骨神経（大腿筋に付けて採材），骨髓（大腿骨），腸腰筋（腰腸肋筋）

投与期間終了後解剖動物の対照群と 15 mg/kg 群の雌雄全例および死亡動物の上記器官・組織，ならびに対照群を含む全動物の肉眼的異常部位について，常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し，鏡検した．また，剖検で総胆管の拡張が 15 mg/kg 群に認められたことから，全例の総胆管についても検査した．その結果，15 mg/kg 群で被験物質投与の影響が疑われる変化が，総胆管以外に雄の肝臓，腎臓および骨髓（大腿骨）に認められた．このため雄全例の肝臓，腎臓および骨髓（大腿骨）についても検査を行った．なお，投与期間終了後解剖動物の対照群および 15 mg/kg 群の脳について，アポトーシス検出のための TUNEL 法，髄鞘を確認するための Kluver-Barrera 染色，神経膠線維を確認するための Holzer 染色，軸索・神経線維を確認するための Bodian's 染色を実施した．なお，脳については約 24 時間固定であるため，投与期間終了後解剖動物の 2 および 5 mg/kg 群の全例および回復期間終了後解剖動物の全例の脳についてパラフィン包埋まで行った（10.2 項参照）．また，死亡動物のうち動物番号：40401 の十二指腸，空腸，回腸，盲腸および総胆管，動物番号：40405 の盲腸，動物番号：40409 の回腸は，死後の自己融解により，病理組織学的に評価できなかった．

結果および結論

投与期間中に 15 mg/kg 群の雄 3/10 例が死亡した．死亡動物では一般状態観察および詳細な症状の観察において，振戦が認められた．剖検では，腎臓の皮髄境界部の暗赤色化および白色化が認められた．病理組織学的検査では，肝臓の胆管増生，総胆管の増殖性炎，腎臓の皮髄境界部の壊死と再生性尿細管が認められた．その他，剖検および病理組織学的検査では，一般状態の悪化に伴うと思われる変化が胸腺，脾臓，骨髓，十二指腸および副腎に認められた．生存動物では，一般状態観察，詳細な症状の観察および機能検査において，被験物質投与に起因した変化は認められなかった．

15 mg/kg 群の雌雄に体重，体重増加量および摂餌量の有意な低値が認められた．15 mg/kg 群の雌での体重の低値については，回復期間のみにみられたが，投与期間中に生じた対照群との体重差に起因すると考えられた．

血清学的検査において，15 mg/kg 群の雄に赤血球数，ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の有意な低値が認められた．

血清生化学的検査において，15 mg/kg 群の雄にアルブミンおよび A/G 比の有意な低値，尿素窒素の有意な高値と γ GT の増加傾向がみられ，15 mg/kg 群の雌にクロールの有意な低値が認められた．また，15 mg/kg 群の雄 1 例に総ビリルビンの明らかな高値が認められた．

尿検査において、統計学的に有意ではなかったが、15 mg/kg 群の雌雄に尿円柱（類円柱，硝子円柱）が認められた。また、15 mg/kg 群の雄に尿量およびビリルビンの明らかな高値を示す動物が認められた。

器官重量において、15 mg/kg 群の雄に精巣上体の絶対重量の有意な低値および腎臓の相対重量の有意な高値がみられ、15 mg/kg 群の雌に脾臓相対重量の有意な低値が認められた。

剖検において、15 mg/kg 群の雌雄に総胆管の拡張がみられ、15 mg/kg 群の雄に肝臓の白色斑および腎臓の黄色斑が認められた。このうち、15 mg/kg 群の雌での総胆管の拡張は回復期間終了後のみに認められた。

病理組織学的検査において、15 mg/kg 群の雌雄に総胆管の増殖性炎がみられ、15 mg/kg 群の雄に骨髓（大腿骨）の赤血球系造血細胞の増加，肝臓の胆管増生，グリソン鞘における炎症性細胞浸潤および肉芽腫性炎，腎臓の硝子円柱，皮髄境界部の線維化および尿細管の壊死，皮質における再生性尿細管が認められた。ただし、15 mg/kg 群の雌での総胆管の増殖性炎は回復期間終了後のみに認められた。なお，一般状態観察で振戦など神経系への作用がみられたが，脳のヘマトキシリン・エオジン染色標本では器質的变化は認められなかった。

本試験で認められたほとんどの変化は，投与の休止により，回復性あるいは回復傾向が認められたが，15 mg/kg の雌雄で認められた剖検における総胆管の拡張および病理組織学的検査における総胆管の増殖性炎については，回復性を確認することができなかった。この他，回復期間終了後には，15 mg/kg 群の雄に病理組織学的検査における腎臓の再生性尿細管，尿検査における類円柱が認められた。しかし，再生性尿細管は障害された尿細管の修復像であること，他の尿細管壊死等の病理組織学的変化は回復したことから，腎臓の変化には回復性があると考えられた。また，類円柱は腎臓の尿細管の基質性変化に伴う変化と考えられることから，回復性があると考えられた。

以上の結果から，本試験条件下における MPAA の無影響量 (NOEL) は雌雄ともに 5 mg/kg/day と判断した。

5.2 生殖毒性試験

5.2.1 DPAA ラット催奇形性試験

コード番号： B-1

試験番号： B041215

DPAA を 0, 0.3, 1.0 および 3.0 mg/kg の用量で SD 系ラット [Crj:CD(SD) IGS, SPF] の妊娠 7 日から 17 日（胎児器官形成期）まで反復経口投与し，母動物および胚・胎児に及ぼす影響を検討した．各群の妊娠動物数はいずれも 22 匹であった．

群構成

群名	交尾動物数（妊娠動物数）
対照	22 (22)
0.3 mg/kg	22 (22)
1.0 mg/kg	22 (22)
3.0 mg/kg	22 (22)

母動物の観察・測定項目

一般状態

投与期間は 1 日 2 回（投与前，投与後約 30 分）観察し，他の期間は 1 日 1 回午前中に観察した．

体重

妊娠 0, 7, 10, 14, 17 および 20 日に測定した．測定には動物用天秤（UX4200H：株式会社島津製作所）を用いた．また，妊娠 7 日の体重を基準に体重増加量を算出した．

摂餌量

妊娠 0, 7, 10, 14, 17 および 20 日に風袋込み重量を測定し，各測定日間の 1 匹あたりの 1 日平均摂餌量を算出した．測定には動物用天秤（UX4200H：株式会社島津製作所）を用いた．摂餌量は各測定期間の終了日で表示した．

剖検

妊娠 20 日（帝王切開日）に，ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール注射液，大日本製薬株式会社）の尾静脈内投与による麻酔下で開腹し，腹大動脈を切断・放血し，安楽死させた後，胸腔および腹腔内の器官・組織を肉眼的に検査した．死亡動物は速やかに剖検した．死亡した 3.0 mg/kg 群の雌 1 例（動物番号 50412）の肝臓，腎臓，心臓，胸腺，胃，小腸および子宮，他の動物では胎盤および羊膜に肉眼的異常が認められたため当該器官・組織を摘出し，10 vol%中性リン酸緩衝ホルマリン液に保存した．比較対照として対照群の 3 例の当該器

官・組織を同様にして保存した。

胚・胎児の検査項目

帝王切開時の検査

妊娠 20 日の剖検時に卵巣および子宮を摘出し、黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胚数（早期死亡胚数：着床痕数＋胎盤遺残数、後期死亡胚数：浸軟胎児数＋死亡胎児数）および胎盤を肉眼的に検査した。また、検査結果に基づき次の項目を算出した。

着床前胚死亡率（%）： $(\text{黄体数} - \text{着床数}) / \text{黄体数} \times 100$

着床後胚死亡率（%）： $(\text{早期死亡胚数} + \text{後期死亡胚数}) / \text{着床数} \times 100$

総胚死亡率（%）： $\{(\text{黄体数} - \text{着床数}) + \text{早期死亡胚数} + \text{後期死亡胚数}\} / \text{黄体数} \times 100$

生存胎児は、臍動静脈切断による放血で安楽死させ、性別および口腔を含む外表を検査した後、個体ごとに体重を電子天秤（EB-620S：株式会社島津製作所）を用いて測定した。各腹ごとに約半数の生存胎児を内臓検査、残りの生存胎児を骨格検査に供した。死亡動物の胎児は、可能な限り生死および外表を検査した。

内臓検査

ホルマリン・酢酸混合液で胎児を固定した後、対照群と 3.0 mg/kg 群について頭部を Wilson 氏法、頸部、胸部および腹部を顕微解剖法により、内臓異常（奇形および変異）の有無を検査した。検査の結果、被験物質の影響がないと判断したため 0.3 および 1.0 mg/kg 群の検査は行わなかった。

骨格検査

骨格標本に供した全胎児について、アリザリンレッド S 骨格染色標本を作製した。対照群と 3.0 mg/kg 群について骨格異常（奇形および変異）の有無および骨化進行度（頸椎椎体、胸骨、中手骨、中足骨、仙・尾椎椎体の骨化数を指標とする）を検査した。検査の結果、被験物質の影響がないと判断したため 0.3 および 1.0 mg/kg 群の検査は行わなかった。

結果および結論

母動物に対する影響として、3.0 mg/kg 群で神経症状と考えられる易刺激性および振戦が妊娠 16 日以降 6/22 例および 2/22 例に観察された。振戦を呈した動物のうち 1 例は、その後全身状態が急激に悪化し、神経症状のほか自発運動の低下、腹臥位、膣口出血、貧血様症状および下腹部の汚れが認められ、妊娠 19 日に死亡した。また他の 1 例は膣口出血および下腹部の汚れが認められた。3.0 mg/kg 群では体重増加の抑制および摂餌量の低値が認められた。剖検では、死亡動物で肝臓、腎臓、心臓、胸腺、胃および小腸に変化がみられたが、帝王切開動物では死亡動物と同様な変化は認められなかった。帝王切開時の剖検で羊膜の暗黄色化が 3.0 mg/kg 群の 7/14 例に認められたが、胎児の死亡あるいは奇形は認められず、羊膜の暗黄色化

と胎児との間に関連はなかった。

胚・胎児発生に対する影響としては、高用量の 3.0 mg/kg 群においても、黄体数、着床数、着床後の死亡胚数、胚死亡率、生存胎児数、性比および胎盤所見では被験物質に起因する変化は認められなかった。また、胎児の外表面、内臓および骨格検査のいずれにも、被験物質に起因する変化は認められなかった。なお、同群の生存胎児体重（雌雄）の高値および頸椎椎体数、胸骨数、仙・尾椎椎体数の高値が認められた。しかし、これらは背景データ内の変動であったことから、偶発変化と判断した。

0.3 および 1.0 mg/kg 群では、母動物および胚・胎児に対して、いずれの検査においても被験物質に起因する変化は認められなかった。

以上のように、母動物への影響として 3.0 mg/kg 群で死亡がみられ、さらに神経症状の発現、体重増加の抑制および摂餌量の減少が認められた。しかし、胚・胎児に死亡はなく、奇形および変異の増加も認められなかったことから、被験物質による胚致死作用、胎児発育抑制および催奇形作用はないと考えられる。したがって、本試験条件下における母動物に対する一般毒性学的無影響量 (NOEL) は 1.0 mg/kg/day、母動物の生殖機能および胚・胎児に対する無影響量 (NOEL) はともに 3.0 mg/kg/day と判断した。

5.2.2 DPAA ラット初期胚発生（受胎能～着床）に関する試験

コード番号： B-2

試験番号： B041587

DPAA を 0, 0.3, 1 および 3 mg/kg の用量で SD 系ラット [Cri:CD(SD), SPF] の交配前から交尾、着床までの期間に反復経口投与し、生殖能および初期胚発生に及ぼす影響を検討した。なお、第 1 次交配において 3 mg/kg 群の交尾率が低下したため、同群の交尾しなかった雌雄を対象に雄は無処置雌と、雌は妊孕能（にんようのう）の確認された対照群の雄を用いて第 2 次交配を実施した。

群構成

群名	雄	雌
対照	20	20
0.3 mg/kg	20	20
1 mg/kg	20	20
3 mg/kg	20	20
無処置雌	—	10

親動物の観察・測定項目

一般状態

投与期間は1日2回（投与前，投与後約30分）観察し，他の期間は1日1回午前中に観察した。

体重

雌雄とも，投与開始日から剖検日まで週2回（3および4日間隔）測定した。交尾後の雌は妊娠0，3，7，10および13日に測定した。測定には動物用天秤（BX3200H：株式会社島津製作所）を用いた。また，体重増加量を交配前期間は雌雄とも投与開始日，雄の交配以降は第17日，雌の妊娠期間は妊娠0日の体重を基準に算出した。ただし，無処置雌は交尾確認後の妊娠0，7および13日に体重を測定した（体重増加量は算出しなかった）。

摂餌量

雌雄とも，ケージごとに投与開始日から交配開始日まで週2回（3および4日間隔），交尾後の雌は個体ごとに妊娠0，3，7，10および13日に風袋込み重量を測定し，1匹あたりの1日平均摂餌量を算出した。測定には動物用天秤（BX3200H：株式会社島津製作所）を用いた。摂餌量は測定期間の終了日で表示した。

無処置雌の摂餌量は測定しなかった。

剖検

剖検は雌雄とも，ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール注射液，大日本製薬株式会社）の腹腔内投与による麻酔下で開腹し，腹大動脈の切断・放血により安楽死させた後，胸腔および腹腔内器官・組織を肉眼的に検査した。死亡および瀕死動物は速やかに剖検した。すべての動物の精巣，精巣上体，前立腺腹葉，精嚢（凝固腺含む），卵巣および子宮を10 v/v%中性リン酸緩衝ホルマリン液に保存した。ただし，死亡動物以外の精巣はブアン液で固定した後，保存した。

死亡あるいは瀕死動物において，胸腺，眼球，腸腰筋，皮下（皮膚），脊髄，膀胱，胃～直腸，口腔，心臓，脳，下垂体，肝臓，総胆管，脾臓，腎臓，膵臓および肺に肉眼的異常がみられたため器官・組織を10 v/v%中性リン酸緩衝ホルマリン液に保存した。また，比較対照として対照群の3例の当該器官・組織も同様に保存した。

生殖機能検査

性周期

各群の雌について投与開始日から第1次交配開始日（同居日）まで毎日午前中に膣垢を採取して性周期を検査し，平均性周期日数および異常性周期動物の発現率を算出した。

第1次交配において交尾が確認されなかった3 mg/kg群の雌は，第1次交配の期間終了後から第2次交配開始日（同居日）までの間，同様に性周期を検査し，性周期が回帰するか否かを確認した。ただし，平均性周期日数および異常性周期動物の発現率は算出しなかった。

交配

交配開始日の16時以降、各群内で雄1雌1の交配対を設け、14日間を限度に昼夜同居させた(第1次交配)。交配開始日の翌日から雌の膣垢を毎日午前中に採取し、鏡検した。膣栓あるいは膣垢標本中に精子が認められた場合を交尾成立と判断し、その日を妊娠0日とした。第1次交配の結果、3 mg/kg 群で交尾の低下が疑われたため、第1次交配で交尾しなかった3 mg/kg 群の雌雄について第2次交配を実施した。雄は無処置雌と雄1雌1の交配対を設け、無処置雌の発情期が2回回帰するまで昼夜同居させた。雌は妊孕能が確認された対照群の雄と雄1雌1の交配対を設け、雌の発情期が2回回帰するまで、あるいは最大14日間を限度に昼夜同居させた。交尾成立の判断は第1次交配と同様とした。

なお、死亡などで交配対が成立しない動物は交配を行わなかった。これらの結果から次の項目を算出した。

交尾所要日数(第1次交配)：交配開始後、交尾成立までに要した日数

交尾を逸した発情期の回数(第1次交配)

交尾率(%)： $(\text{交尾動物数} / \text{同居動物数}) \times 100$

受胎率(%)： $(\text{受胎動物数} / \text{交尾動物数}) \times 100$

胚の検査

妊娠中期帝王切開

妊娠13日に卵巣および子宮を摘出し、黄体数、着床数、生存胚数、死亡胚数(早期死亡胚数：着床痕数+胎盤遺残数、後期死亡胚数：浸軟胚数+心停止胚数)および胎盤を肉眼的に検査した。肉眼的に着床が認められない動物の子宮は10v/v%硫化アンモニウム水溶液に浸漬し、着床の有無を確認した。検査結果に基づき次の項目を算出した。

着床前胚死亡率(%)： $\{(\text{黄体数} - \text{着床数}) / \text{黄体数}\} \times 100$

着床後胚死亡率(%)： $\{(\text{早期死亡胚数} + \text{後期死亡胚数}) / \text{着床数}\} \times 100$

総胚死亡率(%)： $[(\text{黄体数} - \text{着床数}) + \text{早期死亡胚数} + \text{後期死亡胚数}] / \text{黄体数} \times 100$

結果および結論

親動物に対する一般毒性学的影響として、3 mg/kg 群で死亡が雄6/20例、雌2/20例、瀕死期解剖動物が雄2/20例、雌1/20例に認められた。一般状態観察では3 mg/kg 群の死亡、瀕死および生存動物ともに、易刺激性、振戦、間代性あるいは強直性痙攣がみられ、同群では投与回数の増加と共に全身状態が悪化し、痩せ、側臥位、自発運動の低下、歩行異常、緩徐呼吸、体温低下、被毛状態の異常、貧血様、鼻周囲あるいは下腹部の汚れ、眼球の異常所見(膨大、破裂、変色)が認められた。3 mg/kg 群の雌雄に体重および摂餌量の低値が認められた。剖検では3 mg/kg 群の雌雄に胸腺の小型、総胆管の硬化および眼球の混濁、雄で肝臓の腫大が認められた。なお、各被験物質投与群とも被験物質に起因する生殖器系への異常所見は認められなかった。

生殖機能に対する影響として、第1次交配において3 mg/kg 群に交尾率の低下がみられ、第2次交配でも3 mg/kg 群の雄に交尾例数の低下が認められた。交尾率の低下は状態悪化に伴う

二次的な影響として現れた変化と考えられる。受胎率については被験物質に起因する影響は認められなかった。

妊娠中期の帝王切開において、第1次交配で交尾した3 mg/kg 群の雌では黄体数、着床数および生存胚数の低値、早期死亡胚数、着床前後ならびに総胚死亡率の高値が認められた。さらに第2次交配で対照群の雄と交尾した3 mg/kg 群の雌では、黄体数、着床数および生存胚数の低値傾向など前述と同様な変化を示した。3 mg/kg 群の雄と交尾した無処置雌では胚死亡は観察されず、着床した胚のすべてが妊娠中期まで生存していた。これらのことから初期胚発生への影響を雌側より考察すると、母体毒性により吸収胚が増加することや、制限給餌（栄養状態不良）により黄体数の低下を招くことが知られており、一般状態の悪化に伴う二次的な影響であった可能性も考えられる。しかし、黄体数については第2次交配においても明らかに低値傾向を示していることから、状態悪化に伴うものだけでなく、これらを含め何らかの機序で排卵数（黄体数）の低下を招いたものと推察された。

一方、雄側から考察すると、28日間反復投与毒性試験では高用量（5 mg/kg 群）の雄に組織学的変化として精巣の変性がみられたこと、ほ乳類細胞を用いた染色体異常試験では陽性と判定されたことから、状態悪化に伴う影響と雄性生殖器への直接的な影響により生じた変化の可能性が考えられる。

以上のように、本試験条件下における、親動物に対する一般毒性学および生殖機能に対する無影響量（NOEL）、ならびに初期胚発生に対する無影響量（NOEL）は、いずれも1 mg/kg/dayと考えられる。

5.2.3 DPAA ラット出生前後の発生・母動物に関する試験

コード番号： B-3

試験番号： B041589

DPAA を0, 0.1, 0.3 および1 mg/kg の用量でSD系ラット [CrI:CD(SD), SPF] の妊娠7日から分娩を経て哺育20日まで経口投与し、母体の機能、胚の発生および出生児の発生、成長、行動、学習および生殖機能に及ぼす影響を検討した。各群の妊娠動物数はいずれも24匹であった。

群構成

群名	交尾動物数（妊娠動物数）
対照	24 (24)
0.1 mg/kg	24 (24)
0.3 mg/kg	24 (24)
1 mg/kg	24 (24)

F0 母動物の観察・測定項目

一般状態

投与期間は1日2回（投与前，投与後約30分）観察し，他の期間は1日1回午前中に観察した。

体重

妊娠0，7，10，14，17および20日，哺育0，4，7，10，14，17および21日に測定した。測定には動物用天秤（UX4200H，BX3200H：株式会社島津製作所）を用いた。また，妊娠期間は妊娠7日，哺育期間は哺育0日の体重を基準に体重増加量を算出した。

摂餌量

妊娠0，7，10，14，17および20日，哺育0，4，7，10，14，17および21日に風袋込み重量を測定し，各測定日間の1匹あたりの1日平均摂餌量を算出した。測定には動物用天秤（UX4200H，BX3200H：株式会社島津製作所）を用いた。摂餌量は各測定期間の終了日で表示した。

分娩および哺育の観察

分娩の観察は妊娠21日から23日まで1日2回（午前9時，午後4時）行った。午後4時までに分娩が完了した動物を当該日分娩とした。哺育の観察は1日1回とし，授乳，営巣，食殺の有無等を中心に哺育21日まで行った。分娩動物は哺育21日に子宮を摘出して着床数を検査した。これらの検査結果から次の項目を算出した。

妊娠期間：妊娠0日から分娩日までの日数

出産率（%）： $(\text{生存児出産雌数}/\text{受胎雌数}) \times 100$

出生率（%）： $(\text{出生生存児数}/\text{着床数}) \times 100$

剖検

分娩動物は哺育21日に，ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール注射液，大日本製薬株式会社）の腹腔内投与による麻酔下で開腹し，腹大動脈の切断・放血により安楽死させた後，胸腔および腹腔内器官・組織を肉眼的に検査した。対照群で2例，0.1 mg/kg群で1例に異常所見が認められたため，異常部位を10 v/v%中性リン酸緩衝ホルマリン液に保存した。また，比較対照として対照群3例の当該器官・組織も同様にして保存した。

F1 動物の観察・検査項目

児数調整

生後4日に同腹児数を無作為に8匹（原則として雌雄同数）に調整した。同腹児数が8匹に満たない場合はそのまま飼育した。いずれも同腹内個体番号は雄から無作為に付けた。児数調整時に除外した動物は炭酸ガス吸入により安楽死させ，10 v/v%中性リン酸緩衝ホルマリン液に保存した。

離乳時の振り分け

各腹から生殖機能検査用および行動試験用動物としてそれぞれ雌雄各 1 匹を同腹内個体番号の小さい順に選抜し、離乳後の検査に供した。1 mg/kg 群の 2 腹（動物番号 50404, 50414）では、同腹児の雌雄どちらかが 1 匹以下であったため生殖機能検査用あるいは行動試験用動物を確保することができなかった。その他の動物は生後 21 日に剖検した。

観察

出生日に出生児数（生存児数，死亡児数），性別および口腔内を含む外表異常の有無を検査した。その後は一般状態，死亡の有無等を毎日観察した。出生日，生後 4 および 21 日の生存児数から，次の項目を算出した。

出生時生存率（%）：（出生生存児数 / 出生児数）× 100

4 日生存率（%）：（生後 4 日の生存児数 / 出生生存児数）× 100

離乳率（%）：（離乳時の生存児数 / 児数調整後の生存児数）× 100

体重

離乳前は，全例について出生日，生後 4，7，14 および 21 日に個体ごとに測定した。離乳後は生殖機能検査用動物について生後 28，35，42，49，56，63 および 70 日に測定した。生殖機能検査で交尾が確認された雌は妊娠 0，7 および 13 日に測定した。測定には動物用天秤（UX4200H，BX3200H：株式会社島津製作所）を用いた。

体重増加量を見数調整前は生後 0 日および 4 日の体重より同腹児単位で腹平均ごとに，見数調整後は個体ごとに離乳までは生後 4 日の体重，離乳後は生後 21 日の体重を基準に算出した。また，生殖機能検査の妊娠期間は妊娠 0 日の体重を基準に体重増加量を算出した。

生後形態分化

見数調整前は全例について，耳介展開の発現を生後 2～4 日に観察し，発現率を算出した。離乳前は全例について，上切歯萌出を生後 6 日から，眼瞼開裂を生後 10 日からそれぞれの発現日まで観察した。離乳後は生殖機能検査用動物について，膣開口（雌）を生後 27 日から，陰茎亀頭包皮分離（雄）を生後 35 日からそれぞれの発現日まで観察し，その発現日の体重も測定した。

反射反応性

生後 19 日に次の項目を検査し，陽性率を算出した。

平面正向反射，角膜反射，聴覚性驚愕反応，疼痛反応，空中正向反射，瞳孔反射

行動試験

行動試験用動物は 4 週齢以降に次の検査を行い，検査終了後に剖検した。ただし，オープンフィールド試験については，4～5 週齢の検査において被験物質投与群の雄で立ち上がり回数および身繕いまたは洗顔回数が減少したため，生殖機能検査用動物の雌雄についても 8～9 週

齢に検査を行った。なお、0.1 mg/kg 群の 1 例（行動試験用動物：10205-2）が生後 34 日に人為的な操作ミス（動物を床へ落下）により歩行の異常を示したため、ロータロッド試験は実施しなかった。オープンフィールド試験および Beil 型水迷路学習試験は実施したが、データ集計から除外した。

オープンフィールド試験

※装置と検査室

装置：円形フィールド（80φ×60H cm，25 区画，トキワ科学器械株式会社）

照度：約 100 Lux

騒音：約 75 dB

装置のセッティング：円形フィールド中央上部約 60cm の高さから照明し，円形フィールドの中央部分が約 100 Lux となるよう調整した。さらに，背景音として約 75 dB のホワイトノイズを発生させた。

検査室：消灯した動物のいない検査室

※動物と観察

週齢：4～5 週齢（行動検査用動物の雌雄），8～9 週齢（生殖機能検査用動物の雌雄）

試行回数：1 日

試行回数：1 回（目視検査）

観察時間：3 分間／試行

観察時刻：4～5 週齢（行動検査用動物の雌雄），雄；13:27～16:35，雌；13:09～15:15

8～9 週齢（生殖機能検査用動物の雌雄），雄；13:05～15:25，雌；13:13～15:16

観察手順：観察者および観察時刻に群の偏りが生じないように観察予定表を作成し，それに基づいて観察を行った。検査対象動物を専用の移動容器に入れて検査室へ移動し，フィールド中央区画に静かに置いた。約 10 秒後に容器を取除いた時点から観察を開始した。3 分間の観察終了ごとにフィールドを十分に清掃し，糞尿，臭気などを除去した。観察は飼育作業のない午後に行い，雌雄は観察日を変えて実施した。

観察項目：行動潜時，区画移動数，立ち上がり回数，身繕いまたは洗顔回数，脱糞数，排尿回数

（目視により検査実施）

ロータロッド試験

週齢：4～5 週齢

装置：ロータロッドテスト装置（ロッド径：90 mm，KN-75：株式会社夏目製作所）

条件：累積歩行時間 3 分間（10 rpm.，前方歩行）

項目：落下回数，歩行状態

Beil 型水迷路学習試験

週齢：雄 5～6 週齢，雌 6～7 週齢

装置：Biel 型水迷路装置（145W×145D×30H cm，岡崎産業株式会社）

条件：直水路試行 3 試行 / 日, 1 日間
水迷路試行 3 試行 / 日, 3 日間
項目：遊泳時間, エラー回数

生殖機能

10 週齢以降に生殖機能検査用動物について, 各群内で兄妹交配を避けて雄 1 雌 1 の交配対を設け, 14 日間を限度に昼夜同居させた (第 1 次交配). 雌の膣垢を毎日午前中に採取し, 鏡検した. 膣栓あるいは膣垢標本中に精子が認められた場合を交尾成立と判断し, その日を妊娠 0 日とした. 第 1 次交配の結果, 交尾能に被験物質の影響が認められなかったため, 第 2 次交配は実施しなかった. これらの結果から次の項目を算出した.

交尾所要日数 (第 1 次交配) : 交配開始後, 交尾成立までに要した日数

交尾成立までに逸した発情期の回数

交尾率 (%) : $(\text{交尾動物数} / \text{同居動物数}) \times 100$

受胎率 (%) : $(\text{受胎動物数} / \text{交尾動物数}) \times 100$

妊娠中期帝王切開

妊娠 13 日に卵巢および子宮を摘出し, 黄体数, 着床数, 生存胚数, 死亡胚数 (早期死亡胚数 : 着床痕数 + 胎盤遺残数, 後期死亡胚数 : 浸軟胚数 + 心停止胚数) および胎盤を肉眼的に検査した. また, 肉眼的に着床が認められない動物の子宮は 10 v/v% 硫化アンモニウム水溶液に浸漬し, 着床の有無を確認した. 検査結果に基づき次の項目を算出した.

着床前胚死亡率 (%) : $\{(\text{黄体数} - \text{着床数}) / \text{黄体数}\} \times 100$

着床後胚死亡率 (%) : $\{(\text{早期死亡胚数} + \text{後期死亡胚数}) / \text{着床数}\} \times 100$

総胚死亡率 (%) : $[(\text{黄体数} - \text{着床数}) + \text{早期死亡胚数} + \text{後期死亡胚数}] / \text{黄体数} \times 100$

剖検

離乳時に除外された児動物は生後 21 日, 行動検査用動物は検査終了後にペントバルビタールナトリウム (ネンブタール注射液, 大日本製薬株式会社) の腹腔内投与による麻酔下で開腹し, 腹大動脈の切断・放血により安楽死させた後, 頭部, 胸腔および腹腔内器官・組織を肉眼的に検査した. 生殖機能検査用動物については, 交尾した雌動物を妊娠 13 日, 未交尾動物を交配期間終了後 7 日, 雄は交配対の雌の剖検終了後に, 上記動物と同様に検査した. 死亡した出生児は速やかに剖検した. ただし, 児数調整前は食殺などで検査に耐えない場合を除き外表異常の有無を検査した後, 全身を 10 v/v% 中性リン酸緩衝ホルマリン液に保存した. 異常が認められた器官・組織は 10 v/v% 中性リン酸緩衝ホルマリン液に保存した. なお, 離乳時に除外された児動物の剖検では対照群の代表例雌雄各 3 例の全身, 生後 34 日に人為的操作ミスにより歩行の異常を示した 0.1 mg/kg 群の 1 例の左側前肢を 10v/v% 中性リン酸緩衝ホルマリン液で保存した.

生殖機能検査で交尾あるいは受胎が認められなかった動物の精巣, 精巣上体, 卵巢および子宮を 10 v/v% 中性リン酸緩衝ホルマリン液に保存した. 精巣はブアン液で固定した後, 10 v/v%

中性リン酸緩衝ホルマリン液に保存した。生殖機能検査用動物のオープンフィールド試験において、立ち上がり回数の有意な減少が認められたため、以後の検査が可能なように剖検時に全例の脳を摘出し、10 v/v%中性リン酸緩衝ホルマリン液に保存した。

結果および結論

母動物に対する影響として、一般状態、体重、摂餌量、分娩・哺育状態および剖検所見のいずれにも被験物質に起因する変化は認められなかった。

出生児に対する影響として、オープンフィールド試験において4～5週齢の検査では、被験物質投与群の雄で立ち上がり回数および身繕いまたは洗顔回数の有意な減少、有意な差はなかったものの行動潜時の延長傾向ならびに区画移動数の減少傾向が認められた。この変化が被験物質に起因する変化か否かを確認するため、オープンフィールド試験を実施していない新規の動物を用いて、8～9週齢で追加検査を実施した。その結果、0.3 および 1 mg/kg の雄、0.1 および 0.3 mg/kg 群の雌で立ち上がり回数の有意な減少、有意な差はなかったものの行動潜時の延長傾向が被験物質投与群の雌雄で観察された。ただし、実験動物におけるオープンフィールド試験の結果の解釈については、現在、確定的なものはなく、各測定指標の意味づけや評価方法については今後の議論が待たれる。それ以外、胚の発生および出生児の成長、生後の形態的発育および分化、各種の反射および反応、ローターロッド試験、Beil 型水迷路学習試験、交尾および受胎能ならびに剖検の各検査においては、被験物質に起因する変化は認められなかった。

以上のように、本試験条件下における母動物の一般毒性学的無影響量 (NOEL) および母動物の機能に対する無影響量 (NOEL) は 1 mg/kg/day、出生児に対しては無影響量 (NOEL) を観察することができなかった。

5.2.3 DPAA ラット出生前後の発生・母動物に関する試験 (低用量追加試験)

コード番号： B-4

試験番号： SBL801-001

DPAA を 0, 0.01, 0.03 および 0.1 mg/kg の用量で SD 系ラット [CrI:CD(SD), SPF] の妊娠 7 日から分娩を経て哺育 20 日まで経口投与し、母体の機能、胚の発生および出生児の発生、成長および行動に及ぼす影響を検討した。各群の妊娠動物数はそれぞれ 24, 24, 21 および 24 匹であった。

群構成

群名	交尾動物数 (妊娠動物数)
対照	24 (24)
0.01 mg/kg	24 (24)
0.03 mg/kg	24 (21)
0.1 mg/kg	24 (24)

F0 母動物の観察・測定項目

一般状態

投与期間は1日2回（投与前，投与後約30分）観察し，他の期間は1日1回午前中に観察した。

体重

妊娠0，7，10，14，17および20日，哺育0，4，7，10，14，17および21日に測定した。測定には動物用天秤（GX-4000，株式会社エー・アンド・デイ）を用いた。また，妊娠期間は妊娠7日，哺育期間は哺育0日の体重を基準に体重増加量を算出した。

摂餌量

妊娠0，7，10，14，17および20日，哺育0，4，7，10，14，17および21日に風袋込み重量を測定し，各測定日間の1匹あたりの1日平均摂餌量を算出した。測定には動物用天秤（GX-4000，株式会社エー・アンド・デイ）を用いた。

分娩および哺育の観察

分娩の観察は妊娠21日から26日まで1日2回（午前および午後）行った。哺育の観察は1日1回とし，授乳，営巣，食殺の有無等を中心に哺育21日まで行った。分娩動物は哺育21日に子宮を摘出して着床数を検査した。これらの検査結果から次の項目を算出した。

妊娠期間：妊娠0日から分娩開始までの日数

出産率（%）：（生存児出産雌数/妊娠雌数）× 100

出生率（%）：（出產生存児数/着床数）× 100

剖検

分娩動物は哺育21日に，ペントバルビタールナトリウム（東京化成工業株式会社）水溶液（6.48 mg/mL，8 mL/kg）の尾静脈内投与により麻酔を行い，放血安楽死後，外表，内部器官および組織を肉眼的に観察し，着床痕数を調べた。

F1 動物の観察・検査項目

児数調整

生後 4 日に原則として 1 腹当り雌雄各 4 匹となるように無作為 (MiTOX システム) に選択した。雌雄どちらかが 4 匹以下の場合は合計匹数を 8 匹とした。同腹児数が 8 匹以下の場合は調整を行わなかった。淘汰児はペントバルビタールナトリウム (東京化成工業株式会社) 水溶液 (6.48 mg/mL, 0.5 mL/body) の腹腔内への過剰量投与により安楽死させた。

離乳時の振り分け

出生児について、生後 21 日に各母動物の出生児のうち、出生児個体番号が若い雌雄それぞれ 2 例ずつ (計 4 例) を離乳させた。この時、動物番号の若い方を 4 週齢時オープンフィールド試験用育成児とし、残りの雌雄各 1 例を 8 週齢時オープンフィールド試験用育成児とした。

観察

出生日に出生児数 (生存児数, 死亡児数), 性別および口腔内を含む外表異常の有無を検査した。その後は一般状態, 死亡の有無等を毎日観察した。出生日, 生後 4 および 21 日の生存児数から, 次の項目を算出した。

出生時生存率 (%) : (出生生存児数 / 出生児数) × 100

4 日生存率 (%) : (生後 4 日の生存児数 / 出生生存児数) × 100

離乳率 (%) : (離乳時の生存児数 / 児数調整後の生存児数) × 100

体重

離乳前は, 全例について出生日, 生後 4, 7, 14 および 21 日に個体ごとに測定した。離乳後は, 行動試験予備検査用育成児について生後 28 日, 35 日, 42 日, 49 日および剖検日に電子天秤 (GX-4000, 株式会社エー・アンド・デイ) を用いて測定した。

オープンフィールド試験

※装置と検査室

装置 : 円形フィールド (60φ × 50H cm, 25 区画), 円形フィールド中央上部約 80cm の高さに照明を設置した。

検査室 : 消灯した動物のいない検査室

※動物と観察

週 齢 : 4 週齢および 8 週齢 (雌雄)

試行日数 : 1 日

試行回数 : 1 回 (目視検査)

観察時間 : 3 分間 / 試行

観察手順 : 検査対象動物を検査室へ移動させ, フィールド中央区画に置き, 即座にフタをして約 30 秒間放置 (暗順応) した。30 秒後にフタを取り去り, 観察を開始した。3 分間の観察終了ごとにフィールドを十分に清掃し, 糞尿を除去した。

観察項目：行動潜時，区画移動数，立ち上がり回数，身繕いまたは洗顔回数，脱糞数，排尿回数
(目視により検査実施)

剖検

離乳時に除外された児動物は生後 21 日，オープンフィールド試験用動物は検査終了後にペントバルビタールナトリウム(東京化成工業株式会社)水溶液(6.48 mg/mL，離乳時;1 mL/body，行動検査用動物;5 mL/kg)の腹腔内投与により麻酔を行い，放血安楽死後，外表，内部器官および組織を肉眼的に観察した。

異常が認められた器官・組織は 10 vol%中性緩衝ホルマリンに固定し，保存した。

また，4 週齢のオープンフィールド試験において，立ち上がり回数の有意な減少が 0.1 mg/kg 群の雌に認められたため，以後の検査が可能なように剖検時に全例の脳を採取し，重量を測定した。脳重量は電子天秤(HR-200，株式会社エー・アンド・デイ)を用いて測定し，剖検時の体重から相対重量を算出した。脳は 10 v/v%中性緩衝ホルマリン液に保存し，固定した。

結果および結論

母動物に対する影響として，一般状態，体重，摂餌量，分娩・哺育状態および剖検所見のいずれにも被験物質に起因する変化は認められなかった。

出生児に対する影響として，4 週齢のオープンフィールド試験において，0.1 mg/kg 群の雌で立ち上がり回数の有意な減少が認められた。しかしながら，0.1 mg/kg 群の雌では行動潜時，区画移動数，身繕いまたは洗顔回数，脱糞数および排尿回数に有意な差は認められず，0.03 および 0.01 mg/kg 群の雌ならびに雄では，全群においてオープンフィールド試験の検査項目に有意な差は認められなかった。また，8 週齢の検査においても，全群においてオープンフィールド試験の検査項目に被験物質投与の影響と考えられる変化は認められなかった。先に実施された高用量の試験(B-3 参照)では，4~5 週齢の 0.1 mg/kg 群の雄で立ち上がり回数および身繕いまたは洗顔回数の有意な減少，有意な差はなかったものの行動潜時の延長傾向ならびに区画移動数の減少傾向が，8~9 週齢での検査では 0.3 および 1 mg/kg の雄，0.1 および 0.3 mg/kg 群の雌で立ち上がり回数の有意な減少，0.1 mg/kg 群以上の全群の雌雄で有意な差はなかったものの行動潜時の延長傾向が観察された。これら 2 つの試験のオープンフィールド試験結果を総合的に考えると，これら 2 つの試験(B-3 および B-4)のオープンフィールド試験共通の結果として，0.1 mg/kg/day 以上で DPAA の次世代の行動への影響が認められたことから，0.03 mg/kg/day が無影響量(NOEL)と考えられた。なお，4 および 8 週齢のオープンフィールド試験後に実施した剖検では，いずれの群においても肉眼的異常所見は見出されず，脳重量にも差はなかった。その他，出生児の一般状態および体重推移にも被験物質に起因する変化は認められなかった。

以上の結果から，本試験条件下における母動物の一般毒性学的無影響量(NOEL)および母動物の機能に対する無影響量(NOEL)は 0.1 mg/kg/day 以上，出生児の無影響量(NOEL)は 0.03 mg/kg/day であると考えられた。

5.3 遺伝毒性試験

5.3.1 DPAA 細菌を用いた復帰突然変異試験

コード番号： C-1

試験番号： B041297

ネズミチフス菌株 TA100, TA1535, TA98 および TA1537 ならびに大腸菌株 WP2*uvrA*/pKM101 の 5 菌株を用いる復帰突然変異試験で DPAA の変異原性を調べた。試験は S9 mix 非存在下および存在下でプレインキュベーション法により実施した。

予備試験を 1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250 および 5000 μg /プレート の 7 用量で実施した結果, S9 mix 非存在下の TA100 および TA1537 において, 5000 μg /プレートの用量で菌の生育阻害が認められた。なお, S9 mix の有無にかかわらず, いずれの用量においてもプレート上に沈殿物は認められなかった。

これらの結果をもとに, 本試験では以下の用量を設定した。

S9 mix 非存在下： 78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 μg /プレート

S9 mix 存在下： 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 μg /プレート

2 回の本試験の結果, S9 mix の有無にかかわらず, いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍未満であった。また, S9 mix 非存在下の TA100 および TA1537 において 2500 μg /プレート以上の用量で菌の生育阻害が認められた。なお, S9 mix の有無にかかわらず, いずれの用量においてもプレート上に沈殿物は認められなかった。

本試験の陰性 (溶媒) 対照値および陽性対照値は, 当研究所の適正範囲内であった。また, 陽性対照により誘発された復帰変異コロニー数は, S9 mix 非存在下および存在下のいずれの試験菌株においても陰性対照値の 2 倍を超えて増加し, 明らかな陽性結果を示した。従って, 本試験の妥当性が確認された。

以上の結果から, DPAA は本試験条件下において変異原性を有さない (陰性) と結論づけた。

5.3.2 DPAA ほ乳類細胞を用いた染色体異常試験

コード番号： C-2

試験番号： B041298

雌チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/IU を用い, DPAA の *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

短時間処理法 S9 mix 非共存下 (以下-S9 mix) および共存下 (以下+S9 mix) ならびに連続処理法 24 時間処理 (以下 24 時間処理) で 9.8, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を設定して, 細胞増殖抑制試験を実施した。

その結果、50%細胞増殖抑制用量は、-S9 mix で 764 $\mu\text{g/mL}$ 、+S9 mix で 739 $\mu\text{g/mL}$ 、24 時間処理で 193 $\mu\text{g/mL}$ であった。

この結果に基づいて、-S9 mix および+S9 mix では 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 $\mu\text{g/mL}$ 、24 時間処理では 25, 50, 100, 200, 300, 400 $\mu\text{g/mL}$ を設定して、染色体異常試験（本試験）を実施した。

-S9 mix の 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 $\mu\text{g/mL}$ における構造異常細胞の出現頻度は、それぞれ 1.5%, 1.5%, 4.5%, 18.0%, 24.5%, 29.0%であった (D_{20} 値 : 0.93 mg/mL)。これらの用量における細胞増殖率は、それぞれ 106%, 83%, 59%, 51%, 34%, 25%であった。数的異常細胞の出現頻度は、いずれの用量においても 5%未満であった。

+S9 mix の本試験の 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 $\mu\text{g/mL}$ における構造異常細胞の出現頻度は、それぞれ 2.0%, 1.0%, 4.5%, 10.5%, 21.0%, 31.5%であった (D_{20} 値 : 0.99 mg/mL)。

また、これらの用量における数的異常細胞の出現頻度は、それぞれ 1.0%, 0.0%, 1.5%, 9.5%, 6.5%, 1.5%であった（用量相関性が認められなかったため、 D_{20} 値は算出しなかった）。これらの用量における細胞増殖率は、それぞれ 106%, 85%, 75%, 67%, 38%, 28%であった。

この結果に基づいて、+S9 mix について 600, 800, 1000, 1200 $\mu\text{g/mL}$ で確認試験を実施した。その結果、各用量における構造異常細胞の出現頻度は、それぞれ 2.5%, 4.0%, 20.0%, 39.0%であった (D_{20} 値 : 0.92 mg/mL)。また、これらの用量における数的異常細胞の出現頻度は、それぞれ 5.5%, 3.5%, 4.0%, 2.0%であった（用量相関性が認められなかったため、 D_{20} 値は算出しなかった）。これらの用量における細胞増殖率は、それぞれ 70%, 55%, 35%, 18%であった。以上の確認試験結果により、本試験の再現性が示されたものと判断した。

24 時間処理の 25, 50, 100, 200, 300 $\mu\text{g/mL}$ における構造異常細胞の出現頻度は、それぞれ 1.0%, 2.0%, 2.5%, 13.5%, 33.1%であった (D_{20} 値 : 0.11 mg/mL)。これらの用量における細胞増殖率は、それぞれ 94%, 87%, 81%, 50%, 37%であった。なお 300 $\mu\text{g/mL}$ の標本については、細胞毒性のために、観察可能な分裂中期像が、一方のプレートでは 70 個、もう一方のプレートでは 72 個しか得られなかった。また 400 $\mu\text{g/mL}$ （細胞増殖率 22%）の標本については、細胞毒性のために標本観察が不可能であった。数的異常細胞の出現頻度は、いずれの用量においても 5%未満であった。

以上の結果より、DPAA は、当試験条件下において CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性を中程度有すると結論づけた。

5.3.3 DPAA ラット小核試験

コード番号 : C-3

試験番号 : B041300

雌雄の SD 系ラット [Crj:CD(SD) IGS, SPF, 7 週齢] を用いて DPAA のラット骨髓細胞における小核誘発性の有無を検討した。

予備試験の結果、DPAA 投与により雄で 40 mg/kg 以上の群、雌で 80 mg/kg 以上の群に死亡が

認められた。毒性発現に性差が認められたため、本試験についても雌雄で実施した。すなわち、雄では高用量を予備試験で死亡のみられなかった最高用量の 20 mg/kg, 中用量を 10 mg/kg および低用量を 5 mg/kg の 3 用量を、雌では高用量を予備試験で死亡のみられなかった最高用量の 40 mg/kg, 中用量を 20 mg/kg および低用量を 10 mg/kg の 3 用量を、ならびに媒体（局方注射用水, pH を 0.1 mol/L NaOH 溶液を用いて pH 7.23 に調整したもの）を 1 群 5 匹の動物に、24 時間間隔で 2 回強制経口投与した。また、陽性対照物質 (Cyclophosphamide monohydrate, CP) については単回腹腔内投与した。最終投与後 24 時間に骨髓細胞を採取し、1 匹あたり 2000 個の多染性赤血球 (PCE) を数えて、小核をもつ PCE (MNPCE) の出現数を求めた。また、赤血球 1000 個あたりの PCE の割合を調べて、骨髓造血機能の指標とした。

その結果、雄では、10000 個の PCE 中 (2000 個×5 匹/群) の MNPCE 出現数は、陰性対照群で 13 個、被験物質群では 5, 10 および 20 mg/kg でそれぞれ 13, 10 および 14 個であり、陰性対照群と比較していずれも有意差はみられなかった。また、全赤血球中の PCE の割合は、被験物質投与群の 5, 10 および 20 mg/kg でそれぞれ 52.0 ± 2.3 , 48.6 ± 4.9 および $51.0 \pm 3.0\%$ で、陰性対照群の $51.8 \pm 2.4\%$ と比較して有意差はみられなかった。一方、陽性対照群では、MNPCE 出現数は 274 個であり、陰性対照群と比較して有意な高値 ($p < 0.01$) を示した。PCE の割合 ($49.2 \pm 3.4\%$) は、陰性対照群と比較して有意差はみられなかった。

雌では、10000 個の PCE 中 (2000 個×5 匹/群) の MNPCE 出現数は、陰性対照群で 18 個、被験物質群では 10, 20 および 40 mg/kg でそれぞれ 8, 13 および 13 個であり、陰性対照群と比較していずれも有意差はみられなかった。また、全赤血球中の PCE の割合は、被験物質投与群の 10, 20 および 40 mg/kg でそれぞれ 43.8 ± 6.0 , 44.5 ± 1.9 および $36.5 \pm 7.4\%$ で、陰性対照群の $51.5 \pm 1.2\%$ と比較して有意な低値 (10 mg/kg は $p < 0.05$, 20 および 40 mg/kg は $p < 0.01$) を示し、骨髓造血機能の抑制がみられた。一方、陽性対照群では、MNPCE 出現数は 219 個であり、陰性対照群と比較して有意な高値 ($p < 0.01$) を示した。PCE の割合 ($43.5 \pm 3.1\%$) は、陰性対照群と比較して有意な低値 ($p < 0.01$) を示し、骨髓造血機能の抑制がみられた。

陰性対照群の各個体における MNPCE 出現頻度および PCE の割合は、いずれも試験施設の背景値の範囲の値であり、陽性対照群では有意で明らかな小核誘発がみられ、背景値の範囲内の値を示したことから、本試験は適切に実施されたと判断した。

以上の結果から、DPAA は本試験条件下で陰性と判定され、ラット骨髓細胞における小核誘発性を有さないものと結論づけた。

5.4 薬物動態試験

5.4.1 ^{14}C 標識 DPAA を用いたラット単回投与時の血液・血漿中濃度試験

コード番号： D-1

試験番号： B041305

^{14}C 標識 DPAA (^{14}C -DPAA) を雄の SD 系ラット [Crj:CD(SD) IGS, SPF] に非絶食条件下、各群 3 匹ずつ単回経口 (0.1, 0.3 および 1 mg/kg) および静脈内 (0.1 mg/kg) 投与し、血液、血漿中放射能濃度推移および吸収性を検討した。また、同様に雌ラットに 0.3 mg/kg の用量で単回経口投与し、血液および血漿中放射能濃度推移における性差を検討した。

雄ラットに 0.1, 0.3 および 1 mg/kg の用量で経口投与したとき、血液および血漿中放射能濃度は投与量に比例して増加し、最高濃度 (C_{\max}) および濃度・時間曲線下面積 (AUC_{0-t}) は、いずれにおいても投与量に比例して増加した。また、投与量による消失速度の大きな変化がないことから、0.1~1 mg/kg の投与量範囲においては ^{14}C -DPAA の体内動態は大きく変動しないことが示唆された。なお、血漿中放射能濃度の検出限界まで低下する時間の違いは投与放射エネルギーの違いに由来するものであり、体内動態の変動ではないと考える。

経口投与したときの血液中放射能濃度は投与後約 4~8 時間に最高濃度に到達し、血漿中放射能濃度は投与後 30 分に最高濃度に到達した。その後、放射能濃度は経時的に低下し、血漿中放射能濃度は 0.1 mg/kg では投与後 48 時間、0.3 mg/kg では投与後 96 時間でそれぞれ検出限界未達となったが、血液中放射能濃度の低下は血漿中放射能濃度に比べ緩徐であり、いずれの投与量においても最終測定時点 (投与後 168 時間) まで血液中放射能濃度は測定された。

さらに、静脈内投与時においては、血漿中放射能濃度は最初の測定時点である投与後 5 分以降低下し、投与後 72 時間で検出限界未達となったが、血液中放射能濃度は投与後 6 時間までほぼ一定に推移し、血漿中放射能濃度との乖離は経時的に大きくなった。

雄ラットにおける吸収率 (F) を経口投与時と静脈内投与時の $\text{AUC}_{0-\infty}$ の比率から算出した結果、血液中放射能濃度の場合は約 84~96%、血漿中放射能濃度の場合は約 72~77%であり、 ^{14}C -DPAA の経口吸収性は比較的高いことが示唆された。

また、雌ラットに 0.3 mg/kg 経口投与したときの血液および血漿中放射能濃度推移は雄ラットの場合とほぼ同様であり、ラットにおいては ^{14}C -DPAA の体内動態に性差はないものと考えられた。

5.4.2 ^{14}C 標識 DPAA を用いたラット単回投与時の体内分布試験

コード番号： D-2

試験番号： B041306

^{14}C 標識 DPAA (^{14}C -DPAA) を 8 週齢の雄の SD 系ラット [Crj:CD(SD) IGS, SPF] に非絶食条件下 0.3 mg/kg の用量で単回経口投与したときの放射能の体内分布について組織中放射能濃度の測定 (組織摘出法) および全身オートラジオグラフィー (ARG) により検討した。組織

摘出法では各群 3 匹および ARG では各群 1 匹の動物を用いて評価した。

^{14}C -DPAA を雄ラットに経口投与したとき、放射能はほぼ全身に分布し、大脳、小脳、延髄および坐骨神経を除く大部分の組織中放射能濃度は、投与後 0.5 または 4 時間に最高値を示し、その後は経時的に低下した。投与部位である胃を除き、特に高い放射能濃度を示した組織は腎臓 (1034.2 ng eq/g, 投与後 0.5 時間) であった。放射能分布率では、消化管内容物を除くと血液、骨格筋、小腸、肝臓および皮膚で比較的高く、これらの組織においては投与量の 3% 以上の放射能が認められた。

大脳、小脳、延髄および坐骨神経への放射能の移行は緩徐であり、投与後 24 時間に最高値 (それぞれ 60.2, 60.1, 68.4 および 37.6 ng eq/g) を示した。投与後 24 時間における放射能分布率としては、大脳、小脳および延髄において投与量のそれぞれ 0.102, 0.020 および 0.016% であった。その後、放射能濃度は緩徐に低下し、投与後 168 時間において、大脳 (12.9 ng eq/g)、小脳 (11.6 ng eq/g) および延髄 (14.9 ng eq/g) では各最高値の約 20%、坐骨神経 (14.5 ng eq/g) では最高値の約 40% の放射能濃度が認められた。また、皮膚からの放射能の消失も緩やかであり、投与後 168 時間において最高値 (56.0 ng eq/g) の約 20% の放射能濃度 (10.5 ng eq/g) が認められた。一方、他の組織においては、投与後 168 時間までに放射能濃度は最高濃度の 10% 以下、または検出限界未満まで低下していた。

全身 ARG においても組織摘出法による放射能分布の結果とほぼ同様の傾向が示された。投与後 0.5 および 4 時間においては全身に放射能が認められ、特に消化管内容物、次いで腎臓に顕著であった。その後は、全身の放射能は経時的に低下し、投与後 168 時間においては脳および脊髄に微量の放射能が認められたが、他の組織には放射能は検出されなかった。

以上の結果から、全身の組織に分布した放射能は経時的に低下し、大部分については体外に排泄されるが、一部の組織においては低下が緩徐であり、特に中枢・末梢神経系において顕著であることが示唆された。

また、 ^{14}C -DPAA の血球成分への移行または結合性は高いことが推察された。

5.4.3 ^{14}C 標識 DPAA を用いたラット単回投与時の排泄・体内残留性試験

コード番号： D-3

試験番号： B041307

^{14}C 標識 DPAA (^{14}C -DPAA) を雄の SD 系ラット [Crj:CD(SD) IGS, SPF] に非絶食条件下、各群 3 匹ずつ単回経口 (0.3 mg/kg) および静脈内 (0.1 mg/kg) 投与したときの放射能の尿、糞、呼気中排泄および体内残留性について検討した。

経口および静脈内投与したときの投与後 168 時間までの総排泄率は、それぞれ投与量の 99.5% および 102.7% であった。いずれの投与経路においても投与量の約 100% が排泄されており、投与された ^{14}C -DPAA は大部分が体外に排泄されることが示された。投与後 168 時間におけるカーカス中の残存放射能は、経口投与の場合は投与量の 0.7%、静脈内投与の場合は 0.8% であった。

静脈内投与したとき、 ^{14}C -DPAA は尿中に投与量の 63.0%の放射能が排泄され、吸収された ^{14}C -DPAA の主排泄経路は尿中排泄であることが示された。また、糞中に投与量の 38.0%の放射能が排泄されたことから、 ^{14}C -DPAA の排泄には胆汁排泄が関与することが示唆された。

^{14}C -DPAA の吸収率は 76.5%【経口投与時の尿中総排泄率 (48.2%) / 静脈内投与時の尿中総排泄率 (63.0%) \times 100%】と推定された。

さらに、投与後 24 時間までに経口投与の場合は投与量の 77.7%、静脈内投与の場合は 83.0%の放射能がそれぞれ排泄されており、 ^{14}C -DPAA の排泄は比較的速やかであると考えられた。

5.4.4 ^{14}C 標識 DPAA を用いた *in vitro* 代謝試験

コード番号： D-4

試験番号： B041308

ヒトおよびラットの肝ミクロソームおよび肝細胞を用いて ^{14}C 標識 DPAA (^{14}C -DPAA) を最終濃度として 10 $\mu\text{mol/mL}$ および 100 $\mu\text{mol/mL}$ で 1 時間 *in vitro* 反応し、代謝物を HPLC により検索した。

in vitro 反応後の反応液を HPLC で分析した結果、いずれの反応液においても ^{14}C -DPAA の保持時間と一致する放射能ピークが 99.6%以上で検出され、モノフェニルアルソン酸 (MPAA) の保持時間と一致する放射能ピークが最大で 0.5%検出された。*in vitro* 反応に用いた基質溶液を分析した結果、MPAA の保持時間と一致する放射能ピークが 0.5%確認され、反応液の分析で検出された MPAA は基質中に含まれていたと考えられた。以上の結果から、肝ミクロソームおよび肝細胞の *in vitro* 反応では ^{14}C -DPAA は代謝を受けず、さらに、種差および反応液中の ^{14}C -DPAA 濃度による代謝の差はないことが示唆された。

5.4.5 ^{14}C 標識 DPAA を用いたラット単回投与時の胎盤・胎児移行性試験

コード番号： D-5

試験番号： B050299

^{14}C 標識 DPAA (^{14}C -DPAA) を SD 系妊娠ラット [Crj:CD(SD) IGS, SPF] に 0.3 mg/kg の用量で単回経口投与したときの放射能の胎盤・胎児移行性を組織中放射能濃度の測定 (組織摘出法) および全身オートラジオグラフィ (ARG) により検討した。組織摘出法では各群 3 匹および ARG では各群 1 匹の動物を用いて評価した。

^{14}C -DPAA を妊娠ラットに経口投与したとき、放射能はほぼ全身に分布し、母動物の脳、小脳、延髄、脊髄および胎児の血液、脳においては、投与後 24 時間で最高濃度を示し、その他の組織においては投与後 0.5 時間で最高濃度を示した。特に高い放射能濃度を示した組織は母動物の腎臓であった。投与後 0.5 および 24 時間における血漿、血液、腎臓、肝臓、脳等の主要な組織中放射能濃度および放射能の血球移行率は、雄性ラットの場合 (D-2 参照) と

ほぼ同様であり、DPAA の分布には、性差または妊娠による大きな変動はないことが示唆された。

胎盤中放射能濃度は投与後 24 および 48 時間においては血漿中放射能濃度より高い値を示したが、いずれの測定時点においても血液中放射能濃度よりは低く、胎盤への DPAA の分布は特に高くないことが示唆された。また、胎児全身および組織中濃度は胎盤中放射能濃度と同レベルまたはそれ以下であり、妊娠後期において DPAA の母動物から胎児への移行は胎盤により制限されていることが推察された。

胎児脳濃度は母動物の中樞神経系の場合と同様に投与後 24 時間で最高値となり、胎児においても DPAA の中樞神経系への移行は緩徐であることが示唆された。一方、母動物における血液中濃度に対する脳濃度は約 52% (大脳) であるが、胎児における血液中濃度に対する脳濃度は約 23% と母動物に比べ低く、胎児においては DPAA の中樞神経系への移行性は低いことが推察された。

また、乳腺、卵巣および子宮中放射能濃度は血液中放射能濃度より低く、妊娠後期の母動物において DPAA の乳腺、卵巣および子宮への分布の程度は低いことが示唆された。

5.4.6 ^{14}C 標識 DPAA を用いたラット単回投与時の乳汁移行性試験

コード番号： D-6

試験番号： B050300

^{14}C 標識 DPAA (^{14}C -DPAA) を哺育中の SD 系ラット [Crj:CD(SD) IGS, SPF] に各群 3 匹ずつ 0.3 mg/kg の用量で単回経口投与し、放射能の乳汁移行性を検討した。

血漿中放射能濃度の最高値 (C_{\max}) は 70.1 ng eq/mL (最高濃度到達時間, t_{\max} : 2.0 hr) であった。その後、投与後 8 時間以降投与後 24 時間には 5.5 ng eq/mL まで低下し、投与後 48 時間には 1.2 ng eq/mL まで低下した。投与後 8 時間以降の消失半減期 ($t_{1/2}$) は 9.6 hr であり、濃度・時間曲線下面積 (AUC_{0-t} および $\text{AUC}_{0-\infty}$) はそれぞれ 575.7 および 592.0 ng eq·hr/mL であった。

乳汁中放射能濃度は投与後 4~8 時間まではほぼ同程度のレベルで推移し、 C_{\max} は 15.6 ng eq/mL (t_{\max} : 6.7 hr) であった。その後、投与後 24 時間には 4.9 ng eq/mL まで低下し、投与後 48 時間には 0.9 ng eq/mL まで低下した。投与後 8 時間以降の $t_{1/2}$ は 9.8 hr であり、 AUC_{0-t} および $\text{AUC}_{0-\infty}$ はそれぞれ 321.1 および 333.9 ng eq·hr/mL であった。

血漿中放射能濃度に対する乳汁中放射能濃度の比率は、投与後 8 時間までは経時的に上昇したが、それ以降はほぼ一定 (0.8~0.9) であり、乳汁中放射能濃度は血漿中放射能濃度とほぼ同程度の $t_{1/2}$ で減衰した。また、乳汁中放射能濃度の $\text{AUC}_{0-\infty}$ は血漿中放射能濃度の $\text{AUC}_{0-\infty}$ の約 56% であった。以上の結果から、 ^{14}C -DPAA を単回経口投与したとき、乳汁中に放射能は特に残留しないことが推察された。

5.4.7 ^{14}C 標識 DPAA を用いた幼若ラット単回投与時の体内分布試験

コード番号： D-7

試験番号： B050301

^{14}C 標識 DPAA (^{14}C -DPAA) を生後 4 日の雄の SD 系ラット [Crj:CD(SD) IGS, SPF] に 0.3 mg/kg の用量で単回経口投与したときの放射能の体内分布を組織中放射能濃度の測定 (組織摘出法) および全身オートラジオグラフィ (ARG) により検討した。組織摘出法では各群 6 匹および ARG では各群 1 匹の動物を用いて評価した。

^{14}C -DPAA を生後 4 日の雄の新生児ラットに経口投与したとき、放射能の大部分は消化管 (内容物を含む) に存在したが、吸収された放射能はほぼ全身に分布した。組織中放射能濃度は、消化管においては投与後 0.5 時間、血液、心臓、肺、肝臓および腎臓においては投与後 4 時間、脳においては投与後 24 時間にそれぞれ最高値を示した。

新生児ラットにおいて、投与部位である消化管を除き、特に高い放射能濃度を示した組織は血液および肝臓であった。一方、8 週齢の雄性成熟ラットに ^{14}C -DPAA を単回投与したときの分布試験 (D-2 参照) においては最も高い放射能濃度は腎臓で認められたが、新生児ラットにおいては腎臓中の放射能濃度は血液中濃度よりも低かった。また、血液、心臓、肺、肝臓および腎臓中の放射能濃度は、成熟ラットにおいては投与後 72 時間には最高濃度の約 4~9% まで低下したが、新生児ラットにおいては約 30~50% の放射能濃度が認められた。さらに、脳放射能濃度は、新生児および成熟ラットのいずれにおいても投与後 24 時間に最高値を示し、成熟ラットにおいては投与後 72 時間には最高濃度の約 50% まで低下したが、新生児ラットにおいては最高濃度とほぼ同程度の放射能が認められた。以上のことから、新生児ラットに ^{14}C -DPAA を単回経口投与したときの放射能の体内分布は、成熟ラットの場合と異なることが示唆された。

5.4.8 ^{14}C 標識 DPAA を用いたラット 7 日反復投与時の体内分布試験

コード番号： D-8

試験番号： B050302

^{14}C 標識 DPAA (^{14}C -DPAA) を雄の SD 系ラット [Crj:CD(SD) IGS, SPF] に 0.3 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回、7 日間反復経口投与したときの放射能の体内分布を組織中放射能濃度の測定 (組織摘出法) および全身オートラジオグラフィ (ARG) により検討した。組織摘出法では各群 3 匹および ARG では各群 1 匹の動物を用いて評価した。

^{14}C -DPAA を雄ラットに 1 日 1 回、7 日間反復経口投与したとき、放射能はほぼ全身に分布し、最終投与後 0.5 時間に最高濃度を示した後、経時的に低下した。

最も高い放射能濃度を示した組織は腎臓であり、次いで消化管を除くと大脳、小脳、延髄、脊髄、坐骨神経等の中枢・末梢神経系であった。腎臓においては最終投与後 336 時間までに最高値の 1% 未満まで低下したが、大脳、小脳、延髄、脊髄、皮膚、脂肪および坐骨神経から

の放射能の消失は緩徐であり、最終投与後 336 時間においてそれぞれ最高値の 10%以上の放射能濃度が認められた。特に皮膚中の放射能濃度は最高値の約 28%であった。

放射能の血球移行率は最終投与後 24 時間以降、96%以上で推移した。

最終投与後 24 時間における大部分の組織中の放射能濃度は単回経口投与後 24 時間の放射能濃度 (D-2 参照) の約 2~4 倍に相当し、組織中放射能濃度は反復投与により上昇することが示された。しかし、この上昇率 (約 2~4 倍) は、血漿の場合と同程度であり、放射能の血漿から組織への移行性は反復投与により大きく変動しないことが示唆された。

全身 ARG においても組織摘出法による放射能分布の結果とほぼ同様の傾向が示された。投与後 0.5 時間においては全身に放射能が認められ、特に消化管内容物、次いで膀胱内尿、腎臓に顕著であった。その後は、全身の放射能はほぼ経時的に低下し、投与後 336 時間においては脳および脊髄に痕跡程度の放射能が認められたが、他の組織には放射能は検出されなかった。

以上の結果から、 ^{14}C -DPAA の反復経口投与により全身の組織に分布し、その放射能は経時的に減衰し、大部分については体外に排泄されることが示唆された。一方、一部の組織においては放射能の減衰は緩徐であり、特に中枢・末梢神経系、脂肪および皮膚において顕著であることが示唆された。

5.4.9 ^{14}C 標識 DPAA を用いたラット脳内分布試験

コード番号： D-9

試験番号： B050303

^{14}C 標識 DPAA (^{14}C -DPAA) を雄の SD 系ラット [Crj:CD(SD) IGS, SPF] に非絶食条件下、1 mg/kg の用量で各群 1 匹ずつ単回経口投与したときの放射能の脳内分布をオートラジオグラフィにより検討した。

投与後 24 時間においては、脳、視神経、血液および耳下腺に高い放射能が認められた。大脳、小脳、延髄および視神経における放射能レベルはほぼ均一であった。脳下垂体および脳室内の放射能レベルは低かった。

投与後 72 時間においては、全体の放射能レベル投与後 24 時間の場合に比べて低下したが、脳、視神経および耳下腺に比較的高い放射能が認められた。脳内の放射能分布は投与後 24 時間の場合と同様にほぼ均一であった。

以上の結果から、 ^{14}C -DPAA を経口投与したときの脳内における放射能分布に部位特異性はないものと考えられた。

5.4.10 ^{14}C 標識 DPAA を用いた *in vitro* 血球移行性試験

コード番号： D-10

試験番号： B041594

ラット血液およびヒト血液を用いて、血球移行の平衡化時間の検討を実施した。ラット血液では、検討を実施した 60 分まで、わずかに血球移行率の上昇が認められたが、ヒトについては 30 分のインキュベーション時間で 100 ng/mL についても 1000 ng/mL についても ^{14}C -DPAA の血球移行は、ほぼ平衡に達していると考えられた。したがって、血球移行率の測定は、インキュベーション時間を 30 分間として実施することとした。

ラット血液における ^{14}C -DPAA 濃度 100 および 1000 ng/mL での血球移行率は、それぞれ $21.8 \pm 0.5\%$ (Mean \pm S.D.) および $22.8 \pm 0.2\%$ であった。また、ヒト血液における ^{14}C -DPAA 濃度 100 および 1000 ng/mL での血球移行率は、それぞれ $26.1 \pm 0.5\%$ および $24.9 \pm 0.4\%$ であった。ラットとヒトの血球移行率を比較したところ、ヒトにおいて若干ラットよりも血球移行率が高い傾向が認められたが、その差はわずかであった。また、ラットおよびヒトともに濃度に依存した変化は認められなかった。

5.4.11 ^{14}C 標識 DPAA を用いた *in vitro* 血漿蛋白結合性試験

コード番号： D-11

試験番号： B041593

^{14}C 標識 DPAA (^{14}C -DPAA) のラットおよびヒトにおける血漿蛋白結合率を *in vitro* で限外濾過法により測定した。

ラット血漿における蛋白結合率は、 ^{14}C -DPAA 濃度 100 および 1000 ng/mL において、それぞれ $63.9 \pm 0.5\%$ (Mean \pm S.D.) および $64.1 \pm 0.5\%$ であった。ヒト血漿における蛋白結合率は、 ^{14}C -DPAA 濃度 100 および 1000 ng/mL において、それぞれ $58.6 \pm 1.2\%$ および $59.1 \pm 0.6\%$ であった。また、ヒト血清アルブミン (HSA, 40 mg/mL) における蛋白結合率は、 ^{14}C -DPAA 濃度 100 および 1000 ng/mL において、それぞれ $34.0 \pm 0.7\%$ および $34.9 \pm 0.2\%$ であった。ヒト α_1 -酸性糖蛋白 (α_1 -AGP, 1 mg/mL) における蛋白結合率は、 ^{14}C -DPAA 濃度 100 および 1000 ng/mL において、それぞれ $5.6 \pm 0.9\%$ および $6.0 \pm 0.4\%$ であった。ラットとヒトの大きな種差は認められず、100 および 1000 ng/mL での濃度に依存した変化は認められなかった。さらに、ヒトにおける主要な結合蛋白は HSA であることが推測された。

5.4.12 DPAA ラット 91 日反復経口毒性試験での肝薬物代謝酵素試験

コード番号： D-12

試験番号： B041592

DPAA を雌雄の SD 系ラット [Crj:CD(SD) IGS, SPF] に 1 日 1 回, 0.1, 0.3, 0.8 および 2.0 mg/kg の用量で 91 日間反復経口投与した後の肝臓中の肝ミクロソーム蛋白量, チトクローム P450 含量, 7-エトキシレゾルフィン *O*-脱エチル化酵素活性, 7-ベンジルオキシレゾルフィン *O*-脱エチル化酵素活性, ラウリン酸 11-水酸化酵素活性およびラウリン酸 12-水酸化酵素活性を測定し, 肝薬物代謝酵素系に及ぼす影響について検討した. また, 回復性について検討するため 28 日間の回復群についても測定を行った.

雌雄全ての群において, 肝ミクロソーム蛋白量および肝ミクロソーム蛋白あたりの酵素含量および活性のいずれも対照群と比較して有意な変化は認められなかった. したがって, 本試験条件下では DPAA は肝薬物代謝酵素系に影響を及ぼすことはないものと判断した.

5.4.13 ¹⁴C 標識 DPAA を用いたラット 21 日反復投与時の脳内分布試験

コード番号： D-13

試験番号： B091269

¹⁴C 標識 DPAA (¹⁴C-DPAA) を雄の SD 系ラット [Crj:CD(SD), SPF] に非絶食条件下, 0.3 mg/kg の用量で各群 3 匹ずつ単回および反復経口投与したときの放射能の脳内分布について検討した.

単回投与後における腎臓および肝臓は最終投与後 168 時間までに投与後 24 時間の 10% 以下まで低下した. しかし, 脳分画, 脊髄, 坐骨神経等の中枢・末梢神経系からの放射能の消失は緩徐であり, 最終投与後 168 時間において, それぞれの投与後 24 時間の 17% 以上の放射能濃度が認められた. 特に坐骨神経においては 40% 以上の放射能濃度が認められ, 消失が最も緩徐であった.

21 回反復投与後における腎臓および肝臓は最終投与後 336 時間までに投与後 24 時間の 18% 以下まで低下した. しかし, 脳分画, 脊髄, 坐骨神経等の中枢・末梢神経系からの放射能の消失は緩徐であり, 最終投与後 336 時間において, それぞれの投与後 24 時間の 22% 以上の放射能濃度が認められた. 特に脊髄においては 40% 以上の放射能濃度が認められ, 消失が最も緩徐であった.

21 回最終投与後 24, 72 および 168 時間における組織中放射能濃度は単回経口投与後の各時点の放射能濃度の約 2~9 倍に相当し, 組織中放射能濃度は反復投与により上昇することが示された. しかし, この上昇率 (約 2~9 倍) は, 血漿の場合と同程度であり, 放射能の血漿から組織への移行性は反復投与により大きく変動しないことが示唆された.

5.4.14 ¹⁴C 標識 DPAA を用いたラット単回投与時の胆汁中排泄試験

コード番号： D-14

試験番号： B091270

¹⁴C 標識 DPAA (¹⁴C-DPAA) を雄の SD 系ラット [Crj:CD(SD), SPF] に非絶食条件下、0.3 mg/kg の用量で各群 3 匹ずつ単回経口投与したときの放射能の胆汁排泄および代謝について検討した。

胆管カニューレションを施したラットにおいて、投与後 48 時間までの胆汁、尿および糞中に、投与放射能のそれぞれ 13.4%、43.8% および 26.7% の放射能が排泄された。

このことから、経口投与された ¹⁴C-DPAA は 57.2% 程度吸収されることが考えられた。

投与後 48 時間までの胆汁中には 5 種 (M1~M5) のピークが検出され、M3 である未変化体 (63.5%) の組成比が高かった。

5.4.15 ¹⁴C 標識 DPAA を用いたラット単回腹腔内投与時における治療候補物質併用投与時の排泄および体内残留性試験

コード番号： D-15

試験番号： B091271

注射用水および治療候補物質 (コレスチミド) を反復経口投与中に ¹⁴C 標識 DPAA (¹⁴C-DPAA) を雄の SD 系ラット [Crj:CD(SD), SPF] に非絶食条件下、0.1 mg/kg の用量で単回腹腔内投与したときの尿、糞中放射能排泄率および体内残留性について検討した。注射用水投与群は 4 匹およびコレスチミド投与群は 5 匹の動物を用いて評価した。

コレスチミドを反復経口投与中に ¹⁴C-DPAA を単回腹腔内投与後 168 時間までの尿および糞中には、投与放射能のそれぞれ 60.8% および 36.9% が排泄された。これらを合わせた放射能の総回収率は 97.7% であった。コレスチミドの媒体のみ (注射用水) を反復経口投与中に ¹⁴C-DPAA を単回腹腔内投与後 168 時間までの尿および糞中には、投与放射能のそれぞれ 60.5% および 37.3% が排泄された。これらを合わせた放射能の総回収率は 97.8% であった。

コレスチミドを反復経口投与中に ¹⁴C-DPAA を単回腹腔内投与後 168 時間の組織中放射能濃度で最も高い値を示した組織は腎臓であった。次いで血液、坐骨神経、延髄、脊髄、大脳および小脳であった。組織における放射能分布率では、皮膚が最も高かった。また、採取した組織における合計は 1.035% となった。

媒体 (注射用水) を反復経口投与中に ¹⁴C-DPAA を単回腹腔内投与後 168 時間の組織中放射能濃度で最も高い値を示した組織は腎臓であった。次いで血液、延髄、坐骨神経、脊髄および大脳であった。組織における放射能分布率では、皮膚が最も高かった。また、採取した組織における合計は 1.491% となった。

以上の事からコレスチミド反復経口投与における排泄率に変化は認められなかった。

体内残留性については、治療候補物質投与群が媒体投与群に比べ低い傾向が認められた。

5.4.15 ^{14}C 標識 DPAA を用いたラット反復経口投与時の胎盤・胎児移行性試験（出生前後における反復投与時の児動物への移行）

コード番号： D-16

試験番号： B101275

^{14}C 標識 DPAA (^{14}C -DPAA) を妊娠期間および授乳期間の SD 系ラット[Crj:CD(SD), SPF]に非絶食条件下 0.1 mg/kg の用量で反復経口投与したときの児動物の放射能の体内分布を組織中放射能濃度の測定（組織摘出法）および全身オートラジオグラフィにより検討した。また、母動物の放射能の体内分布について全身オートラジオグラフィにより検討した。組織摘出法では各群 3 匹および ARG では各群 1 匹の動物を用いて評価した。

児動物において、組織中放射能濃度は最終投与後 24 時間に最高値を示し、ほぼ経時的に低下した。いずれの測定時点においても、最も高い放射能濃度を示した組織は延髄（雄性：7.5 ng eq./g, 雌性：7.9 ng eq./g, 最終投与後 24 時間）であった。また、大脳、小脳および延髄といった中枢神経系からの放射能の消失は緩徐であり、最終投与後 168 時間において、雄性児動物では各最高値の約 41～52% (1.8～3.9 ng eq./g)、雌性児動物では各最高値の約 45～53% (2.1～4.2 ng eq./g) の放射能濃度が認められた。一方、他の組織においては、最終投与後 168 時間までに、雄性児動物では最高放射能濃度の約 33%以下、又は検出限界未満、雌性児動物では最高放射能濃度の約 38%以下、又は検出限界未満まで低下した。特に、血漿、副腎、腎臓、脾臓、膵臓、前立腺、精巣、骨及び卵巣からの放射能の消失は、他の組織に比較して速やかであった。全身オートラジオグラフィにおいても組織摘出法による放射能分布の結果とほぼ同様の傾向が示され、最終投与後 24 時間において、消化管内容物、中枢神経系（大脳、小脳、延髄および脊髄）、腎臓および肝臓に放射能が認められた。雄性児動物と雌性児動物の組織中放射能濃度は同程度であり、雌雄差は認められなかった。これらのことから、児動物に母動物を介して ^{14}C -DPAA を反復投与したときの ^{14}C -DPAA の体内分布は、成熟ラットに反復投与した場合（D-8）と同様の傾向を示すことが示唆された。一方、児動物の放射能レベルは母動物より低かった。このことより、母動物から児動物へ ^{14}C -DPAA は移行するが、母動物より分布の程度は低いことが示唆された。

母動物は、最終投与後 24 時間においてほぼ全身に放射能が認められ、放射能分布は、腎臓において顕著であった。雄性ラット排泄試験（D-3）において、静脈内投与時の主排泄経路が尿中排泄であったことから、主排泄組織である腎臓に高い放射能の分布が認められたものと考えられた。乳腺中放射能レベルは血液中放射能レベルより低く、授乳期間の母動物において、DPAA の乳腺への分布の程度は低いことが示唆された。

5.5 物質特性試験

5.5.1 DPAA 解離定数測定試験

コード番号： E-1

試験番号： D050031

DPAA の分配係数測定が可能であるかを判断するため、DPAA の解離定数を測定した。OECD Guideline for Testing of Chemicals「水中における解離定数 (No.112, 1981)」に記載の滴定法に準拠して、DPAA の 25°C における解離定数 (pKa) を測定した結果、pKa は 4.90 であった。

5.5.2 DPAA 分配係数測定試験

コード番号： E-2

試験番号： D050032

4.5.1 DPAA 解離定数測定試験の結果、DPAA の分配係数 (1-オクタノール / 水) の測定 (HPLC 法) は、pKa 以下の pH 条件下で測定可能であると判断した。OECD Guideline for Testing of Chemicals「分配係数 (n-オクタノール / 水) (HPLC 法) (No.117, 1989)」に準拠して、DPAA の分配係数を測定した結果、log Pow は 1.2 (pH 3) であった。

6. 総括

6.1 DPAA の体内動態

DPAA の体内動態は ^{14}C 標識 DPAA を被験物質として放射能を指標に検討した。

6.1.1 吸収

DPAA をラットに経口投与した結果、投与した DPAA の約 8 割が消化管から吸収され、経口吸収性は比較的高く、性差はないことが示唆された (D-1, D-3)。

経皮的な吸収に関しては、1000 mg/kg/day という高用量での投与ながら (A-4)、DPAA に特徴的な毒性作用 (黄色尿および肝臓の腫大など) が認められたことから、DPAA は経皮吸収されることが示唆された。

6.1.2 分布

ラットにおいて、吸収された DPAA は全身諸器官に分布し、特に腎臓に高い割合で分布し、次いで血液、骨格筋、小腸、肝臓および皮膚に分布した (D-2, D-8)。また、分布速度は緩やかながら、中枢・末梢神経へも分布していた。なお、中枢神経では、大脳、小脳、延髄、視神経にほぼ均等に分布 (D-9) していたことから、中枢神経内での部位特異性はないものと考えられる。分布した DPAA はこれらの器官から次第に消失していくが、比較的、中枢・末梢神経および皮膚からの消失は緩やか (D-2, D-8) で、詳細は不明ながら DPAA は中枢・末梢神経および皮膚に長く留まる傾向が認められた。また、21 回反復投与後と単回投与時の脳内分布および消失 (D-13) に顕著な差は見られず、反復投与における蓄積性は大きく変動しないことが示唆された。妊娠ラットを用い、DPAA の胎児への移行性について検討 (D-5) した結果、DPAA の胎児への分布の割合は低く、DPAA の胎児への移行は胎盤により制限されていることが示唆された。

ラット新生児 (4 日齢) を用いて DPAA の体内分布を検討した結果、成獣ラット (8 週齢) では腎臓に最も高い割合で分布 (D-2) したのに対し、新生児ラットでは血液および肝臓に高い割合で分布 (D-7) した。ラットでは腎糸球体の形成は生後 8~14 日と考えられている。従って、4 日齢の新生児ラットでは腎臓からの排泄機能が未熟のため、腎臓ではなく血液や肝臓に分布したものと推察される。

妊娠期間および授乳期間のラットに DPAA を反復投与し、児動物への移行性を検討した結果、DPAA は主に中枢神経系に分布 (D-16) しており、これらの器官からの消失は緩やかであった。DPAA の児動物への分布の割合は母動物より低く、また、児動物への分布に性差は認められなかった。妊娠期間および授乳期間 DPAA を反復投与された母動物から、その母動物に哺育された児動物へ DPAA が移行するが、母動物より分布の程度は低いことが示唆された。血液中ではその多くが血球および血漿蛋白と結合していると思われる (D-2, D-10, D-11)。ヒトおよびラット血液を用いた *in vitro* 試験 (D-10) では、添加した DPAA の約 2 割が血球成分と結合し、種差は認められなかった。さらに、ヒトおよびラット血漿を用いた *in vitro* 試験

(D-11) では、添加した DPAA の約 6 割が血漿蛋白と結合しており、種差は認められなかった。ヒト血漿蛋白においては約 6 割がアルブミン(HSA)に、約 1 割が α_1 -酸性糖蛋白(α_1 -AGP)に結合していた。

6.1.3 代謝

ヒトおよびラットの肝ミクロソーム・肝細胞を用いた *in vitro* 代謝試験 (D-4) では、DPAA はいずれにおいても代謝を受けず、種差は認められなかった。また、91 日間反復投与したラットの肝薬物代謝酵素を測定 (A-2, D-12) した結果、DPAA はいずれの薬物代謝酵素も誘導しないことが明らかとなった。

6.1.4 排泄

DPAA の排泄経路は、ラットでは主に尿中排泄 (D-3) であった。経口投与後 24 時間までに、投与した DPAA の約 8 割が尿中、糞中に排泄されており、その排泄は比較的速やかであると考えられる。また、胆管カニュレーションを施したラットにおいて (D-14)、経口投与した DPAA の約 1 割が胆汁中から排泄された。経口および静脈内投与後 168 時間までに、投与した DPAA はほぼ完全に尿中、糞中に排泄されたが、前述 (D-2, D-8) したように微量の DPAA は中枢・末梢神経および皮膚に長く留まる傾向が認められている。治療候補物質および媒体を反復投与した際に DPAA を腹腔内投与したときの (D-15) 排泄に大きな差は見られなかったが、体内残留性について治療候補物質投与時において媒体投与群に比べ低下する傾向が見られた。妊娠動物の乳汁も 1 つの排泄経路と考えられるが、ラットを用いた乳汁移行性試験 (D-6) の結果によると、DPAA は特に乳汁中に排泄されやすい物質ではなかった。

6.2 DPAA の一般毒性

DPAA の毒性プロファイルを明らかにするため、ラットを用いて 28 日間および 91 日間反復投与毒性試験 (A-1, A-2) を実施した。投与経路として、ヒトが曝露される可能性の高い経口投与を採用した。各試験における投与用量を以下に示す。

(単位 : mg/kg/day)

群	28 日間 反復投与毒性試験	91 日間 反復投与毒性試験
対照	0	0
低用量	0.3	0.1
中間用量-1	1.2	0.3
中間用量-2	-	0.8
高用量	5.0	2.0

その結果、DPAA 投与に起因した神経毒性、血液・造血器毒性、肝毒性、その他が認められたので、毒性ごとに他の試験結果と併せて総括する。

6.2.1 神経毒性

ラット 28 日間反復投与毒性試験 (A-1) では 5.0 mg/kg/day の用量, ラット 91 日間反復投与毒性試験 (A-2) では 2.0 mg/kg/day の用量で振戦, 痙攣, 易刺激性, 流涎などが発現した。これらの変化は神経系への作用により発現すると考えられていることから, DPAA は中枢・末梢神経系に対し何らかの作用を有しているものと考えられる。また, これらの変化はある程度 DPAA による投与処置が進んだ後に発現しており, 中枢・末梢神経に DPAA が蓄積することで発現した可能性が高い。前述の体内動態試験 (D-2, D-8) においても DPAA は中枢・末梢神経に残留傾向にあることが指摘されており, 上述した説を裏付けるものと考えられる。

6.2.2 血液・造血器毒性

ラット 28 日間反復投与毒性試験 (A-1) では 1.2 mg/kg/day 以上の用量, ラット 91 日間反復投与毒性試験 (A-2) では 2.0 mg/kg/day の用量で赤血球数, ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の低下などの貧血傾向が認められた。

通常, 鉄欠乏性貧血または溶血性貧血では, 血液の酸素運搬能低下に対する代償として網赤血球数が上昇するが, 28 日間反復投与毒性試験 (A-1) では上昇せず, むしろ低下していた。赤血球の生産場所である骨髄では造血細胞が減少していたことから, 赤血球の骨髄における分化・成熟段階に DPAA が影響を及ぼしている可能性がある。前述の *in vitro* 血球移行性試験 (D-10) において, DPAA は血球成分に移行することが明らかとなっており, DPAA は血球 (赤血球) に影響を及ぼす可能性がある。なお, 91 日間反復投与毒性試験 (A-2) では, 2.0 mg/kg/day の用量で同じく貧血傾向が認められたものの, 網赤血球数は上昇し, 骨髄には異常所見は認められなかった。

6.2.3 肝毒性

ラット 28 日間反復投与毒性試験 (A-1) では 5.0 mg/kg/day の用量, ラット 91 日間反復投与毒性試験 (A-2) では 2.0 mg/kg/day の用量で肝臓の重量が増加し, 病理組織学的に胆管増生やグリソン鞘における炎症性細胞浸潤, グリソン鞘内の肉芽形成が認められた。

肝臓の胆管増生は正常の加齢ラットでも認められるが, DPAA 投与によって発現した炎症性細胞浸潤を伴う胆管増生は対照群には認められなかったこと, 用いたラットが若齢であったことから, DPAA 投与に起因した変化である可能性がある。また, 28 日間反復投与毒性試験 (A-1) における 5.0 mg/kg/day の用量でグリソン鞘内にみられた肉芽形成は, 間断連続標本により小葉間胆管との移行像が確認され, 胆管由来と考えられた。

血清生化学的検査では, 28 日間反復投与毒性試験では 5.0 mg/kg/day の用量, 91 日間反復投与毒性試験では 2.0 mg/kg/day の用量で ASAT (GOT), ALAT (GPT), γ GT および ALP などの胆道系酵素の高値が認められた。さらに, 胆道系障害を示唆する血漿総ビリルビンおよび尿素窒素の高値や尿ビリルビンおよびウロビリノーゲンの高値が認められたことから, DPAA は肝臓の胆道系に影響を及ぼすことが示唆された。

前述の体内動態試験 (D-2, D-8) では, DPAA は肝臓に高い割合で分布することが確認されている。消化管から吸収された DPAA は先ず肝臓を通過することから, 肝臓が主要な標的臓

器となっているものと考えられる。

6.2.4 その他の影響

ラット 28 日間反復投与毒性試験 (A-1) では 5.0 mg/kg/day の用量, ラット 91 日間反復投与毒性試験 (A-2) では 2.0 mg/kg/day の用量で胸腺の重量低下 (小型化) がみられ, 組織学的には萎縮 (退縮) 性変化が認められた。

免疫系への影響を精査するため, リンパ球サブセット解析 (A-2) を実施した結果, リンパ球のプロポーシオンには変化は認められなかった。

6.2.5 一般毒性試験における無影響量

DPAA ラット 28 日反復経口毒性試験において, 被験物質投与に起因すると考えられる変化が雌雄とも 1.2 mg/kg 以上の群に認められたことから, 28 日反復経口毒性試験条件下における DPAA の無影響量 (NOEL) は雌雄とも 0.3 mg/kg/day となる。

DPAA ラット 91 日反復経口毒性試験において, 被験物質投与に起因すると考えられる変化が雌雄とも 2.0 mg/kg 以上の群に認められたことから, 91 日反復経口毒性試験条件下における DPAA の無影響量 (NOEL) は雌雄ともに 0.8 mg/kg/day となる。

6.3 DPAA の生殖発生毒性

ラットを用いた催奇形性試験 (B-1) の結果, 最高用量である 3.0 mg/kg/day の用量でも陰性であったことから, DPAA はラットに対して奇形を誘発するような作用はないものと考えられる。

ラット生殖能試験 (B-2) では, 3.0 mg/kg/day の用量で動物状態の悪化に伴う二次的な交尾率の低下がみられたが, 受胎率には DPAA 投与による影響は認められなかった。また, 初期胚発生への影響として黄体数, 着床数および生存胚数の低下, 早期死亡胚数, 着床前後ならびに総胚死亡率の増加が認められた。原因としては雌雄の状態悪化に伴う変化ならびに雌雄生殖器への直接的・間接的な影響により生じた変化の可能性が推察される。

ラット出生前後の発生, 母体への投与試験 (B-3) に対しては, オープンフィールド試験において, 最低用量の 0.1 mg/kg/day から行動潜時の延長, 区画移動数, 立ち上がり回数および身繕いまたは洗顔回数の減少がみられ, 無影響量 (NOEL) を観察することができなかった。ただし, 実験動物におけるオープンフィールド試験の結果の解釈については, 各測定指標の意味づけや評価方法も確定的なものとはいえず, ヒトへの外挿は極めて難しいものと考えられる。したがって, 本試験結果の解釈には十分な留意が必要であると判断される。その他の胚の発生および出生児の成長, 生後の形態的発育および分化, 各種の反射および反応, ローターロッド試験, Beil 型水迷路学習試験, 交尾および受胎能ならびに剖検の各検査では DPAA 投与の影響は認められなかった。

B-3 試験において無影響量 (NOEL) を求めることが出来なかったため, 出生児のラット出生前後の発生・母体への投与試験 (低用量追加試験) (B-4) を行った。B-4 では, 出生児の 4 週齢のオープンフィールド試験において, 0.1 mg/kg/day の雌の立ち上がり回数の減少がみら

れた。先に実施された高用量の試験 (B-3) では、4~5 週齢の 0.1 mg/kg 群以上の全群の雄で立ち上がり回数および身繕いまたは洗顔回数の有意な減少、8~9 週齢での検査では 0.3 および 1 mg/kg の雄、0.1 および 0.3 mg/kg 群の雌で立ち上がり回数の有意な減少が認められた。また、有意ではなかったものの、行動潜時の延長傾向が、0.1 mg/kg 群以上の全群の雌雄で観察された。これら 2 つの試験 (B-3 および B-4) のオープンフィールド試験共通の結果として、0.1 mg/kg/day 以上で DPAA の次世代の行動への影響が認められたことから、0.03 mg/kg/day が無影響量 (NOEL) と考えられた。

ラット新生児に経口投与した毒性試験 (A-3) において、生後 4 日 (ヒトでは出生前後に相当すると考えられる) から 0.1, 0.3 および 1.0 mg/kg/day の用量で 28 日間反復投与した結果、無影響量 (NOEL) は雄で 0.1 mg/kg/day, 雌で 0.3 mg/kg/day であった。また、程度差はあるものの投与開始時の週齢が 5 週齢のラット (A-1, NOEL: 雌雄とも 0.3 mg/kg/day) とほぼ同様の毒性変化が認められた。投与開始時の週齢が異なる両試験 (A-1 および A-3) の NOEL はほぼ同等であり、DPAA は若齢動物に対して特別に強い毒性作用を有するとは考えられなかった。なお、前述のように新生児ラットでは腎臓からの排泄機能が未熟 (D-7) と考えられることから、体内への残留傾向が高まり、毒性作用も強く発現することが予想された。しかし、結果はほぼ同等の毒性作用であった。詳細は不明ながら、新生児ラットを用いた毒性試験では、生後 32 日に解剖検査が実施されたことから、腎糸球体の形成後 (生後 8~14 日) に DPAA が排泄され、その間に毒性作用が軽減された可能性がある。

6.4 DPAA の遺伝毒性

遺伝毒性スクリーニング試験として、復帰突然変異試験 (C-1)、染色体異常試験 (C-2) および小核試験 (C-3) を実施した。結果は、復帰突然変異試験および小核試験で陰性、染色体異常試験で陽性であった。染色体試験における、染色体構造異常誘発の D_{20} 値は、短時間処理法 S9 mix 非共存下で 0.93 mg/mL, 短時間処理法 S9 mix 共存下で 0.99 mg/mL (本試験), 0.92 mg/mL (確認試験), 連続処理法 24 時間処理で 0.11 mg/mL であった。また、短時間処理法 S9 mix 共存下では、用量依存性の無い数値的異常誘発も認められた。この結果から、DPAA は *in vitro* 培養細胞に対して、染色体異常を誘発するポテンシャルを有していることが示された。ただし、*in vivo* における染色体異常誘発性検出系である小核試験では、染色体異常誘発性は確認されなかった。

6.5 DPAA 関連物質 (PMAA および MPAA) の毒性

PMAA を 0.12, 0.3, 1.2 および 5.0 mg/kg/day の用量でラットに 28 日間反復経口投与 (A-5) した結果、いずれの用量でも死亡例は発現しなかった。同じ用量で同じ期間、DPAA を投与 (A-1) した結果、雄 2/10 例、雌 6/10 例が死亡したことから考えると、PMAA は DPAA と比較し、反復投与による致死作用は弱いものと考えられる。また、その他の検査でも総じて PMAA の毒性作用は弱く、DPAA の無影響量 (NOEL) が 0.3 mg/kg/day であったのに対し、PMAA の NOEL は 1.2 mg/kg/day であった。病理組織学的検査において DPAA と同じ肝臓の胆管増生およびグリソン鞘における炎症性細胞浸潤が認められたことから、生体への作用機序

としては DPAA と類似しているものの、PMAA の毒性作用は DPAA より弱いものと考えられる。

同じく DPAA の関連物質である MPAA を 2, 5 および 15 mg/kg/day の用量でラットに 28 日間反復経口投与 (A-6) した結果, MPAA の NOEL は 5 mg/kg/day であった。MPAA 投与により DPAA 投与時に発現した振戦, 赤血球系パラメータの低値, 尿素窒素および総ビリルビンの高値, 肝臓の胆管増生, グリソン鞘における炎症性細胞浸潤および肉芽腫性炎が 15 mg/kg/day の用量で認められたことから, 生体への作用機序としては DPAA と類似しているものの, MPAA の毒性作用は DPAA より弱いものと考えられる。