

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、脳中放射能濃度は、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。