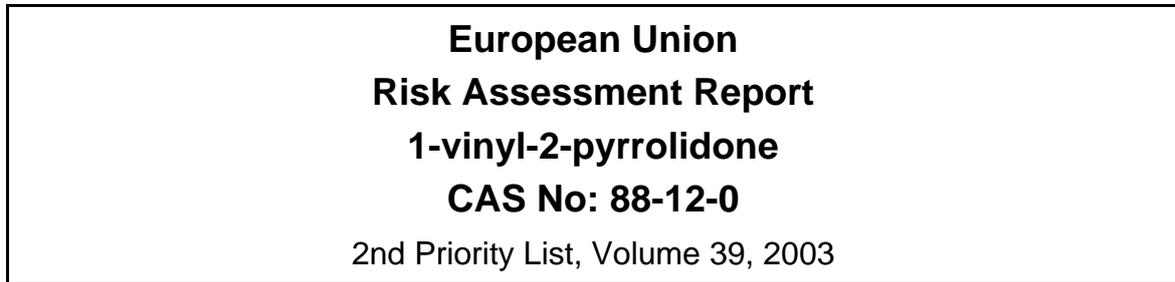
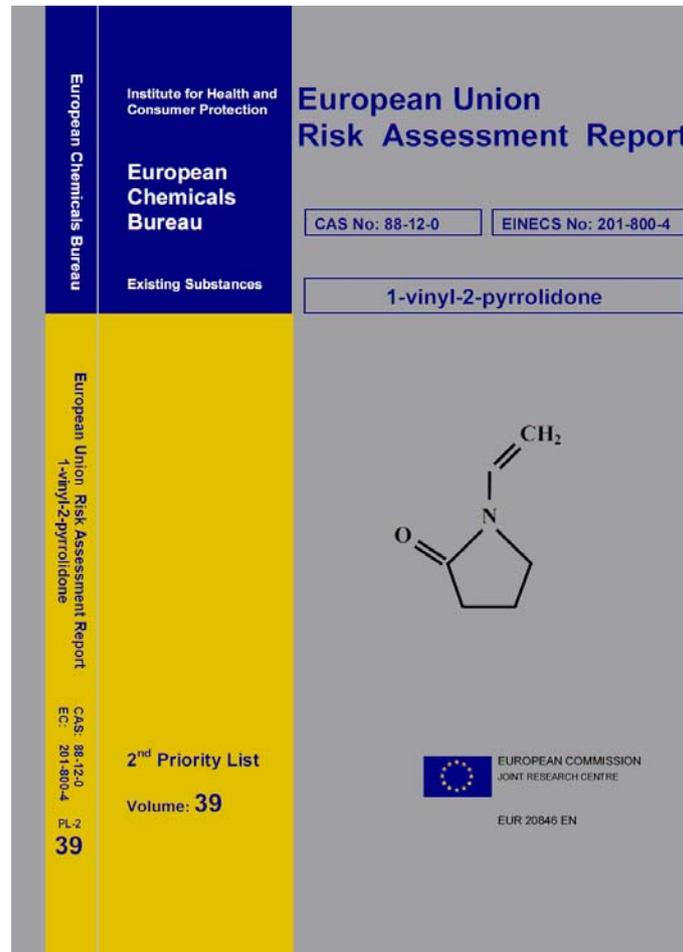


部分翻訳



欧州連合
リスク評価書 (Volume 39, 2003)
1-ビニル-2-ピロリドン



国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部
2012年3月

本部分訳文書は、1-vinyl-2-pyrrolidoneに関する EU Risk Assessment Report の第4章「ヒト健康」のうち、第 4.1.2 項「影響評価：有害性の特定および用量反応関係」を翻訳したものである。原文（評価書全文）は、

http://esis.jrc.ec.europa.eu/doc/existing-chemicals/risk_assessment/REPORT/vinylpyrrolidone040.pdf

を参照のこと。

4.1.2 影響評価：有害性の特定および用量（濃度）－反応（影響）評価

1-ビニル-2-ピロリドン（N-ビニルピロリドン；N-VP）の毒性は、動物モデルを用いて詳しく調べられている。安定剤ケロビット（Kerobit, N,N'-ジ-2-ブチル-p-フェニレンジアミン, CAS 101-96-2）が添加された N-VP を使用した吸入毒性試験が相当数あるが、その濃度は低い（最高 10 ppm）ため、Kerobit を含む場合と含まない場合とで N-VP の毒性を比較した試験の結果はほぼ同等であった。通常、Kerobit が含まれているからといって試験結果の評価に影響するとは考えられない。

4.1.2.1 トキシコキネティクス、代謝、および分布

N-VP の動態は詳細に研究されているが、詳細さの程度は曝露経路により異なる。さらに代謝については、ラットを用いた N-VP の静脈内投与試験で検討されており、DNA が N-VP により *in vitro* でどの程度アルキル化されるか、また血漿蛋白質が *in vitro* および *in vivo* でどの程度アルキル化されるかについて検討するための試験が始められている。

N-VP の注目すべき特徴の一つは、胃内のような酸性条件下で容易に加水分解されるということである。Hawi ら（1987）は 37°C、pH 1.2～7.2 における N-VP の加水分解について研究し、加水分解速度が pH に逆比例することを見いだした。つまり、N-VP の水溶液中での半減期は pH 1.2 でわずか約 1.5 分、pH 2.2～2.5 で 20～40 分であったが、pH 3.5 で 6 時間超に延び、pH 7.2 では水溶液中で 24 時間以上安定であった。N-VP の飲水投与試験の中で、N-VP は飲料水中で 4 日間以上安定であることが示されている（BASE, 1986d）。Hawi ら（1987）は、¹⁴C-ビニル標識 N-VP の加水分解産物の同定を行った。主要な加水分解産物は 2-ピロリドンとアセトアルデヒド（水和物）で約 95%を占め、アセトアルデヒド半水和物が残りの 5%を占めていた。

N-VP が自然発生的な重合を起こすことも知られているが、生理的条件下でこの現象が起

くるかどうかについての情報は得られていない。

4.1.2.1.1 動物における試験

吸入曝露

イヌ 2 匹が濃度 0.69、5.5、24、62 mg/m³ の N-VP 蒸気の連続 6 時間にわたる全身曝露に供され、吸入後の血漿中 N-VP 濃度が簡略に調べられた (BASF, 1992a)。動物は最低用量から始めて、7 日ごとに曝露を受けた。曝露中にイヌが被毛をなめないようにするための対策は取られなかったようである。2 匹のイヌの血漿中 N-VP 濃度にはかなりの差がみられたが、血漿中濃度は曝露濃度の上昇に伴って上昇した。その結果から、N-VP は気道から吸収されることが示されたが、動物数が少ないうえに個体差が大きく、また経口経路の吸収が血漿中 N-VP 濃度に影響した可能性があることを考慮に入れると、定量的な結論を導くことはできない。

経口投与

N-VP のバイオアベイラビリティおよび組織分布、ならびに代謝物を測定するためにさらに詳細な試験が行われた。その試験では雄のラットおよび雌のイヌに N-VP 水溶液（純度は記載なし）が経口投与された (Digenis, 1990)。血清中 N-VP 濃度定量には HPLC/UV 法が用いられた（検出限界は 0.05 mg/L、定量下限値は 0.2 mg/L）。

ラットでは、単回および反復投与試験が実施された。初めに、各群 5 または 7 匹の絶食下のラットに水溶液が 0.5 または 5 mg/kg の用量で単回強制経口投与された。また、別の非絶食下のラット 5 匹に 5 mg/kg の用量で単回強制経口投与された。最後に、別の非絶食下のラット 5 匹に 0.5 mg/kg の用量で 1 日 2 回、12 時間間隔で 6 日間投与された。各例において、採血は、投与直前および投与から 0.5、1、2、3、4、5、7 時間後に行われた。反復投与試験では、上記の時点と最終投与の 12 時間後に採血が行われた。

絶食下のラットでは、N-VP の最高血漿中濃度到達時間は、用量に関係なく 0.5～3 時間であり、最高血中濃度は用量に正比例していた。同様に、血漿中濃度—時間曲線下面積も用量に正比例していた。血漿からの消失はほぼ直線的に推移し、半減期は両用量で 3～4 時間であった。両用量ともに投与 7 時間後でも N-VP が検出された。この試験条件下では、絶対的バイオアベイラビリティはいずれの用量でも約 80%であった。以上のように、N-VP は消化管から速やかに効率よく吸収される。

しかし、非絶食下のラットについて動態パラメータを分析したところ、最高血漿中濃度到達時間は約 0.5 時間と短いものであったが、最高血漿中濃度は絶食下のラットにおける最高測定濃度の約半分であった。さらに、血漿中濃度-時間曲線下面積は小さく、絶対的バイオアベイラビリティは投与量の 26%という低値であった。絶対的バイオアベイラビリティが低値であった理由は不明であるが、胃内に飼料があることにより胃内容物排出時間が延び、その結果、吸収前に加水分解を受けるか、または重合した化合物の割合が増加した（ラット胃内の pH は約 3~5 と考えられる）ことが考えられる。非絶食下のラットの反復投与試験では、単回投与時の動態パラメータに極めて類似した動態パラメータが得られた。このことは、N-VP に生体蓄積性がなく、親化合物 N-VP の血漿からの消失を促進する酵素の誘導はないことを示している。

また、この一連の試験では、絶食下のラットに約 1 mg/kg の ^{14}C -N-VP が投与され、組織分布が検討された。2、5 または 7 時間後に、各群ラット 3 匹が屠殺され、多数の器官で放射能が測定された。尿、糞便、呼気は分析されなかった。2、5、7 時間後に測定された放射能は、投与放射能のそれぞれ 52、22、30%であった。すべての組織で放射能が検出された。一般的にどの測定時点でも、ほとんどの組織で投与放射能の 1%未満の放射能が検出され、それぞれの組織内に含まれる割合はほとんど一定レベルのままであった。例外として目立ったのは肝臓であり、2 時間後に投与放射能の 3.4%であったものが 7 時間後では 10.4%まで上昇するという、時間依存的な変化がみられた。全血、血漿、腎臓、小腸、膵臓でも高レベルの放射能が検出された。精巣でも低レベルが検出された。こうした結果から、 ^{14}C -N-VP 由来の放射能が体内で広範に分布することが示された。しかし、上記の割合が、親化合物 N-VP、代謝化合物、または内因性炭素プールに入った ^{14}C のいずれを表わしているのかは不明である。

また、N-VP 水溶液が絶食下のイヌ 3 匹に 5、10、20 mg/kg の連続的用量で、また非絶食下のイヌ（一晚絶食、その後投与の 30 分前に飼料が与えられた）に 20 mg/kg の用量で経鼻胃管により投与された。これらのイヌは静脈内投与後（下記参照）の動態測定にも使用されているが、どの試験が最初に実施されたかが不明であり、両投与間の休薬期間の長さも不明である。採血は、投与後 0、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、および 4 時間後に行われた。さらに、各イヌは、N-VP の投与と同時に 50 μCi Tc99m-DTPA（テクネチウム-99m-ジエチレントリアミン五酢酸）も経口投与され、胃内容物排出の経時変化の追跡のためにガンマシンチレーションカメラのヘッドの下に 1 時間以上置かれた。5 または 20 mg/kg 投与群のイヌでは N-VP の血漿蛋白結合率も測定されたが、この測定のための採血がいつ行われたかは不明である。

ラットの状況とは対照的に、投与前の摂餌は、N-VP の吸収や血漿からの消失動態に影響しないようであった。N-VP の最高血漿中濃度到達時間は 0.25~0.75 時間であった。最高

血漿中濃度はおおむね用量の増加とともに上昇したが、個体差が大きかった。胃内容物排出プロファイルと比較したところ、血漿中 N-VP 濃度と胃内容物排出時間の間には良好な相関がみられた。血漿蛋白結合率は低用量および高用量でそれぞれ約 13%および 10%と考えられた。血漿中濃度－時間曲線下面積は用量に正比例していたが、用量に対する曲線下面積を示すグラフが原点を通過しないことから、親化合物 N-VP は、一定の経口用量レベル未満では循環血流に到達しない可能性があると考えられた。これは、投与量の一部が吸収前に加水分解や重合を起こしたことを意味するものである（イヌの胃内の pH はヒトとほぼ同程度と考えられている）。血漿からの消失は指数関数的な推移を示し、半減期は 0.3～0.6 時間で用量非依存的であった。低用量で非絶食下のイヌでは、投与 5 時間後の血漿中 N-VP は検出限界未満であった。絶食下のイヌの高用量側 2 群では、投与 5 時間後でも 3 例中 1 例で N-VP が検出された。絶食下のイヌにおける絶対的バイオアベイラビリティは、それぞれのイヌで約 29、69、89%であった。用量の低下に伴いバイオアベイラビリティが低下したのは、一つには、低用量では投与量のうち吸収前に加水分解や重合を起こす割合が上昇するためである。20 mg/kg N-VP を投与された非絶食下のイヌの絶対的バイオアベイラビリティは約 92%であった。摂餌による胃内容物排出の抑制がわずかにみられたが、予想されたようなバイオアベイラビリティの低下はみられなかった。なぜそのようになるのか理由は分からないが、飼料があると胃内容物の pH が上昇し、N-VP の加水分解や重合が阻害されるのかもしれない。以上の結果より、N-VP の消化管からの吸収は良好であることが確認された。

簡略化された試験において、絶食下のビーグル犬 2 匹に N-VP 水溶液が 5 mg/kg の用量で強制経口投与され、血漿中濃度が測定された (BASF, 1992a)。血中 N-VP 濃度は、イヌに 5 mg/kg を投与した先の試験の場合とほぼ同程度であった。

経皮投与

経皮吸収の動態は、イヌを用いた限定的な試験で簡便法にて検討されている (BASF, 1992a)。吸入曝露および経口投与動態試験で使用されたのと同じイヌが用いられ、未希釈 N-VP が 25 cm² の面積の剃毛皮膚に 5 mg/kg の用量で塗布されたあと、半閉塞包帯で被覆された。採血は、適用直前および適用から 0.5、1、2、4、6 時間後に行われた。

すべての採血時点で N-VP が検出されたが、定量下限値 (0.1 mg/L) 未満であった。総回収率の測定は行われなかった。このことから、液剤中の N-VP は皮膚を透過することが示されたが、5 mg/kg を経口投与されたイヌで得られた約 1 mg/L という最高血漿中濃度 (Digenis, 1990) と比較すると、この試験条件下では経皮吸収が比較的低いことが示唆された。使用された用量が低く、総回収率に関する情報が欠如していることを考慮すると、

経皮投与時のバイオアベイラビリティ (%) を求めることはできない。しかし、N-VP の物理化学的性質 (水およびほとんどの有機溶媒に易溶性で $\log Pow$ が約 0.4) を考慮し、構造的に類似した N-メチル-2-ピロリドンと比較すると、N-VP の経皮吸収は良好であると推測される。このことは、急性経皮毒性試験の所見で裏づけられている。LD₅₀ はウサギで 560 mg/kg であり、1,043 mg/kg を経皮投与されたラットの 4 例中 1 例が死亡している。経口 LD₅₀ は約 1,000 mg/kg であった (詳細はセクション 4.1.2.2.1 を参照のこと)。

その他

静脈内投与時の N-VP の分布と代謝を検討するために、雄ラットを用いた一連の詳細な試験が行われた (Digenis and MacClanahan, 1982; MacClanahan et al., 1983; 1984)。各試験において、麻酔下のラットに ¹⁴C(ビニル)-N-VP 水溶液が頸静脈から投与された。

まず、各群 3 匹のラットに 1.1 mg/kg が単回投与され、投与 6 時間後まで短い間隔において採血が行われた。次いで屠殺後に膀胱穿刺により採尿され、主要な器官が摘出された。血中および尿中における総放射能と親化合物 N-VP の濃度が測定された。主要な器官については、総放射能のみが測定された。放射能標識体の分布は、1.1 mg/kg を投与されたラット 1 匹または 3 匹のサテライト群を用いてより詳細に検討された。それらのラットは 15、30、90 分後に屠殺され、多数の組織の総放射能レベルが測定された。

¹⁴C(ビニル)-N-VP 未変化体の血漿中濃度は急速に低下し、静注 10 分後では投与量の約 6% であり、静注 6 時間後では投与量の 0.5% となった。血中からの消失は二相性の推移を示し、緩徐相での半減期は約 1.5~1.9 時間と算出された。この半減期は、先の経口投与試験およびそのほかの静脈内投与試験の算出値より幾分長い。屠殺時に採取された尿から投与放射能の約 40~65% が検出され、N-VP 未変化体はそのうちの 0.2% 未満であったことから、N-VP は効率よく代謝され、代謝物は速やかに排泄されることが示唆された。先の経口投与試験の場合と同様に、放射能がすべての主要器官に分布しているのが観察された。

尿中代謝物の特性に関するより詳細な検討が別の試験で実施された。各群 2 または 4 匹のラットに約 0.3、0.5、0.8、1.3 mg/kg が投与された。次いで代謝ケージで個別に最長 6 日間飼育され、尿、糞便、呼気が採取された。尿は総放射能濃度測定のために分析され、特定の尿試料が親化合物である N-VP の濃度測定のため、または尿中代謝物の化学特性を同定するために分析された。糞便の分析は総放射能に関してのみ行われ、特定の群から採取した呼気中の ¹⁴CO₂ 濃度が分析された。さらに、投与から 42 および 145 時間後に一部の動物から大網脂肪が採取され、¹⁴C 標識 2 炭素フラグメントが脂質合成に利用されるかどうか調べられた。

放射能の大部分（投与量の 70～90%）が最初の 18 時間で尿中に排泄され、その約 60%が最初の 6 時間で排泄された。投与後の最初の 12 時間で N-VP 未変化体として尿中に排泄されたのは投与量の 0.6%にすぎなかったことから、N-VP は効率よく代謝され、その代謝物が速やかに排泄されることが確認された。化学分析により N-VP の尿中代謝物は極性の高い物質であることが分かった。尿中代謝物の約 89%が酸性化学種であり、そのうち 12%が酢酸であった。残りの代謝物のほとんどが中性化学種であり、約 1.7%というわずかな分画が塩基性化学種として同定された。

第 1 日目の糞便中排泄量は投与量の 1～8%で、投与量の 1～3%が $^{14}\text{CO}_2$ として排気された。その後の尿、糞便、呼気の試料からは、概して投与量の 1%未満が回収された。脂肪組織の 2 試料からは放射能がほとんど回収されなかった（投与量のそれぞれ 0.02%および 0.09%）ことから、N-VP から生成する 2 炭素フラグメントが内因性脂肪酸に取り込まれることはほとんどないということが示唆された。

最後に、ラット 2 匹または 4 匹に約 1.1 mg/kg が投与され、胆汁が投与後 6 時間まで、間隔を置いて採取された。胆汁の分析の結果、投与放射能の 19%（そのうち約 0.5%が N-VP 未変化体であった）が胆汁経路で排泄されることが分かった。この用量で投与 12 時間までの糞便からの回収率が 0.4%にすぎないことを考慮すると、N-VP の胆汁中代謝物はかなりの割合で腸肝再循環することが示された。

N-[^{14}C -ビニル]-2-ピロリドン（側鎖が標識されている）が[4- ^3H]-N-ビニル-2-ピロリドン（環状部が標識されている）とともに、雄ラットに単回静脈内投与された（MacClanahan et al., 1987）。3 試験が別々に実施された。最初の試験では、ラット 4 匹に放射能標識された N-VP（総投与量約 6 mg/kg）が投与され、尿および糞便採取のために代謝ケージで 6 日間飼育された。すべての試料の総 ^{14}C および ^3H 放射活性が分析された。さらに、6 および 12 時間尿について ^{14}C または ^3H 標識 N-VP 未変化体の濃度が測定された。尿試料は、さらに N-VP の代謝物を確認するために、放射能検出 HPLC でも分析された。

^{14}C および ^3H に関する尿中排泄プロファイルと糞便中排泄プロファイルはよく似ていた。最初の 12 時間の尿中回収率は、いずれの標識体でも約 68%であり、そのうち N-VP 未変化体はいずれの標識体でも 0.3%未満であった。同じ期間で投与量の約 0.2%が糞便に排泄された。どちらの標識体でも 2 日目までに計約 90%が尿から回収され、その後にその経路から排泄された N-VP はほとんどなく、6 日目までに糞便に排泄された標識体はいずれの場合でも約 5～8%であった。この結果は、 ^{14}C -N-VP のみで先に得られた結果とよく一致している。尿試料の分析がさらに詳細に行われ、 ^{14}C および ^3H を含む 2 種の主要な代謝物が存在すること、それらが投与量のそれぞれ 50 および 33%を占めることが明らかになった。主要代謝物のいずれも構造の決定はできなかった。少量の代謝物については、まず、

N-ビニルスクシンイミド、2-ピロリドンおよび N-アセチル- γ -アミノ酪酸 (N-アセチル-GABA) が確認され、投与量に対する割合はそれぞれ約 5%、が約 6%および約 5.6%であった。しかし、別の少量の代謝物 2 種については、それぞれ ^{14}C 標識代謝物の約 5%、 ^3H 標識代謝物の約 2.2%を占めることが分かったが、同定することはできなかった。

2 番目の試験では、胆管カニューレを挿入したラット 5 匹に放射能標識 N-VP (総投与量約 5.2 mg/kg) が投与された。胆汁が 6 時間後まで、間隔を置いて採取され、前と同じように ^{14}C および ^3H の総放射活性ならびに ^{14}C および ^3H -N-VP 未変化体が分析された。両標識体ともに約 24%が 6 時間で胆汁中に排泄されたが、そのうち N-VP 未変化体は 0.9%にすぎなかった。

最後の試験では、ラット 3 匹を用いて ^{14}C および ^3H の分布が検討された。ラットには総計で約 4.4 mg/kg の N-VP が投与され、6 時間後に屠殺された。器官の検査では両標識体の分布に有意差はみられなかった。

インバレスクリサーチインターナショナル (IRI, 英国) (1985) は、各群雄 3 匹の CD ラットを用いて N-VP とその代謝物の DNA や蛋白質に対する結合能を調べた。ラットには N-ビニル[α,β - ^{14}C]-2-ピロリドン (ビニル基標識) 水溶液または N-ビニル-2-ピロリドン[5- ^{14}C] (環状部標識) 水溶液が 150 または 300 mg/kg の用量で単回または反復で腹腔内投与された。その結果、いずれの投与レジメでも肝 DNA、RNA、蛋白質に対する放射能標識体の結合は認められなかった。

In vitro 試験

N-VP の血漿蛋白質 (Yamakita et al., 1992) またはミクロソーム蛋白質 (MacClanahan et al., 1983) への結合能が *in vitro* で、簡便法にて検討された。N-VP または代謝物の蛋白結合率は最大で 12%であったことから、N-VP がアルキル化能を有する化学種へと代謝されることはないと考えられる。

4.1.2.1.2 ヒトにおける試験

ヒトにおける N-VP のトキシコキネティクスに関する有用な情報は得られていない。

4.1.2.1.3 トキシコキネティクス、代謝、分布の要約

ヒトにおける N-VP のトキシコキネティクスに関する有用な情報は得られていない。動物に関していえば、N-VP のトキシコキネティクスはラットを用いて詳細に検討されている。イヌに関する情報もある。N-VP は経口および吸入経路で速やかに効率よく吸収され、物理化学的特性からは高い皮膚透過性も示唆される。親化合物 N-VP の経口バイオアベイラビリティが、胃内での加水分解や重合により抑制される可能性があることが示された。ラットでは N-VP の血漿中半減期は約 3 時間であったが、イヌではわずか 20~40 分であった。このような種差がみられた理由は不明である。代謝試験が行われたのはラットでのみであった。この動物種では N-VP は効率よく代謝されて極性の高い化合物が生成され、主に尿経路を通じて速やかに排泄された。しかし、N-VP の尿中主要代謝物 2 種についての特性は解明されていない。ほかの排泄経路には糞便（胆汁経由）、呼気中 CO₂ があり、投与量のそれぞれ 5~8% および 3% を占める。N-VP とその代謝物の血漿蛋白質や DNA に対する結合率は高くはない。

4.1.2.2 急性毒性

4.1.2.2.1 動物における試験

吸入曝露

N-VP のエアロゾルまたは蒸気を用いた単回曝露試験が実施されている。Sprague-Dawley ラットの各群雌雄各 10 匹を約 800、2000、2,800、5,200、5,600 mg/m³ の N-VP（純度 > 99%、安定化剤として Kerobit を 10 ppm 添加、粒子径の記載なし）エアロゾルに頭部曝露した試験では、4 時間 LC₅₀ 値として 3,070 mg/m³（3.07 mg/L）が得られている（BASF, 1979b）。ラットは曝露後 14 日間観察され、試験の最後に肉眼病理検査が行われた。最低用量を除く全群で曝露後 2~4 日以内に死亡例が発生し、すべての用量群で呼吸数増加、運動失調、昏睡、眼の充血、鼻汁などの毒性徴候がみられた。剖検で変化がみられたのは死亡例のみであった。肺では、点在する浮腫領域が記録され、心臓では急性充血性閉塞および心臓四腔の急性拡張がみられた。肝臓は砂のような灰色の様相を呈していた。胃では多発性の出血性潰瘍が認められた。腸内容物に血液がみられたことから、消化管刺激性が示唆された。腎臓の変色もみられた。こうした変化の程度についての説明はなかった。

かなり以前に実施された試験で、ネコ、ウサギ、モルモット、ラットおよびマウス、またはラットのみが N-VP 蒸気で飽和した空気に 6 または 8 時間曝露されたが、死亡例はなか

った (BASF, 1941; 1963b; c; 1964a)。曝露時の毒性徴候は流涎と鼻汁のみであり、剖検では粘膜の軽微な刺激反応が散見された。蒸気圧が 0.12 hPa と報告されているので、飽和蒸気濃度は 0.6 mg/L (600 mg/m³) とと思われる。

ラットおよびマウス (それぞれ各群 2 匹) を 0、23、69、207 mg/m³ の N-VP 蒸気に連続する 2 日間に 6 時間全身曝露する試験も行われ、動物は 2 日目の曝露直後に屠殺された (BASF, 1988d)。死亡例はなかった。最高用量群では、両動物種ともに毎回の曝露後に呼吸が乱れ、一般状態は不良のようにみえた。血液検査では、最高用量群のラットにおいて、総蛋白の明瞭な低下 (対照値の 84%) およびアルカリホスファターゼ活性の亢進 (対照値の 114%) がみられた。この用量群では、肝ホモジネート中グルタチオン濃度が対照値の 145% に上昇した。病理組織学検査は、肝臓に限定して行われた。最も重篤な変化はラットでみとめられた。最高用量群動物では、中等度で全般的な小葉中心性脂肪変性、小葉中心性類壊死 (実際の壊死に達していない退行性変化)、孤立性肝細胞壊死がみられた。肝細胞には、核内の有糸分裂異常領域、核壁の過染色性化、核の多型化、核質の淡色化などの変化を示すものも認められた。69 mg/m³ 曝露群のラットでは、軽微な小葉中心性脂肪変性および核における有糸分裂頻度の増加もみられた。207 mg/m³ 曝露群のマウスでは、小葉中心性脂肪化による肝臓の黄灰色化がみられた。毒性徴候は、69 mg/m³ 群のマウスではみられず、23 mg/m³ 群ではいずれの動物種にもみられなかった。

以上の結果から、N-VP 蒸気により、かなり低用量でも 2 日間の曝露だけで肝臓に変化が誘発されることが示されたが、単回の高用量曝露の生存例では変化がみられなかったことから、こうした変化は回復可能なものであることが示唆された。

経口投与

N-VP の単回経口投与の効果を評価するために数件の試験が行われたが、大半は簡単に報告されているだけである。CFY ラット各群雌雄各 2 匹に N-VP (純度の記載なし) 水溶液を 0、834、1,314、2,085 mg/kg の用量で強制経口投与した試験において、LD₅₀ 値は 834 ~ 1,314 mg/kg であった (HRC, 1978a)。中間および高用量群では投与から 2 日目までに死亡例が発生し、高用量群では投与から 1 時間もたたないうちに 3 例が昏睡状態になった。すべての被験物質投与群で投与直後から立毛、嗜眠、呼吸数減少、円背姿勢、流涎増加、よろめき歩行、蒼白化などの毒性徴候がみられた。高用量側では流涎、眼瞼下垂、多尿、運動失調、正向反射の消失がみられた。死亡例を解剖したところ、肺でうっ血および出血、ならびに肝臓、腎臓および脾臓で褪色化がみられた。生存例では投与から 6 日目までに回復がみられ、14 日間観察期間の体重増加量は低用量群の 1 例を除いて正常であった。剖検では、生存例に異常はみられなかった。

ラットで得られたそのほかの LD₅₀ 値は 1,043、1,022、1,700、2,500 mg/kg であった (BASF, 1953; 1955; 1963b; c)。投与溶媒は、記載のある場合には蒸留水であった。群当たりの動物数、用量、死亡日時の記載はなかった。死亡例ではよろめき歩行、虚脱、呼吸窮迫などの毒性徴候がみられた。剖検では胃粘膜に刺激反応がみられ、さらに出血性腸炎ならびに肝臓および腎臓の軽微な損傷 (詳細は明記されていない) を呈する動物もみられた。

Swiss マウス各群雌雄各 10 匹に N-VP を 420、630、940、1,400 mg/kg の用量で強制経口投与し、10 日間経過観察した試験では、マウスの LD₅₀ は 940 mg/kg と決定された (Schwach; Hofer 1978)。全用量群で死亡例がみられ、そのすべてが投与から 3 日以内に発生した。全用量群で、程度に用量相関性のある毒性徴候がみられた。その内訳は、投与直後における円背姿勢を伴う痙攣性の攣縮、運動失調などであり、数時間後に継続的な振戦に進行した。四肢は青ざめて眼は眼瞼が部分的または完全に閉じて反応が鈍く、鼻の周囲の被毛にはつやがなく、乱れて逆立っていた。高用量側 2 群では、こうした徴候は 1 週間にわたり持続したが、低用量側では 3 日目までに消失した。最終日には毒性徴候はみられなかった。病理組織検査は実施されなかった。

N-VP (純度の記載なし) 水溶液の単回強制経口投与による影響は、モルモット、ネコ、ウサギでも検討されている (BASF, 1946b)。モルモットでは、520 mg/kg を投与された 4 例中の 1 例が死亡した。すべての動物で食欲不振、無関心、軽微な弛緩がみられ、1 例が 3 日後に腸炎を発症した。各群 3 匹のウサギに 417 または 1,043 mg/kg が投与されたが、死亡例はなかった。両群ともに軽微な体重減少および食欲不振が記録された。各群 2 匹のネコに、N-VP が 100、210、520 mg/kg の用量で投与された。最高用量群の 1 例が投与 3 日後に死亡した。すべての用量群で流涎および嘔吐が認められ、最高用量群ではそれに付随して食欲不振、軽微な体重減少、平衡感覚の欠如がみられ、生存例が曝露 28 日後に屠殺されるまでそれが持続した。

経皮投与

N-VP の単回経皮曝露による影響について、ラット、ウサギ、モルモットを用いて検討された。ラットを用いた試験の結果、経皮 LD₅₀ は 1,043~4,127 mg/kg であった (HRC, 1978b)。各群雌雄各 2 匹の CFY ラットに、N-VP が 0、668、1,043、4,127、10,430 mg/kg の用量で体表面積の約 10%の領域にわたって塗布され、閉塞包帯で 24 時間被覆された。適用部位に刺激反応は認められなかった。投与から 3 日もしないうちに低用量群以外の全群で死亡例が発生し、1,043 mg/kg 以上の用量群のすべてのラットで非特異的な毒性徴候がみられた。最低用量群における毒性徴候としては、雄 2 例で軽微な下痢がみられ

ただけであった。死亡例を解剖したところ、肺のうっ血、ならびに肝臓、腎臓、脾臓の褪色がみられ、適用部位では皮下組織にかけての充血がみられた。被験物質投与群のラットでは観察期間の最初の週で体重増加の抑制が観察されたが、第 2 週では正常であった。剖検では生存例に異常はみられなかった。

古い試験では、ラット 3 匹が、約 2,000 mg/匹の N-VP に皮膚を特殊なチャンバーにより 4 時間接触状態とされ、全例が死亡した (BASF, 1953)。死亡は曝露後 4 時間もたないうちに発生した。無関心、呼吸窮迫、虚脱、「重度」の皮膚刺激反応などの毒性徴候がみられた。病理組織学検査は実施されなかった。

皮膚感作性試験のための用量設定用予備試験において、雌モルモット 4 匹の側腹部に N-VP (純度 99.7%) が、無希釈ないしは 75、50、25%蒸留水希釈液で 0.5 mL 塗布され、6 時間閉塞包帯で被覆された (BASF, 1996)。動物への総投与量は約 3,000~5,000 mg/kg と推定される。この用量では重度の全身性毒性徴候が発現し、2 匹が死亡した。皮膚刺激反応はみられなかった。

各群 5 匹のウサギの無処置皮膚に 200、375、800、1,000、2,000 mg/kg が適用された試験では、経皮 LD₅₀は 560 mg/kg と推定された (FDRL, 1975)。曝露条件についての記載はない。最低用量群以外の全群で曝露から 5 日目までに死亡例が発生し、高用量側 2 群では全例が死亡した。適用皮膚局部への影響や全身毒性に関する情報は記載されていない。

各群雌雄各 5 匹の Viennese 白色ウサギの背部皮膚に、安定剤として 10 ppm の Kerobit を含む無希釈の N-VP が 400 mg/kg の用量で単回適用された試験では死亡例はみられなかった (BASF, 1979c)。閉塞包帯により 24 時間適用され、観察期間は曝露後 8 日間であった。観察された毒性徴候は軽微な無関心のみであった。局所刺激性はみられず、剖検では異常はみられなかった。

かなり以前に実施された複数の試験では、N-VP を含ませた脱脂綿の耳栓がウサギに付けられた。1,200~3,000 mg/kg が 20 時間適用されたウサギでは死亡例がみられた (BASF, 1953; 1963b; c)。全身毒性の発現はなかったようであるが、ある試験では強度の皮膚刺激性が報告された。この方法で N-VP への曝露を 16 時間受けたウサギでは、限局性の水疱形成もみられた (BASF, 1941)。

4.1.2.2.2 ヒトにおける試験

ヒトに対する N-VP 単回曝露の影響については調べられていない。古い報告書において、

未知濃度の N-VP 蒸気を吸入した作業員が「気絶および疲労」を来たしたという簡潔な説明が付けられている (BASF, 1941)。

4.1.2.2.3 急性毒性の要約

ヒトにおける N-VP 単回曝露急性毒性の臨床所見については情報が得られていない。実験動物のうちラットでは、N-VP エアロゾルに関する 4 時間 LC₅₀ 値が 3,070 mg/m³ とされた。様々な動物種を 0.6 mg/L の N-VP 蒸気に曝露したところ、多少の局所刺激反応が生じたが死亡例はなかった。ラットおよびマウスにおける経口投与の LD₅₀ 値は約 1,000 mg/kg であった。ウサギにおける経皮 LD₅₀ 値は 560 mg/kg と報告された。ラットでは約 1,000 mg/kg の用量で死亡がみられたことから、ラットにおける LD₅₀ 値も 2,000 mg/kg 未満である可能性があることが示された。病理学的変化がみられたのは死亡例のみであった。3 種類の曝露経路のすべてで肝臓および腎臓が標的器官と確認され、多くの例で、消化管または気道の内面の粘膜に、経口または吸入曝露による刺激反応がみられた。

4.1.2.3 刺激性

4.1.2.3.1 動物における試験

皮膚

ドレイズ試験では、ニュージーランド白色ウサギ 6 匹の無処置皮膚または擦過皮膚に 520 mg の N-VP (純度および安定剤添加についての記載なし) が適用され、閉塞包帯で被覆後、24 時間接触状態が保たれた (BASF, 1978a)。最初の適用から 24 および 72 時間後に適用部位の皮膚反応について評価がおこなわれた。無処置皮膚では、24 時間後に全例でグレード 1 の紅斑がみられ、72 時間後では 6 例中 5 例となった。浮腫は認められなかった。無処置皮膚における反応の程度は、EU の分類・表示システムに基づく皮膚刺激性分類の閾値未満であった。擦過皮膚では、いずれの時点でも全例でグレード 4 の紅斑がみられ、ほとんどの例でグレード 1 の浮腫がみられた。別の同じような試験でも、無処置皮膚に対する N-VP の刺激性はほとんど見られなかった (CPT, 1978)。

別の簡単に報告されている 2 件の皮膚刺激性試験では、各群 4 または 8 匹のウサギの背部に 1,250 または 2,500 mg/kg の無希釈 N-VP が 1、5、15 分または 20 時間適用され、その結果、軽微な浮腫を伴ったあるいは伴わない、軽微または極めて軽微な紅斑が発現した (BASF, 1963b; c)。使用した包帯の性状については記載されていない。紅斑や浮腫は 24

時間目の観察時点までに収まったが、20 時間曝露を最後まで受けたウサギではかすかな鱗層が認められた。

ある経皮毒性試験では 400 mg/kg N-VP が Viennese 白色ウサギ 10 匹の背部皮膚に閉塞包帯下で 24 時間適用されたが、皮膚刺激反応の徴候は認められなかった (BASF, 1979c)。ラットを用いた経皮毒性試験では、N-VP が最高 1,043 mg/kg までの用量で体表面積の約 10%の領域にわたって適用され、閉塞条件下で 24 時間保持されたが、この試験でも皮膚刺激性の徴候はみられなかった (HRC, 1978b)。

これに対し、古い経皮毒性試験では、N-VP (化学的に純粋で最高 2%のアセトアルデヒドを含むと記載) を含ませた脱脂綿の耳栓をウサギ 3 匹に付けたところ、強度の皮膚刺激性が認められた (BASF, 1941)。4 時間曝露されたウサギでは、かなりの出血を伴う一過性の腫脹が報告された。8 または 16 時間曝露では、腫脹と水疱が生じた。16 時間曝露の動物は、後に死亡した。8 時間曝露の動物では、皮膚損傷部に卵白様の分泌物による痂皮の形成がみられたが、6 週間後に瘢痕を残して治癒した。ラットを用いた経皮毒性試験でも重度の皮膚反応 (N-VP の皮膚からの除去後 1 時間もたたないうちに限局性紅斑がみられ、後に褐色の壊死に進行した) が報告されたが、その試験では 2 mL の無希釈 N-VP が腹部の皮膚に「特殊なチャンバー」を用いて最高 4 時間適用された (BASF, 1953)。2 mL の N-VP を含ませた脱脂綿の耳栓を 20 時間付けられたウサギ 3 例中の 2 例でも、同様の反応が観察された (BASF, 1953)。前と同様に、限局性紅斑および浮腫が出現し、褐色の穿孔性壊死に進行して最終的に痂皮が形成された。3 匹目のウサギでは皮膚刺激性はみられなかった。

以上のような古い試験でこのような影響がみられた理由は不明であるが、かなり最近実施された通常の皮膚刺激性および経皮毒性試験では刺激性がほとんどないか、または全くみられなかったことを考慮すると、古い試験の結果には疑義が生じる。そのため N-VP 液は強い皮膚刺激物質とみなすことはできない。

眼

N-VP 液の眼刺激性は、多くの試験で検討されている。ごく最近行われたドレイズ試験では、ニュージーランド白色ウサギ 6 匹の眼に 0.1 mL の N-VP (純度および安定剤の使用については記載なし) が点眼投与され、1、24、48、72 時間および 7 日後に検査が行われた (BASF, 1978a)。適用 1 時間後に全例で、グレード 1 の発赤、グレード 1 または 2 の結膜水腫、グレード 1 の虹彩損傷が記録された。さらに 1 例で、グレード 1 の角膜混濁がみられた。眼刺激性評価のための EU 分類・表示システムを用いて平均スコアを求めたと

ころ、24～72 時間にかけての時点では、結膜水腫がグレード 2.2、結膜発赤がグレード 1.9、虹彩損傷がグレード 1 であった。さらに、グレード 1.8 の角膜混濁がみられ、全角膜表面の 4 分の 3 にわたって広がっていた。7 日目まで虹彩と結膜の損傷に縮小の徴候はみられず、角膜混濁は悪化した。7 日目までに、角膜の半分から全域を覆うグレード 2 (ウサギ 1 例) またはグレード 3 (ウサギ 5 例) の混濁がみられた。いずれの観察時点でも、全例でグレード 1 または 2 の分泌物も認められた。回復の徴候はなく、実際には損傷が経時的に悪化する傾向がみられた。以上より、N-VP は強度刺激性と判定される。

極めて簡単に報告されている 2 件の試験があり、無希釈の N-VP (純度に記載なし) 適用後の 8 日間の全観察期間にわたり、ウサギの眼に、瘢痕形成に至る「軽微」から「重度」の結膜水腫、浮腫および角膜混濁がみられたと記述されている (BASF, 1963b; c)。群当たりの動物数や用量は報告されていない。

N-VP 蒸気の眼刺激性は研究されていないが、反復吸入毒性試験では N-VP 蒸気の眼刺激性を示す徴候はみられていない。ラットを用いた反復吸入毒性試験において具体的に眼への影響が検討された最高用量は 20ppm であり、被験動物は 12 カ月間曝露され直後に屠殺されるか、または 18 か月間曝露され 6 か月間の回復期間の後に屠殺された (詳細はセクション 4.1.2.6.1 を参照のこと)。

気道

N-VP の気道に対する感覚刺激性を検討することを企図した試験は特に実施されていない。吸入毒性試験で呼吸数および鼻汁の増加がみられたこと、また強度眼刺激性があることから、N-VP に気道刺激性があることが予想された。ラットおよびマウスを 45 ppm (207 mg/m³) 以上の濃度に曝露したところ、明確な呼吸動作異常の徴候が認められた (詳細はセクション 4.1.2.2.1 および 4.1.2.6.1 を参照のこと)。さらに発生毒性試験では、20 ppm の曝露を受けた母動物で流涎がみられることがあったことから、この濃度でもごくわずかな刺激性を示す可能性があることが示唆された (詳細はセクション 4.1.2.9.1 を参照のこと)。15 ppm (69 mg/m³) の濃度では、いずれの試験においても呼吸異常や流涎の徴候はみられなかったことから、この濃度が感覚刺激性に関する NOAEL と考えられる。

4.1.2.3.2 ヒトにおける試験

ある古い報告書に、N-VP を含ませた脱脂綿の綿球を志願者 6 名の皮膚に付けて行われた試験について、簡単な記載がある (BASF, 1941)。8 時間後、6 例中 3 例で限局性の軽微

な紅斑がみられた。ほかの 3 例には刺激性の徴候はみられなかった。これは、ウサギで N-VP 液の強度皮膚刺激性が報告された試験に係属するものであった。このような影響は、上述した最新の試験では再現されていないことに留意すべきである。ヒトについては、眼および気道刺激性に関するデータは見当たらない。

4.1.2.3.3 刺激性の要約

ヒトにおける試験からは、有用で信頼性のある情報は得られていない。実験動物における皮膚刺激性を検討するために実施された最近の試験では、N-VP には著しい皮膚刺激性はないということが示された。しかし、N-VP 液は、眼に対して強い刺激性を示す。反復吸入毒性試験では、N-VP 蒸気が眼刺激反応を誘発することを示す徴候はみられなかったが、反復吸入毒性試験で具体的に眼への影響が検討された際の最高濃度はわずか 20 ppm であった。N-VP が気道において感覚刺激性を生じ得るかについては、検討されていない。吸入毒性試験で呼吸数や鼻汁の増加および強度の眼刺激性がみられたことから、N-VP には気道刺激性があることが推測される。吸入毒性試験での所見に基づいて、感覚刺激に関する NOAEL は約 15 ppm と考えられる。

4.1.2.4 腐食性

ヒトにおける試験からは、有用で信頼性のある情報は得られていない。実験動物においては、古い経皮毒性試験では強度の皮膚反応がみられたが、より最近の試験ではそのような反応はみられていない。したがって、N-VP には腐食性はないと考えられる。

4.1.2.5 感作性

4.1.2.5.1 動物における試験

皮膚

N-VP の皮膚感作誘発能を検討するため、ビューラー試験が最新の規制指針に従って実施された (BASF, 1996)。感作相では、モルモット 20 匹の側腹部に 0.25 mL の N-VP (純度 99.7%) が閉塞包帯下 6 時間適用された。この処置は、週 1 回の頻度で連続 3 週間行われた。N-VP は溶媒を使用せずに適用されたため、モルモット 10 匹から成る対照群は未処

置とされた。感作相では、刺激反応の徴候も全身毒性もみられなかった。感作相における最終適用から 14 日後、被験物質投与群と対照群のすべての動物の反対の側腹部に、0.25 mL の N-VP が閉塞包帯下で 6 時間適用され、被覆物の除去後 24 および 48 時間目に、適用部位の評価が行われた。ここでも皮膚反応はみられなかったことから、N-VP は皮膚感作を誘発しないと考えられた。同時陽性対照は設けられなかったが、その施設ではこの試験の 6 か月以内に α -ヘキシルシンナムアルデヒドを用いたビューラー試験で陽性の結果が得られており、測定法の感度が認証されている。

気道

N-VP の気道感作誘発能は動物では試験されていないが、この物質は皮膚感作を誘発せず、蛋白結合能が高くない（セクション 4.1.2.1.1 を参照のこと）ことから、気道感作を誘発しない、少なくとも免疫学的機序により誘発することはないと考えられる。

4.1.2.5.2 ヒトにおける試験

N-VP がヒトで皮膚または気道感作を誘発するかどうかについての検討は行われていない。

4.1.2.5.3 感作性の要約

ヒトにおける試験からは、情報は得られていない。モルモットにおいては、N-VP は皮膚感作能を示さなかった。この物質の気道感作誘発能は検討されていない。しかし、この物質は皮膚感作性を誘発せず、蛋白結合能が高くないことから、気道感作を誘発しない、少なくとも免疫学的機序により誘発することはないと考えられる。

4.1.2.6 反復投与毒性

4.1.2.6.1 動物における試験

吸入

N-VP の吸入毒性は一連の試験で検討され、詳細かつ十分に報告されている。それらは 2 年までのさまざまな設定期間において濃度範囲 1~120 ppm で実施されており、多くが

GLP および最新の規制指針に準拠している。最も包括的な試験は、ラット (BASF, 1988e; Klimisch et al., 1997b) またはマウス (BASF, 1988f; Klimisch et al., 1997b) を用いた 7 週間試験、ならびにラットを用いた 2 年間試験 (BASF, 1992b; Klimisch et al., 1997a) である。これらの試験により、N·VP の毒性の本質的な特性を評価することが可能になる。これらの試験のすべてにおいてサテライト群が設定され、中間屠殺が可能であったため、これらの試験からだけでも、げっ歯類における N·VP の反復吸入曝露毒性についてかなり詳しい全体像を知ることができる。重複を避けるために、ほかの試験については際立った所見のみを詳細に考察した。吸入毒性試験は N·VP 蒸気を用いて行い、別途記載のない限り、動物は週 5 日、1 日 6 時間全身曝露された。以下の文章では、所見を複数の用量について述べる場合、その発現率は対照群から始まる濃度の昇順で記載する。

7 週間吸入毒性試験により短期反復曝露での N·VP の毒性が評価された。その試験では、各群雌雄 20 匹の F344 ラット (BASF, 1988e; Klimisch et al., 1997b) または C57 Black マウス (BASF, 1988f; Klimisch et al., 1997b) が、3 ppm の Kerobit を安定剤として含む N·VP (純度 99.94%) に 0、5、15、45 ppm (23、69、207 mg/m³) の濃度で最長 7 週間曝露された。それぞれの動物種において、各群雌雄 5 匹ずつが 1 週間後に屠殺され、別の各群雌雄 5 匹ずつが 3 週間後に屠殺された。体重増加量の測算が行われたのは、3 および 7 週間曝露後のみであった。剖検直前に全例から採血が行われ、広範な生化学および血液学的検査が行われた。また、両動物種で肝ホモジネートが調製され、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ (γ -GT) および還元型グルタチオンが測定された。全例について細心の剖検が行われた。ラットでは顕微鏡検査が以下の組織・器官について行われた。すなわち、剖検で異常がみられたすべての組織に加えて全例の肝臓および鼻腔、ならびに対照群および最高用量群動物の肺、気管、心臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣について行われた。マウスでは、顕微鏡検査が以下の組織・器官について行われた。すなわち、剖検で異常がみられたすべての組織に加えて全例の鼻腔、気管、肺、肝臓、ならびに対照群および最高用量群動物の心臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣について行われた。

ラットでは、死亡例はなかった。毒性徴候が認められたのは 45 ppm 曝露群のみであった。第 1 週目では、全例で一般状態の悪化、無関心、呼吸動作異常、軽微な貧血がみられたが、試験が進行するにつれて多くの徴候が軽減し、2 週間後にはもはや認められなかった。45 ppm では、3 週間曝露後も依然として体重増加量の抑制がみられた ($p < 0.01$) が、試験終了までに回復した。

15 および 45 ppm 曝露群では、1 および 3 週間後の血液試料に異常蛋白血症が認められた。総蛋白が対照値の 80~90% まで低下したのは主にグロブリン値の低下によるものであったが、雄ではアルブミン値の低下もみられた。異常蛋白血症は曝露期間が延びるとともに軽減したが、試験終了時点でも最高用量群の雄ではなおグロブリン値のわずかな低下、最高

用量群の雌ではアルブミン値のわずかな低下がみられた。曝露初期には、肝毒性の血清酵素マーカー、特にアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALAT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ASAT)、アルカリホスファターゼ (AP) 活性の亢進もみられ、血清コレステロール値は試験期間を通じて上昇した。試験終了時点では、血清コレステロール値の統計学的に有意な上昇が、15 ppm 群 (対照群の 115%) および 45 ppm 群 (対照群の 120%) でみられた。

ラットでは、一部の血液学的検査項目で変化がみられ、曝露期間の延長とともに目立つようになった。15 および 45 ppm 群の雌雄でいくつかの赤血球検査項目 (ヘモグロビン値、赤血球数、ヘマトクリット値など) の統計学的に有意な変化がみられ、ほとんどが対照群から 20%以内の範囲であったものの、変化の推移から貧血の発症が疑われた。血小板数の増加も、中間用量群の雄 (対照の 109%) および最高用量群の雌雄 (雄で対照の 129%、雌で 109%) でみられた。肝ホモジネートの分析の結果、15 および 45 ppm 群の雌雄でいずれの時点でも γ -GT およびグルタチオンの統計学的に有意な上昇 (それぞれ対照値の 160~1,440%、および 110~170%) がみられた。

ラットの剖検については、最高用量群の雌ですべての剖検時点において絶対肝重量の有意な増加 (対照値の 110~130%) がみられ、中間用量の雌でも増加がみられることがあった。精巣重量に対する曝露の影響はなかった。肉眼的変化が認められたのは肝臓だけであった (肝臓は、特に小葉中心領域で褪色し、同時に小葉輪郭が明確化していた)。こうした変化は、各時点で 45 ppm 曝露群の一部または全例にみられた。15 および 5 ppm 群ラットでは肉眼的異常はみられず、また、いずれの用量でも精巣、精巣上体、子宮、卵巣などの生殖器官に、曝露による肉眼的異常はみられなかった。顕微鏡的变化は、肝臓および鼻腔の両器官でみとめられた。最高用量群の全例で、1 および 3 週間曝露後に肝臓の小葉中心性の類壊死および中等度の脂肪浸潤、同時に一部の細胞で核の変化 (過染色性または多型性、および有糸分裂の異常) がみられた。小葉中心性の類壊死は、15 ppm 群の動物でもみられることがあった。7 週間後では最高用量群の全例で小葉中心性肝細胞の腫大がみられるようになり、壊死細胞が時折みられ、小葉内でグリコーゲンが蓄積した細胞巣が認められた。15 ppm で 7 週間曝露を受けた動物では肝臓に変化はみられなかったが、5 ppm 群の雄 1 例の肝臓に小葉中心性の類壊死がみられた。鼻腔については、いずれの時点でも最高用量群の全例で鼻粘膜嗅上皮が萎縮しているように思われた。限局性で、初期段階のまたは軽微な嗅上皮萎縮が 1 週間後には中間用量群の雌全例で、3 および 7 週間後では中間用量群の全例でもみられた。限局性の嗅上皮萎縮は 7 週間後に 5 ppm の雄 1 例でもみられた (肝臓に小葉中心性の類壊死がみられたのと同じラット)。最高用量群のラットの精巣では、曝露に起因する顕微鏡的異常はみられなかった。

マウスにおいては、最高用量群で曝露による死亡例が発生した。4 日目に雄 1 例、9 日目

に雌 1 例が死亡し、53 日目には雌 2 例が切迫屠殺された。死因は確定されていない。最高用量群では、曝露期間中、死亡例を含むすべてのマウスで一般状態が悪化し、同時に呼吸動作も異常であった。最高用量群のマウスでは初期に体重減少がみられたが、ラットの場合と同様に毒性徴候は曝露期間が延びるとともに軽減した。最高用量群のマウスでは試験期間を通じて体重増加が抑制されていたため、最高用量群の動物の最終的な体重は対照値より約 15%軽かった。15 ppm 群の雄で体重増加抑制がみられることもあった。5 ppm 群では毒性徴候はみられなかった。

マウスにおける生化学的・血液学的変化はラットに比べて目立たなかった。マウスの 15 および 45 ppm 群で 3 週間曝露後になって初めて異常蛋白血症がみとめられたが、ラットの場合と同様にその程度は試験終了までに軽減した。生化学的検査項目で曝露に起因するそのほかの変化がみられたのは、15 および 45 ppm 群動物の肝ホモジネート中還元型グルタチオン濃度の上昇（対照値の 130~280%）のみであったが、試験の推移とともに軽減した。マウスでは影響のみられた赤血球検査項目数は比較的少なく、統計学的に有意な変化はみられたものの対照値より 10%を超す変化を示した項目はなかった。15 および 45 ppm 群の雌雄では 3 および 7 週間後に血小板数も増加（対照値の 110~160%）した。最高用量群においてリンパ球数の増加がみられたが、鼻腔における持続性の炎症によるものと思われた。

最高用量群では、剖検の度に絶対腎重量の減少がみられた。その減少は最初、最高用量群に限られていたが、後の時点では中間用量群の雄でも影響がみられた。しかし、腎重量が変化したにもかかわらず病理学的変化はなかったことから、毒性学的意味は不明である。最高用量群マウスではすべての時点で絶対肺重量が増加（対照値の 140~200%）した。肝絶対重量は最高用量群の雌では 3 週目以降、雄では試験終了時点で約 10%増加した。中間用量群の雌においても肝重量の増加がみられたが、それは 3 週目の屠殺時に限られた。マウスでは精巣重量の測定は行われなかった。1 週間後に屠殺したマウスの肉眼病理検査では、最高用量群の全例で肝小葉中心の褪色、15 ppm 群の一部および 45 ppm 群では雌 1 例を除く全例で副腎の赤褐色化が認められた。こうした変化はそれ以降の時点では認められなかった。いずれの用量でも精巣、精巣上部、子宮、卵巣などの生殖器官に、曝露による肉眼異常はみられなかった。最高用量群動物でみられた肝臓の顕微鏡的变化は、ラットでの変化と極めて似ていた。全時点で病理組織学的変化がみられ、最高用量群の動物では 3 週目以降に肝臓中のグリコーゲン含量の増加を示す徴候がみられた。1 および 3 週間後では 15 および 5 ppm 群の動物の肝臓に病理組織学的変化は認められなかったが、試験終了時には 15 ppm 群の雄 1 例にびまん性肝肥大が認められた。

顕微鏡的变化はマウスの気道にも観察された。ラットとは対照的に、剖検の度に最高用量群の大部分の動物の気道に点在性の壊死細胞を伴う軽微なびまん性上皮増殖がみられた。

1 週目の屠殺時のみであるが、最高用量群の雌全例で肺の血管周囲および気管支周囲に最極小程度からごく軽微な顆粒球浸潤がみられ、最高用量群の全例および 15 ppm 群の雌 1 例で気管支上皮の配列が不整であるように思われた（上皮細胞は不規則に配列し、わずかな増殖がみられ、一部の細胞は扁平化しているように見え、核はわずかに多型性を呈していた）。この配列不整は、N-VP 曝露群の雌全例、ならびに最高用量群の雄全例および中間用量群の雄のほとんどでみられ、用量の増加および曝露期間の延長に伴いその程度を増し、試験終了時点では最極小程度から中等度であった。鼻腔では、全用量および全時点でカタル性・化膿性鼻炎がみられた。1 週目では低用量群の雌 1 例、中間用量群の多数、最高用量の全例で、試験終了時点では低用量群の多数、中間用量群の大部分、最高用量の全例で発症がみられた。さらに、すべての用量群のマウスで鼻腔嗅上皮が萎縮しているように思われた。1 週目では低用量群のほとんどの例および中間用量の全例で限局性萎縮がみられ、最高用量群の全例では広範な萎縮が認められた。試験終了時点では、低用量群の雌 1 例は限局性の萎縮であったが、そのほかのすべての動物においては広範な萎縮がみられた。低用量群の多数、中間用量群および最高用量群の全例で、試験終了までに粘膜下腺細胞の過形成がみられ、また、いずれの時点でも全用量群の何例かにおいて、鼻腔気道上皮がわずかに過形成を呈した領域がみられた。最高用量群のマウスの精巣には、曝露に起因する顕微鏡所見はみられなかった。

この試験から、ラットおよびマウスに対する N-VP の影響に類似点が多いことが示された。両動物種で、外表の毒性徴候は試験の推移とともに軽減し、初期にみられた多くの生化学的変化、特に異常蛋白血症は 7 週目以降には回復徴候がみられた。標的器官は明らかに肝臓および気道上皮であり、後者は最も敏感な組織のように思われた。肝臓では、全屠殺時点で脂肪変性および類壊死が認められ、試験の進行に伴って肝細胞にグリコーゲンが蓄積されていったことが示唆された。マウスでは、肝毒性がみられたのは 45 ppm のみであり、15 ppm でも 5 ppm でもみられなかったが、ラットでは 15 ppm または 5 ppm 群でも肝毒性の徴候がみられる例があった。気道に関しては、両動物種ともに嗅上皮の萎縮がみられ、この影響の程度は用量の増加とともに大きくなり、マウスでは鼻腔上皮の損傷を示すほかの徴候もみられた。マウスでは、3 用量群のすべてで気管支上皮の炎症性変化もみられた。総括すると、この試験によって明確な NOAEL を決定することは、いずれの動物種についても不可能である。

N-VP の長期間吸入による影響が、がん原性試験において評価されているが、その試験では、各群雌雄各 100 匹の Sprague-Dawley ラットが 0、5、10、20 ppm (23、46、92 mg/m³ に等しい) (純度 99.9%、安定剤として Kerobit を 3 ppm 添加) の濃度に 2 年間曝露された (BASF, 1992b; Klimisch et al., 1997a)。これらのラットのうち、各用量群の雌雄各 20 匹および対照群の雌雄各 10 匹が 3 か月後に、また対照群を含む全群で各群雌雄各

10 匹が 12 か月後に屠殺され、そして対照群を含む全群において各群雌雄各 10 匹から成る第 3 群が 18 か月曝露され、その後 6 か月間の回復期間が設けられた。残りの各用量群雌雄各 60 匹および対照群雌雄各 70 匹は、24 か月間の曝露後に屠殺された。動物の検査項目は、一般状態の観察、体重測定、血液生化学的および血液学的検査、尿検査、検眼鏡検査、肉眼病理検査、器官重量測定（肝臓、腎臓、副腎、肺、脳、および精巣）を含み、さらに肝臓、鼻腔、喉頭、気管、肺、および脾臓の病理組織検査が全例で行われ、精巣、前立腺、精囊、精巣上体または子宮、卵巣などの広範な器官の病理組織検査が対照群と最高用量群で行われた。屠殺時期ごとにすべての検討が行われたわけではない。

曝露に関連した死亡はみられず、計画屠殺時の生存率は、全般的に各用量群で少なくとも 50%であった。曝露の最初の数週間では、処置群動物の体重増加が曝露に関連してわずかに抑制されたが、3 か月目までには処置群動物の体重は全体として対照群の値から 10%以内の範囲であった。処置群と対照群の体重差は、用量に関連していた。外表の毒性徴候はほかにはみられず、検眼鏡検査では曝露に起因する損傷は確認されなかった。

生化学的検査では、3 か月間の曝露後に全用量群の雌雄で軽微な異常蛋白血症が明らかになった。変化は雌の方が顕著であったが、対照値より 15%以上低い項目はなかった。10 および 20 ppm 群の雌では、12 か月後でも依然として軽微な異常蛋白血症が認められた。これ以外の生化学的変化がみられたのは雌のみであり、それは 12 か月後に最高用量群の雌で観察された血清コレステロール値の上昇であった。3 および 12 か月目の測定時点で統計学的有意な血清 ALAT の低下も報告されたが、その程度は用量に関連していなかった。通常、血清 ALAT 値は肝毒性に応じて上昇することから、この変化の生物学的意義は不明である。残りの用量群の動物については、血液生化学的検査は実施されなかった。肝ホモジネートの分析の結果、20 ppm 群の雌雄および 10 ppm 群の雄で 3 か月および 12 か月後に、また 5 ppm 群の雄で 12 か月後に、還元型グルタチオン値の上昇（対照値の約 150%）が認められた。γ-GT 値も顕著に上昇した（対照値の約 300%）。この所見が最初にみられたのは 20 ppm 群の雌のみであったが、12 か月後には 20 ppm 群の雄でもみられた。24 か月目においては、肝ホモジネートは調製されなかった。興味深いことに、中間および最高用量群の雄のγ-GT 値は、18 か月曝露期間の終了から 6 か月経過した後でも依然として著しく高かった（対照値の 330~530%）。雌でも、わずかであるが統計的に有意でない上昇がみられた。

3 か月後の血液学的変化は、10 および 20 ppm 群の雌雄における血小板数の増加、ならびに 10 および 20 ppm 群の雄における MCH のわずかな低下に限られたが、最高用量群の雌では 12 か月後に、赤血球大小不同および小赤血球症の増加など、いくつかの赤血球項目で変化がみられたことから、軽微な貧血の発症が疑われた。N-VP の曝露を 24 か月間受けた雌でも、全用量群で、赤血球大小不同、小赤血球症、および大赤血球症が、用量に関

連した増加を示した。20 ppm の N-VP 曝露を 12 か月間受けた雌では、白血球数の増加がみられ、それは白血球細胞、リンパ球、単球、好中性多形核顆粒球がわずかに増加したことによるものであり、おそらく持続的な炎症が生じていたことを示すものである。雄では血液学的変化はみられなかった。ラットの尿検査は 3、6、12 か月曝露後に行われたが、変化はみられなかった。

剖検では、絶対および相対肝重量の増加が、20 ppm 群の雌雄および 10 ppm 群の雄で 3 か月後においてみとめられ、12 か月後では中間用量群の雌、低用量群の雄でも影響がみられた。しかし肝重量は、最高用量群以外の全群において、試験終了時までに対照群の重量とほぼ同程度になった。精巣重量には、いずれの時点でも曝露による変化はみられなかった。肉眼病理検査では、すべての時点で肝臓に暗色化した細胞巣を有する動物がみとめられた。そのような細胞巣は、対照群動物の肝臓で見られることもあったが、曝露群の動物の方で頻度が高かった。生殖器官には、曝露に起因する肉眼的変化はみられなかった。

顕微鏡的变化がみられたのは、肝臓、鼻腔、および喉頭のみであった。生殖器官には、曝露に起因する顕微鏡的異常はみられなかった。これらの器官における腫瘍性変化については、セクション 4.1.2.8.1 でさらに詳細に考察する。

3 および 12 か月後の肝臓の検査では、肝細胞が腫脹した領域が認められた。その領域は、大きさが 3~4 細胞から小葉全体に及び、明細胞性（細胞質に染色性物質がない）細胞巣を含んでおり、肝臓全体に無秩序に散在していた。このような領域内の細胞の中には、核に初期の変性変化がみられるものがあつた。有糸分裂像は観察されなかった。この所見は曝露群でも対照群でもみられた。3 か月後では、雄 6、3、10、20 匹、雌 0、0、3、17 匹で見られ、これらの所見の頻度は明らかに用量に関連していた。12 か月後では、明細胞性細胞巣は雄 9、10、10、10 匹、雌 1、7、9、10 匹で見られ、個体別の頻度はやはり用量に関連していた。12 か月後ではまた、対照群動物 1 例を含む少数例で肝臓に限局性過形成がみられた。この過形成領域内の細胞の中には有糸分裂像を呈するものがあり、この領域の周囲の正常肝細胞は圧迫されているようにみえた。「肝海綿状変性」（顆粒状物質で満たされた嚢胞様複合体が存在すると記述）と呼ばれる退行性変化も雄 2、6、4、10 匹、雌 0、0、1、2 匹で見られた。24 か月目の顕微鏡検査では、主に限局性肝細胞過形成（雄 3、8、14、21 匹、雌 5、15、20、28 匹で発現）、好酸性細胞巣（雄 3、5、10、17 匹、雌 1、6、13、22 匹で発現）、肝海綿状変性細胞巣（雄 37、36、45、55 匹、雌 7、19、28、42 匹で発現）の領域から成る、褪色した細胞巣がみられた。

顕微鏡所見によれば、曝露に起因する肝臓の変化の中には曝露停止後も持続するものがあつた。N-VP に 18 か月間曝露され、6 か月間回復期間の最後まで観察されたラットの場合、最高用量群の雌で限局性過形成の発現頻度が比較的高く、全用量群で好酸性細胞変化が発

生したが、対照群では発生せず、明確な用量関連性はなかった。

鼻腔では、すべての時点で曝露による変化として、嗅上皮の限局性萎縮が主に中隔と鼻甲介の間の部位にみられ、さらに鼻腔内の嗅上皮基底細胞の限局性過形成、鼻腔前部の呼吸上皮基底細胞の限局性過形成、および粘液膿性の炎症もみられた。変化は、最小度から中等度で、発現率と程度は用量についても曝露期間についても明確な相関がみられた。すべての所見を有する動物も各用量群に存在した。嗅上皮の限局性過形成は 3 および 12 か月後に最高用量群の全例で、また嗅上皮の限局性萎縮は 12 か月後に最高用量群の全例でみられた。対照群の動物の場合、3 か月後では鼻腔にどのような種類の変化もなかったが、そのあとの時点では上記の所見の一部がごくまれにみられることもあった。さらに、12 か月間以上の曝露を受けたあとでは、少数例で鼻腔の中隔と側壁に呼吸上皮の限局性の扁平上皮化生がみられ、粘膜下腺の限局性過形成が最小から顕著な程度で発現した。N-VP の曝露を 24 か月間受けた動物については、対照群を含む各用量群のごく少数の例において、鼻腔上皮杯細胞の最小から軽微な過形成がみられたが、発現率には用量関連性はなかった。

18 か月間の曝露終了から 6 か月経過したあとでも、こうした所見すべてが各用量群の一部のラットでみられ、曝露群では少数の雌の鼻腔側壁に限局性化生の領域もみられた。5 ppm の曝露を受け回復期を設けられた群の動物における病変の発現率と程度は、ほとんどの場合、対照群動物に比べてわずかに高いだけであったが、このような結果から、5 ppm 以上の濃度の N-VP 曝露により鼻腔中に起きた変化は曝露後 6 か月間持続することが示された。

喉頭については、変化が認められたのは 24 か月間の曝露を受けた動物のみであった。10 ppm 群の雄 3 例ならびに 20 ppm 群の雄 6 例および雌 4 例で最小から中等度の限局性上皮過形成がみられ、また、限局性の粘液膿性炎症も少数例でみられたが、発現率に明確な用量関連性がみられたのは雌のみであった。そのほかはいずれの組織についてもどの時点でも、曝露に起因する変化はみられなかった。

したがって全般的にいうと、この試験の結果から、N-VP 蒸気曝露による主要な非腫瘍性の影響は、肝毒性および上気道刺激性であることが確認された。変化は 5 ppm の用量、すなわち試験で用いた最低曝露レベルでも起こり、肝臓や鼻腔の変化の中には曝露停止から 6 か月以上持続するものもあった。

3 件から成る一連の簡略な試験が、F344 ラットの雄 (BASF, 1988c; Klimisch et al., 1997b) および C57 Black マウスの雌 (BASF, 1988; Klimisch et al., 1997b) において、安定剤として 3 ppm の Kerobit を含む N-VP (純度 99.94%) を用いて実施された。各群 2 または 5 匹のラットまたはマウスが、0、5、15、45 ppm (0、23、69、207 mg/m³) に

連続 2 または 5 日間曝露された。サブグループはさらに 5 日間、45 ppm の曝露を受けた。15 または 45 ppm 群でみられた毒性徴候は前述の徴候に類似しており、わずか 2 日で発現した。5 ppm 群ではいずれの動物種でも毒性徴候はみられなかったが、病理組織検査が行われたのは肝臓のみであった。

ラットを用いた標準的な 3 か月試験では、さらに広い濃度範囲が検討された (BASF, 1986a; Klimisch et al., 1997b)。Sprague-Dawley ラット各群雌雄 10 匹が、0、5、15、45、120 ppm (0、23、69、207、553 mg/m³) の安定剤無添加の N-VP (純度 >99%) 蒸気に曝露された。最高曝露濃度では、試験の最初の数日でほとんどの動物が死亡した。死亡前にみられた毒性徴候は、無関心、筋弛緩、眼瞼下垂、呼吸困難、血尿などであった。この曝露濃度でみられた病理組織学的所見は、胃粘膜潰瘍形成、小葉中心性肝細胞肥大、気道上皮の炎症および壊死などであった。5、15、45 ppm 群でみられた曝露に起因する所見は、上記の試験における所見と一致していた。0、45、120 ppm N-VP 群の全例について生殖器官 (精巣、卵巣、子宮) の顕微鏡検査が行われた。曝露に起因する所見は観察されなかった。電気泳動法により血漿蛋白質分画が行われ、異常蛋白血症が α 1-グロブリンに対する特異的影響によるものであることが示された。肝臓に生じた変異細胞巢にグリコーゲンの蓄積を示す徴候がみられた。

NOAEL を求めるために追加試験が実施され、その試験では Sprague-Dawley ラット各群雌雄各 10 匹が 0 または 1 ppm (0 または 4.61 mg/m³) の N-VP (純度 99.7~99.9%) に 3 か月間曝露された (BASF, 1986b; Klimisch et al., 1997b)。病理組織検査は、標的器官であることが分かっている肝臓と鼻腔のみに限定された。曝露による変化がみられなかったことから、1 ppm がラットにおける NOAEL と考えられた。しかし、この NOAEL 値をさらに長期の曝露期間に適用できるかどうかは明らかではない。5 ppm で 3 か月間曝露されたラットでは鼻腔に明らかに有害な変化が生じたが、肝臓には病理組織学的変化はみられなかった。そのラットにおける所見は、鼻腔損傷以外では軽微な異常蛋白血症のみであった。それに対して、5 ppm の 12 か月間以上の曝露を受けたラットにおいては、肝臓と鼻腔の両器官に明らかに有害な変化が存在した。5 ppm の曝露で肝毒性が明らかになるには 3 か月以上かかると考えると、1 ppm の曝露でラットにおいて肝毒性が発現するかどうかは分からない。このことから、3 か月試験で得られた 1 ppm の NOAEL は、曝露期間が延長された場合には適用できないと考えられる。したがって、1 ppm の NOAEL を以降のリスク評価において使用することはできず、代わりに 5 ppm の LOAEL が用いられる。

N-VP 誘発性肝損傷の経過をより詳細に調べるために、さらなる 3 か月間試験が実施された (BASF, 1987c; Klimisch et al., 1997a)。Sprague-Dawley ラット各群雌 40 匹が、0 または 45 ppm (0 または 207 mg/m³) の安定剤無添加 N-VP (純度 99.7~99.9%) に最長で 3 か月間曝露された。動物は、7 週間もしくは 3 か月間の曝露後、または曝露後の 9 も

しくは 21 か月間の回復期間終了後に屠殺された。7 週間後または 3 か月後の屠殺例の結果は前述の結果と同等であった。曝露に起因する変化は、両回復試験群の動物でも認められた。生化学検査結果では、肝ホモジネート中の γ -GT および還元型グルタチオン濃度において、対照値を上回る値が続いたことが明らかになった。被験物質曝露群の動物では肝細胞腫大がみられ、肝細胞腫大の領域が肝全体でかなり均等に広がっていた。細胞増殖巣がみられ、その細胞巣ではグリコーゲンの蓄積が認められた。細胞の中には大きな核を有するものもあった。さらに、21 か月間回復期間を設定されたラットで肝硬変様化生細胞巣がみられ、腫瘍性変化もみられた（詳細はセクション 4.1.2.8.1 を参照のこと）。このような結果から、N-VP は肝臓に有害な変化を惹起し、その変化は曝露停止後も長期間続くことが示唆された。

ラットおよびマウスを用いた小規模の 6 か月試験が行われ、0 または 10 ppm の、安定剤として 3 ppm の Kerobit を含む N-VP (0 または 46 mg/m³) (純度 > 99.9%) への曝露が行われた (BASF, 1988g; Klimisch et al., 1997b) が、上記以外の所見は報告されていない。

N-VP の肝臓への影響を調べるために Syrian ハムスターを用いた 3 か月間試験も計画され、0 または 45 ppm (0 または 207 mg/m³) の安定剤無添加 N-VP (純度 99.7~99.9%) への曝露が行われた (BASF, 1987d; Klimisch et al., 1997b)。病理検査が実施されたのは肝臓だけである。N-VP 曝露群のハムスターでは、まず体重が減少し、曝露期間を通じて体重増加が抑制された ($p < 0.01$)。また、流涎、水様の鼻汁、不安定で脚を高く上げる歩行、無関心、鼻端の湿潤、被毛の逆立ちなどの毒性徴候がみられたが、それは第 1 日目に限られた。2 日目までにみられたのは軽微な眼刺激性のみであった (眼を半分閉じていた)。その後毒性徴候はみられず、先にラットとマウスでみられたような種類の退行性変化も細胞変化も認められなかった。この試験の結果から、ハムスターでは N-VP に対する反応の現れ方がラットやマウスと明らかに異なることが示されたが、この種差の理由は不明である。

古い 2 件の吸入毒性試験データも入手できている (BASF, 1964a; 1941)。それぞれの試験でネコ、ウサギ、モルモット、ラットが、また一方の試験ではさらにマウスが、500~2,200 mg/m³ とされる濃度の N-VP 蒸気に同時に曝露された。十分な計画に基づいて実施された吸入毒性試験の多くのデータがあることを考えると、これらの試験結果から新たにリスク評価の面で何か有用な情報は得られないと考えられる。

N-VP (純度の記載なし) エアロゾル (噴霧化により発生させた。粒子径の記載なし) の毒性を検討するための試験が、1 件実施されている (FDRL, 1976)。各群雌雄 15 匹の FDRL Wistar ラットが、N-VP 水溶液の場合には 0 もしくは 75 mg/m³、または無希釈 N-VP の場合には 300 mg/m³ のエアロゾルに、1 日当たり 4 時間で週 5 日間、4 週間にわた

り全身曝露された。ラットは毒性徴候について、毎日チェックされた。曝露直前および試験終了時に検眼鏡検査が実施され、血液および尿試料が血液学的検査および尿検査のために採取された。剖検にあたっては、生殖器官などが詳細に調べられた。

曝露による死亡はみられなかった。毒性徴候はみられず、血液学的検査、検眼鏡検査、尿検査でも変化は認められなかった。剖検では肉眼的異常はみられなかったが、肺、鼻腔および気管の粘膜には顕微鏡的变化がみられた。肺では、両用量の曝露群の雄で気管支周囲のリンパ組織の過形成が対照群より高頻度でみられたが、個体ごとの所見の程度には用量関連性がなかった。「亜急性または慢性」間質性炎症が最高用量の雌でより高頻度に発現し、その所見は両用量群の雌で対照群より重度であった。さらに鼻腔の鼻甲介周辺の粘膜表面に白血球に富んだ滲出液がみられるとともに、粘膜中の白血球数に用量関連性の増加がみられたことから、炎症が生じたことが明らかとなった。約 200 mg/m³ の濃度の蒸気と同じ期間曝露された場合には重大な肝損傷が生じたので、肝臓でどのような変化もみられなかったということは注目すべきことである。これは、蒸気とエアロゾルでは気道で処理される過程が本質的に異なることと関連しているのかもしれない。精巣、精巣上体、卵巣、子宮などの生殖器官に、曝露による有害な所見はみられなかった。

以上のように、N-VP 蒸気の反復吸入毒性については詳細に検討されている。ラットにおいては、120 ppm の濃度は、1 週間以内の曝露でも致死性である。マウスでは、45 ppm の N-VP で曝露によると思われる死亡例が発生した。ラットおよびマウスでは、N-VP の吸入により 5 ppm までの曝露レベルで肝臓に細胞毒性傷害、また上気道に刺激反応が発現し、これらの組織の変化の中には曝露停止後も長期間持続するものがあることを示す徴候がみられた。ラットを用いた 3 か月試験では、肝臓および鼻腔の変化に関する NOAEL が 1 ppm と確認されたが、この濃度がより長期の試験でも NOAEL であるかどうかについては不明である。ラットおよびマウスにおける所見と対照的に、ハムスターでは、45 ppm の N-VP に 3 か月間曝露された場合でも毒性徴候はほとんどみられなかった。この種差の理由は不明である。N-VP エアロゾルへの曝露の影響を調べる試験が 1 件実施されており、刺激性の徴候が鼻腔および気管でみられたが、質量濃度で比較すると N-VP エアロゾルでは肝毒性が相対的に低いように思われた。これは、蒸気とエアロゾルでは気道で処理される過程が本質的に異なることによるのかもしれない。

経口投与

N-VP の反復経口投与毒性が、強制経口投与または飲水投与で評価されている。多くの試験が最新の規制指針に準拠して実施されているが、すべての試験が GLP 基準に準拠しているわけではない。

Wistar ラット各群雌雄各 5 匹に、N-VP (純度>96.5%) が 0、40、60、100 mg/kg の用量で週 5 日、3 か月間、水を媒体として強制経口投与された (BASF, 1986c; Klimisch et al., 1997b)。採血は剖検直前に行われた。包括的な生化学的・血液学的検査が行われ、電気泳動法を用いた蛋白質分画によりアルブミンおよび α 1-、 α 2-、 β -、 γ -グロブリンの量が測定された。剖検では、肉眼病理検査に加えて肝臓の顕微鏡検査が行われた。グリコーゲンと γ -GT について特異的染色が行われた。

100 mg/kg 群の雄では摂餌量がわずかに減少した。それに対して摂水量は被験物質投与群の全例で用量依存的に増加し、100 mg/kg 群の雌の摂水量は試験期間の最後まで対照群より最大で 60%多かった。体重増加量に有意な変化はなかった。毒性を示す臨床徴候はみられなかった。生化学的検査で被験物質投与による変化と考えられたのは、肝ホモジネート中 γ -GT 活性の上昇のみであり、雌ではすべての被験物質投与群でみられた。この酵素は雄の肝ホモジネートでも上昇がみられたが、その変化は統計学的に有意ではなかった。60 mg/kg 以上の用量では、雌雄ともに血小板数の統計学的有意な増加がみられた。そのほかには血液学的変化はみられず、剖検でも肉眼的変化はみられなかった。肝重量は、雌ではすべての被験物質投与群で、雄では 60 および 100 mg/kg 群でわずかに増加 (重量は対照値の 110~120%) した。顕微鏡的变化はみられなかった。100 mg/kg 群では、N-VP 吸入曝露を受けた動物で報告されたものと形態学的に類似した変異細胞巣が、雌 5 例中 4 例および雄 5 例中 1 例の肝実質でみられた。しかし、その細胞巣は数が少なく、大きさも小さく、またグリコーゲンおよび γ -GT 染色陽性のものはなかった。

このような結果から、N-VP の毒性は、強制経口投与時の方が吸入曝露時よりかなり低いことが示された。100 mg/kg/日の投与を受けたラットでさえ異常蛋白血症の徴候はみられず、肝臓でごくわずかな変化がみられただけであった。この試験におけるラットの平均体重が 300 g、ラットの呼吸量が 6 L/hr¹ (Gold et al., 1984) であるとして、100%吸収されたと仮定すると、100 mg/kg の経口用量は約 800 mg/m³ の吸入用量に等しいであろう。約 550 mg/m³ の N-VP 蒸気の吸入曝露では、死亡が極めて速く発生した (BASF, 1986a)。このような差が生じたのは、一つには、おそらく経口投与量のかなりの部分が、吸収前に胃内の酸性環境の中で加水分解されたり重合したりしたためであると考えられる。

各群雌雄各 10 匹の Wistar ラットに、N-VP (純度>99.48%) を開始用量 0.5、1.3、3.6、8.3 mg/kg/日に相当する 0、5、12、30、75 ppm の濃度の飲料水により 3 か月間投与する試験が行われた (BASF, 1986d; Klimisch et al., 1997b)。雄に対する実用量 (mg/kg/日) は試験終了までに試験開始時の約半分になり、雌では 3 分の 2 になった。飲料水中の N-VP は 4 日間安定であることが確認されているので、被験物質飲料水溶液は週 2 回調製された。採血は約 6 および 12 週目に行われ、包括的な生化学的・血液学的検査が行われた。検眼鏡検査は試験の開始前および終了時点に行われた。試験終了時に、肉眼病理検査およ

び詳細な顕微鏡検査が、種々の組織について、対照群と最高用量群では生殖器官も含めて行われた。

摂水量の減少（対照値の約 90～95%）が、最高用量群のみでみられた。そのほかには毒性徴候はみられず、検眼鏡検査でも異常はみられなかった。生化学的変化は、吸入毒性試験でみられたものと一致しており、異常蛋白血症の徴候が最高用量群のみでみられただけであった。6 週目には、雌で総蛋白値が低下し、グロブリン値は雌雄ともに減少した。試験終了時には雌雄ともに総蛋白およびグロブリン値が低下し、雌ではアルブミン値が減少した。そのほかには生化学的検査項目にも血液学的検査項目にも変化がみられたものはなく、肝ホモジネートの γ -GT 濃度の変化もなかった。ラットに強制経口投与した場合には、最大で 100 mg/kg/日まで異常蛋白血症の徴候がみられなかったことは注目に値する。この差の理由は不明であるが、飲水投与では強制経口投与よりも摂取速度が緩慢になるという相異を示しているのかもしれない。被験物質投与に起因する剖検所見は、30 および 75 ppm 群の雄でみられた腎重量のわずかな増加（最高用量群の重量は対照値より 12%大きかった）のみであったが、それに伴う病理学的変化はみられなかった。5 および 12 ppm 群では毒性徴候はみられなかった。最高用量において、精巣、前立腺、精巣上体、精囊、卵巣、および子宮に、被験物質投与による有害作用はなかった。30 ppm (3.6 mg/kg/日) 群の雄における腎重量のわずかな増加が被験物質投与に起因する唯一の所見と考えると、この用量が当試験における NOAEL と考えられる。

Wistar ラットを用いた予備試験が行われており、各群雌雄各 5 匹に、0、50、100 または 200、もしくは、400、700、1,600 または 6,400 ppm の濃度で N-VP（純度>96.5%）を 21 または 28 日間飲水投与した（BASF, 1986c; Klimisch et al., 1997b）。しかし、高濃度の N-VP では嗜好性が悪くなるため、動物が実際に摂取した量は、約 5、10、20、25、30、25、40 mg/kg/日であった。700 ppm 以上の濃度では摂餌量および摂水量が極端に減少し、死亡例が発生した。低濃度側では、摂餌量および摂水量に重大な変化はなく、観察された毒性徴候は、50 ppm 以上の雌における軽微な体重増加抑制、100 ppm 以上の雌および 200 ppm 以上の雄における異常蛋白血症の所見に限られた。剖検では、最高用量群の雄 3 例が胃炎を発症し、雄 2 例ではびらん性・潰瘍性であった。700 ppm 群の雌 2 例では、肝実質に脂肪浸潤のような軽微な黄褐色への変色がみられたが、この病変についての顕微鏡的検査は行われていない。低用量側では、被験物質投与による異常はみられなかった。顕微鏡検査が実施された。

そのほかにも、古い強制経口投与試験についても 1 例入手できた（BASF, 1964b）。その試験では、ウサギ 3 匹、ネコ 2 匹、モルモット 4 匹が用いられたが、対照群は設定されていない。この試験の結果から、有用な追加情報は得られないと考えられた。

したがって全般的にいうと、ラットにおける N-VP の飲水投与による主要な影響は、おそらく嗜好性が悪くなることによる摂餌量および摂水量の抑制のように思われた。比較的低用量、すなわち約 8 mg/kg/日で、ラットに異常蛋白血症がみられたが、そのほかに変化した生化学的・血液学的検査項目はなく、肝臓で退行性変化はみられなかった。

結論としては、N-VP の経口投与により肝損傷が惹起されるが、病理組織学的変化が発現する用量は、吸入曝露での用量よりはるかに高い。飲水投与試験から 3.6 mg/kg という NOAEL が確定されたが、強制経口投与では 60 mg/kg/日以下の用量では重大な肝臓傷害は誘発されず、少数の生化学的・血液学的検査項目でわずかな変化がみられただけであった。

経皮投与

反復経皮投与毒性試験は実施されていない。

4.1.2.6.2 ヒトにおける試験

N-VP 製造作業員の健康診断のために、横断的罹病率調査が 1 例だけ実施されている (Zober et al., 1992)。その調査には、大半の作業要員についての総合的健康診断 (人間ドック) が含まれ、N-VP の曝露による健康被害の徴候は確認されなかったが、作業要員が曝露された N-VP の実際の濃度は不明である。N-VP 曝露を受ける可能性の高い作業を行う場合には、作業員に送気マスクが供与されたと記述されている。さらに、この報告書に記載されている衛生データについて、どれがスタティック(static)から得られたのか、また個人別モニタリング手法から得られたのはどれかが不明である (セクション 4.1.1.1.2 参照)。作業員が吸入した可能性のある N-VP の実際の濃度が不確かであることを考えると、この調査の結果から、リスク評価のために有用な新しい情報は何も得られないと考えられる。

4.1.2.6.3 反復投与毒性の要約

ヒトにおける N-VP の反復曝露の効果に関する有用な情報はほとんど得られていないが、げっ歯類では詳細な試験が行われている。N-VP を反復吸入したラットおよびマウスでは、異常蛋白血症、貧血が疑われる血液学的変化、肝臓、鼻腔、および喉頭の病理学的変化が発現した。肝臓では、小葉中心性の類壊死、および核の退行性変化を伴う脂肪浸潤がみら

れ、小葉中心部の肝細胞にグリコーゲンの蓄積の徴候がみられた。鼻腔では、N-VP により嗅上皮および呼吸上皮に炎症性変化が誘発された。曝露が長引くと、喉頭でも炎症性変化がみられた。ラットを用いた3か月間試験では、NOAELが1 ppm (4.61 mg/m³) と確認された。5 ppm (23 mg/m³) のN-VP 蒸気の吸入曝露を3か月間受けたラットでは、鼻腔刺激の明らかな徴候や軽微な異常蛋白血症などの毒性徴候がみられた。5 ppm のN-VP 曝露を3か月間受けたラットの肝臓には病理組織学的変化はみられなかったが、5 ppm の吸入曝露の期間が延びた場合には肝毒性がさらに目立つようになった。このことから、3か月間試験で得られたNOAELは3か月を超す期間の試験には適用できず、生涯曝露についてのNOAELは、ラットでもマウスでも1 ppm 未満であることが示唆された。したがって、この1 ppm というNOAELを以降のリスク評価に使用することはできず、代わりに5 ppm というLOAELを用いることになる。15 ppm (69 mg/m³) 以上の濃度のN-VP 蒸気に吸入曝露されると、1週間もしないうちに肝毒性および鼻腔刺激反応が誘導され、マウスでは45 ppm (207 mg/m³) で、ラットでは120 ppm (553 mg/m³) で死亡例が発生した。

対照的に、ラットにおけるN-VPの強制経口投与では、肝臓に病理組織学的変化が起こる用量が、吸入曝露の場合に比べてかなり高い。経口投与では気道は標的器官ではない。経口投与の場合にN-VPの毒性がかなり低い理由の一つは、N-VPが吸収前に胃内の酸性環境下で加水分解を受けることである。飲水投与試験でのNOAELは3.6 mg/kg/日であったが、強制経口投与では最高60 mg/kg/日まで肝臓に明確な病理学的変化は誘導されず、少数の生化学的・血液学的検査項目でわずかな変化が誘導されたにすぎなかった。N-VPの反復経皮曝露による影響に関するデータはない。

4.1.2.7 変異原性

4.1.2.7.1 *in vitro* 試験

細菌系

N-VPは細菌系を用いて詳細に調べられている。プレート法を用いた試験では、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) の菌株 TA1535、TA1537、TA98、TA100 を、アロクロールで誘導したラット肝 S9 の存在下および非存在下で、ジメチルスルホキシドを溶媒としたN-VP (純度の記載なし) に、3.1~10,000 µg/plate の用量で曝露した (HRC, 1978c; BASF, 1978b)。さらに、TA98株を別に培養し、あらかじめエポキシド加水分解酵素阻害剤とグルタチオン枯渇剤である1,1,1-トリクロロプロペン-2,3-オキシドを添加して、

S9 の存在下で N-VP に曝露した。両例ともに陰性の結果が得られた。試験ごとに陽性対照と陰性対照が用意され、期待された応答がみられた。設定された用量のいずれにおいても、細胞毒性はみられなかった。

外因性代謝活性化系の存在下および非存在下で、ネズミチフス菌 TA1535、TA98、TA100 の各菌株を用いた N-VP（純度 >98%）の Ames 試験が閉鎖系条件下でも実施された（Simmon and Baden 1980）。この試験で用いられた代謝活性化系は、PCB とアロクロール 1,254 の混合物で誘導したラットから調製された肝 S9 画分であった。プレートは 0、52、104、520、もしくは 1,043 mg/dessicator の濃度で 7 時間曝露され、その後さらに 40~50 時間インキュベートされたあとでコロニーが計数された。陽性および陰性対照は期待された応答を示した。N-VP については、陰性の結果が得られた。細胞毒性は観察されなかった。

N-VP は、ネズミチフス菌 TA98 および TA100 を用いた Ames 試験でも変異原性はないと報告されている（Knaap et al., 1985）。試験条件の詳細はほとんど報告されていないが、試験は S9 の存在下および非存在下で閉鎖系により実施され、N-VP は細胞毒性を示すまでの濃度で試験されたと報告されている。

別の短報によれば、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) を用いた彷徨(fluctuation)試験で陰性の結果が得られている（Knaap et al., 1985）。試験は閉鎖系で、細胞毒性を示すまでの濃度で実施された。それ以上の詳細な報告はない。

哺乳類細胞

哺乳動物細胞系を用いた詳細な試験も実施されている。蒸留水を媒体とした N-VP（純度 >99.7%）の遺伝毒性が、最新の規制指針に準拠した *in vitro* 細胞遺伝学試験で評価された（BASF, 1987e）。この試験では、各濃度 2 系列のヒトリンパ球（ドナー数の記載なし）培養試料が、外因性代謝活性化系非存在下では 20、40、60 µg N-VP/mL の濃度で、またアロクロール誘導ラット肝 S9 の存在下では 300、600、900 µg N-VP/mL の濃度でインキュベートされた。用量は、予備試験で得られた細胞毒性に基づいて設定された。陽性、陰性、溶媒対照も設けられた。S9 存在下では、培養試料は 2 時間曝露され、曝露開始 24 時間後に固定された。S9 非存在下の試験では、24 時間曝露されたあと固定された。いずれの培養試料にも分裂指数に変化はみられなかった。N-VP への曝露に起因する染色体異常はみられなかった。陽性および陰性対照では適切な応答が得られた。

マウスリンパ腫細胞 L5178Y (TK+/-) を用いた遺伝子突然変異試験でも、陰性の結果が得られた（Litton Bionetics, 1980a）。この試験では、アロクロール 1,254 誘導ラット肝

S9 の存在下または非存在下で、細胞が 0.39~10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ の N-VP (純度の記載なし) に 4 時間曝露された。その後細胞は、2 日または 3 日の発現期間、さらに 10 日間のコロニー形成期間にわたり培養された。どちらの処理においても、7.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 以上の濃度で強い細胞毒性、5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ の濃度で中等度の細胞毒性がみられた。陽性および陰性対照も設けられ、期待された応答を示した。

他にも L5178Y マウスリンパ腫細胞を用いた N-VP の変異原性試験がごく簡単に報告されている。HPRT 遺伝子座と TK 遺伝子座における遺伝子突然変異を指標として、S9 の存在下および非存在下で、細胞毒性を示すまでの濃度で閉鎖系により行われた (Knaap et al., 1985)。結果は陰性であった。これ以上の詳細は報告されていない。

ラット肝細胞を用いた *in vitro* 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験の結果も陰性であった (Litton Bionetics 1980b)。この試験では、各濃度 3 つの培養試料が 0.3~20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ の濃度の N-VP (純度の記載なし) に 1 時間曝露され、その後 3 時間の標識期間にわたって培養された。2 時間後および 24 時間後の生細胞数を測定するために、さらに培養が行われた。N-VP 処理された細胞で UDS 活性の亢進はみられなかった。細胞数測定により、18.2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ が完全に致死的事実であることが示された。2 時間後の生細胞数測定では、0.3~9.09 $\mu\text{L}/\text{mL}$ の濃度範囲全域で生存率が 100% から 25% に低下したが、24 時間後の生細胞数測定では、さらにわずかに減少し、同じ濃度範囲の全域で生存率は 84.5~6.2% であった。陽性および陰性対照は、期待された応答を示した。

赤血球が物質を遺伝毒性物質に代謝活性化する能力を検討する一環として、N-VP による姉妹染色分体交換 (SCE) 誘導能が、全血および単離ヒトリンパ球の培養試料を用いて評価された (Norppa; Tursi 1984)。両試験系ともにわずかな SCE が観察された。しかし、試験方法や実際のデータについての報告はなされていない。N-VP の遺伝毒性が陰性であるとする例が大勢であることを考慮すると、十分な報告のないこの試験で SCE がわずかに増加したようであると主張されていることを重大に考える必要はないと思われる。

4.1.2.7.2 キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を用いた試験

キイロショウジョウバエを用いた伴性劣性致死試験の結果は陰性のようである (Knaap et al., 1985)。N-VP を毒性濃度までの範囲で注入投与したと報告されている。それ以上の詳細は報告されていない。

4.1.2.7.3 哺乳動物系における *in vivo* 試験

標準遺伝毒性試験、すなわち最新の規制ガイドラインに従って実施された小核試験が 1 試験だけ実施され、N-VP が *in vivo* で遺伝毒性を示すかどうかについて検討されている (BASF, 1993)。各群雌雄各 5 匹の NMRI マウスに、蒸留水を媒体とした N-VP (純度 99.8%) が 0、150、300、もしくは 600 mg/kg の用量で強制経口投与された。600 mg/kg 群のマウスは 16、24、もしくは 48 時間後に屠殺された。低濃度側の群、陽性対照群、陰性対照群の屠殺は 24 時間後に限って行われた。

N-VP 投与群の全例で、呼吸不整、立毛、うずくまり姿勢などの明らかな毒性徴候がみられた。さらに、最高用量群の動物の一般状態は不良であった。P : N 比〔訳注：多染性赤血球(polychromatic erythrocyte)と正染性赤血球(normocromatic erythrocyte)の比で骨髄毒性の指標となる〕は変化がなかった。N-VP 投与群のいずれの例にも小核の増加はみられなかった。陽性および陰性対照は、期待された応答を示した。

ラットを用いた *in vivo* DNA 結合試験も実施された (セクション 4.1.2.1.1 参照)。IRI (1985) が実施した、各群雄 3 匹のラットに放射性標識 N-VP を腹腔内注射した試験において、N-VP またはその代謝物が、ラット肝蛋白質、DNA または RNA に結合することを示す所見はみとめられなかった。N-VP が誘発するがんに関する標的組織は肝臓である。

4.1.2.7.4 ヒトにおける試験

ヒトにおける N-VP の遺伝毒性を直接評価した試験はない。

4.1.2.7.5 変異原性の要約

広範囲の *in vitro* 系で行われた遺伝毒性試験、および十分な計画に基づいて実施された 1 件の *in vivo* 試験において N-VP は一貫して陰性であった。このことから、N-VP は遺伝毒性物質ではないと結論できる。

4.1.2.8 がん原性

4.1.2.8.1 動物における試験

最新の規制指針に準拠した 2 年間の生物検定法により、Sprague-Dawley ラットにおいて

N-VP の発がん性が検討されている (BASF, 1992b; Klimisch et al.,1997a)。Sprague-Dawley ラット各群雌雄各 100 匹が、0、5、10、20 ppm (23、46、92 mg/m³) の N-VP 蒸気 (純度 99.9%、安定剤として Kerobit を 3 ppm 含む) に 2 年間全身曝露された。これらのラットのうち、各被験物質曝露群の雌雄各 20 匹、対照群の雌雄各 10 匹が 3 か月後に屠殺され、さらに対照群を含む全群で各群雌雄各 10 匹が 12 か月後に屠殺された。対照群を含む全群の各群雌雄各 10 匹から成る第 3 群は、18 か月間曝露後に 6 か月間回復期間が設けられた。残りの各被験物質曝露群の雌雄各 60 匹および対照群の雌雄各 70 匹は、24 か月間の曝露後に屠殺された。この試験の方法および非腫瘍性所見は、セクション 4.1.2.6.1 に詳細が報告されている。

曝露による死亡例はなかった。12 か月後に初めて腫瘍性変化が明らかになった。この群の動物では早期死亡例はなかった。この時点では肉眼的変化はみられなかったが、顕微鏡検査では、最高用量群の雄 1 例で肝細胞腺腫、低用量群の雄 1 例および最高用量群の雌雄各 1 例で鼻腔腺腫の存在が明らかになった。これらの腺腫は呼吸上皮から生じたか、または鼻腔前部の粘膜下腺から生じたものであった。最高用量群では、この時点で呼吸上皮の扁平上皮化生もみられた (セクション 4.1.2.6.1 参照)。

18 か月間の曝露と 6 か月間回復期間を経たラットのうち、計画屠殺時点までの生存例は雄で 7、5、4、6 例、雌で 2、5、3、6 例であった。低用量群の雄 2 例ならびに高用量群の雄 1 例および雌 2 例で、肝臓に腫瘍が肉眼的に認められた。顕微鏡検査では、雄 1、2、0、1 例、雌 0、0、0、2 例で肝細胞がんがみられ、中間用量群の雄 1 例および高用量群の雌雄各 2 例で鼻腔腺腫がみられた。試験終了までの生存例および早期死亡例の双方で所見がみられた。

試験終了までの各群の生存例の総数は雄で 39、38、30、34 例、雌で 29、25、26、26 例であった。24 か月間の N-VP 曝露を受けたラットでは、肝臓で肉眼的に認識できる腫瘍の発現率に明らかに用量相関性があった。腫瘍がみられたのは雄で 1、3、4、15 例、雌では 2、4、5、25 例であった。10 ppm 群の雄 1 例、20 ppm 群雌雄各 2 例の鼻腔にも、腫瘍がみられた。肝臓で肉眼的に最も目立った腫瘍は、顕微鏡検査で肝細胞がんと確認された。顕微鏡的に認識できた肝細胞がんの発現数は雄で 1、6、5、17 例、雌では 1、3、6、26 例であった。

鼻腔腺腫と腺がんがみられたのは N-VP 曝露群のみであり、発現率には明らかに用量相関性があった。腺腫はほとんどが鼻腔の前部に位置しており呼吸上皮から発生したか、または呼吸上皮に覆われた領域の粘膜下腺から発生したように思われた。腺腫の発現数は雄で 0、8、9、10 例、雌で 0、2、8、12 例であった。それに対して腺がんはほとんどが嗅上皮に覆われた領域に発生し、嗅上皮から発生したか、または粘膜下腺から発生したように思

われた。多くは分化の程度が低かった。腺がんは雄で 0、0、4、6 例、雌では 0、0、0、4 例で発生した。腺腫と腺がんは形態的に異なっており、別々の腫瘍型であることが示された。

顕微鏡的に認識可能な腫瘍は喉頭でもみられた。これらは扁平上皮がんと診断され、最高用量の雌雄各 4 例でみられた。

この試験から、3 ppm の Kerobit を含む N-VP はラットに対して発がん性を有しており、肝細胞がん、鼻腔の腺腫および腺がん、そして喉頭の扁平上皮がんを誘発することが明確に示された。最低用量の 5 ppm でも腫瘍発現数の増加がみられたことから、この試験では NOAEL を求めることはできなかった。

Sprague-Dawley ラットの雌 10 匹を、45 ppm の安定剤無添加 N-VP（純度 99.7～99.9%）に 1 日 6 時間、週 5 日で 3 か月間曝露した後、21 か月間回復期間を設けた試験でも、腫瘍性変化がみられた（BASF, 1987c; Klimisch et al., 1997a）。この試験では、肝臓だけが検査された。試験終了までの生存例は被験物質曝露群で計 6 例、対照群で計 4 例であった。非腫瘍性変化についてはセクション 4.1.2.6.1 で考察している。被験物質曝露群動物のうち試験終了までの生存例 4 例で腫瘍性変化がみられた。早期死亡例および対照群動物では腫瘍性変化はみられなかった。腫瘍性変化のみられた 4 例のうち 2 例の病変は腫瘍性結節であり、この新生物の細胞ではグリコーゲン量の増加がみられた。残りの 2 例の病変は肝細胞がんであり、1 例のがん細胞ではグリコーゲンの増加がみられた。Kerobit 無添加の N-VP を吸入したラットにおいて 3 か月間の曝露だけで肝腫瘍が発現したことから、比較的短期間の曝露後に発現する肝病変は N-VP の曝露を続けなくても腫瘍形成に進行する可能性があることが示され、不可逆的な変化が最初の 3 か月間で起こることが示唆された。これは上記の 2 年間試験で観察された肝腫瘍は N-VP によるもので、添加された少量の Kerobit によるものではないという結論を支持するものである。このような変化は肝臓での細胞毒性により発生している可能性があるが、不可逆な変化の詳細な性質は不明である。肝腫瘍が何らかの種特異的な機序により発生している可能性がある。N-VP はラットやマウスに対して明らかに肝毒性を有しているが、ハムスターは、ラットやマウスで強い肝毒性を引き起こす用量でも肝毒性の徴候をほとんど示さない。この明らかな種差の根底にある機序は、やはり不明である。

経口および経皮投与における N-VP のがん原性試験は実施されていない。

その他

N-VP による肝オルニチンデカルボキシラーゼ（発がん活性の早期マーカーと考えられて

いる) 誘導能が、簡潔に検討されており、雄ラットの腹腔内に N-VP ジメチルスルホキシド溶液が 0、5、23、65 mg/kg の用量で注入された (van de Zande et al., 1986)。その結果、N-VP により当該酵素が誘導されたが、酵素活性は用量の増加につれて低下するようであった。N-VP の *in vivo* における発がん活性の点からみると、このような結果の意義は不明である。

BALB/3T3 マウス細胞を用いた細胞形質転換試験でも陰性の結果であった (Litton Bionetics 1980c)。この試験では、0.1 nL/mL~0.5 µL/mL の範囲の濃度が設定され、生存率は 83~52.3%であった。フラスコ当たりの形質転換細胞増殖巣の数には、わずかに漸増がみられたが、細胞増殖巣の数は最高用量でもフラスコ 15 個当たり 9 個にすぎず、一方、陰性対照ではフラスコ 15 個当たり 4 個であり、この増加は統計学的に有意ではなかった。それに対して陽性対照の細胞増殖巣の数はフラスコ 1 個当たり約 4 個であった。

動物におけるがん原性所見のヒトにおける意義

上記の試験の結果から、N-VP (Kerobit 添加、無添加のいずれも) はラットに対して発がん性があり、肝細胞がんを誘発する。Kerobit 含有 N-VP は鼻腔の腺腫および腺がんならびに喉頭で扁平上皮がんも誘発する。ラット肝細胞を用いた *in vitro* UDS 試験などの包括的な一連の遺伝毒性試験では、遺伝毒性活性はみられなかった。N-VP およびその代謝物は *in vivo* で肝蛋白質、DNA、RNA のいずれとも結合しないことも示された。そのため、上記の腫瘍は非遺伝毒性的機序で発生しているに違いない。しかし、肝臓腫瘍と鼻腔腫瘍の両方について、その発現に関係する機序は明確にはなっていない。

まず肝臓について考えると、肝細胞腫瘍が単に慢性細胞毒性で発生したのであれば、45 ppm の N-VP に 3 か月だけ曝露されたラットに腫瘍が発生することはありそうもない。実際に腫瘍が発生したのであるから、性質が不明な不可逆的な変化が比較的短期間の曝露により起こったとも考えられる。鼻腔および喉頭腫瘍の発現機序にも多少の不明な点がある。慢性的な組織炎症がある程度影響しているかもしれないが、ほかの要素が関係している可能性もある。アクリル酸メチルのような化学物質により鼻腔に N-VP によるものと同じような非腫瘍性病変が誘導されるが、2 年という長期間の吸入曝露試験では刺激性のある用量でも腫瘍は誘導されなかった (Reininghaus et al., 1985)。アクリル酸エチルも鼻腔刺激性物質であるが、長期 27 か月間吸入毒性試験では腫瘍形成性はみられなかった (Miller et al., 1985)。

したがって全般的にいうと、N-VP 蒸気誘発性の腫瘍が形成される毒性学的過程は不明である。ラットにおける N-VP 吸入による発がん性に関する無作用量も不明である。N-VP

蒸気誘発性腫瘍の発現の機序が不明確であることを考えると、逆の証拠がない状況では、このような腫瘍形成がヒトの健康にとっても関連があると考えられるべきである。

4.1.2.8.2 ヒトにおける試験

N-VP を扱う作業員の死亡率に関する調査は実施されておらず、横断的罹病率調査が 1 件あるが、そこから N-VP のヒトに対する発がん性に関して有用なデータを得ることはできない。

4.1.2.8.3 がん原性の要約

N-VP のヒトにおける発がん性についての情報は得られていない。N-VP 蒸気 (Kerobit 添加、無添加ともに) には明らかにラットに対して発がん性があり、肝臓、鼻腔、喉頭で腫瘍を誘発した。ほかの実験動物ではがん原性試験は行われていない。興味深いことに、3 か月間の N-VP 曝露だけでラットの肝臓に不可逆的な変化が生じ、N-VP 曝露をそれ以上続けなくても 2 年後には肝腫瘍へと進展する。N-VP は遺伝毒性活性を示さなかった。しかし、わずか 3 か月の曝露期間で肝腫瘍が誘発されたという所見から、肝腫瘍、ないしは鼻腔および喉頭腫瘍も、単純な慢性的組織損傷や炎症以外の要因が関わる過程によって発生することが示唆される。総じて見ると、N-VP 蒸気が誘発する腫瘍の形成にどのような毒性学的過程が関わっているかは不明である。また、ラットにおける N-VP の吸入曝露による発がん性に関する無作用量も不明である。N-VP 蒸気が誘発する腫瘍の発現の機序が不明確であることを考えると、逆の証拠がない状況では、このような腫瘍形成がヒトの健康にとっても関連があると考えられるべきである。経口および経皮投与における N-VP の発がん性は検討されていない。

4.1.2.9 生殖毒性

4.1.2.9.1 動物における試験

受胎能および一般生殖能

受胎能や生殖能に特化した試験は行われていないが、反復投与試験 (詳細はセクション 4.1.2.6.1 を参照のこと) では、実験動物の生殖器官に対する N-VP の有害な影響は示されなかった。ラットの 2 年間吸入毒性試験 (BASF, 1992b) では、精巣、前立腺、精囊腺、

精巣上体、または子宮、卵巣の包括的な顕微鏡検査が、対照群および最高用量（20 ppm）群について行われた。これらの組織については、ラットの 3 か月間飲水投与試験（BASF, 1986d）でも、対照群および最高用量（8.3 mg/kg/日）群で顕微鏡検査が行われた。ラットを最高 300 mg/m³ の濃度の N-VP エアロゾルに 4 週間吸入曝露した試験（FDRL, 1976）では、精巣、精巣上体、卵巣、子宮について、またラットを 45 または 120 ppm の N-VP に最長 3 か月間吸入曝露した試験（BASF, 1986a）では精巣、卵巣、子宮について、またラットおよびマウスを 45 ppm の N-VP に 7 週間吸入曝露した試験（BASF, 1988e, f）では精巣について、組織検査が行われた。いずれの試験においても、これらの組織で被験物質投与による有害な影響が生じることを示す徴候はみられなかった。運動機能障害も、動物の交尾能を身体的に低下させることにより受胎能に影響を及ぼす可能性があるが、N-VP が運動機能に有害な影響を及ぼすことを示唆する徴候はない。したがって全般的にいうと、N-VP が受胎能に有害な影響を及ぼす可能性を示唆する徴候はないと考えられる。

発生毒性

N-VP の発生毒性は、ガイドラインに則した吸入毒性試験で検討された。その試験では、交配済の雌 Wistar ラット 25 匹が、0、1、5、20 ppm（4.6、23、92 mg/m³）の N-VP（純度 99.8%）に妊娠 6 日目から 19 日目まで 1 日 6 時間（全身）曝露された（BASF, 2001; 未公表データ）。一般状態の観察は、試験の最後まで最低 1 日 1 回、また体重測定は 2 日または 3 日ごとに行われた。母動物の病理組織学的検査は、肉眼検査、および子宮卵巣に特定した組織検査に限られた。胎仔の体重測定や生存率の観察を含め、胎仔の外表検査が行われた。さらに胎盤重量と胎盤の一般状態が評価され、臍帯、胚膜、羊水が検査された。胎仔の半数は骨格異常検査に用いられ、半数が軟組織異常検査に用いられた。

死亡例は発生しなかった。母動物で外面的な毒性徴候がみられたのは 20 ppm 群のみで、最初の 2 曝露日に 3 例で流産、曝露 19 および 20 日目に最大 4 例で生殖器領域の尿による汚れなどがみられた。高用量 2 群では、被験物質曝露による母動物体重の正味増加量（20 日目の最終体重から未切開子宮重量を差し引き、さらに 6 日目の体重を差し引いた値）の顕著な減少がみられ、20 ppm 群では対照値に比べて 68% 低く、5 ppm 群では 31% 低かった。1 ppm 群では体重指数に影響はなかった。いずれの群でも肉眼病理組織学的所見はなく、妊娠子宮重量、平均黄体数、平均着床痕数にも、着床前／着床後胚損失率、吸収胚数、および生存胎仔数にも群間差はみられなかった。この試験ではおそらく 20 ppm 群で有意な母体毒性が発生したという見解は、15 ppm の濃度でラットを 1～3 週間反復曝露した試験（詳細はセクション 4.1.2.6.1 を参照のこと）で生化学的・血液学的変化がみられ、肝臓で病理組織学的変化がみられることがあったという結果により支持されている。5 および 20 ppm 群での体重増加量抑制の程度は、非妊娠ラットを用いた反復吸入毒性試験

(セクション 4.1.2.6.1 参照) でほぼ同等の濃度について報告されている体重増加抑制の程度を超えているということも注目される。この所見から、妊娠動物は N-VP 吸入毒性に対する感受性が非妊娠動物より高い可能性が示唆される。

胎仔に現れた被験物質投与に起因する影響として、20 ppm 群で胎仔体重のわずかな減少 (対照値より 9%低値) がみられた。これに伴い、後頭上骨または舌骨に骨化遅延 (成熟遅延を示す) および波状肋骨 (母体毒性を示す) の発現頻度が上昇した。一腹児当たりの影響を受けた胎仔の割合 (平均値) は、対照群、低用量群、中間用量群、高用量群で以下のような数字であった。すなわち、後頭上骨の骨化遅延が 6.3、11.5、11.8、22.4% [背景対照値の範囲 (HC) 4.0~9.7%]、舌骨の骨化遅延が 0.7、1.4、0.6、5.8% (HC : 0~0.8%)、波状肋骨が 0.8、4.2、4.2、15.4% (HC : 1.4~5.5%) であった。こうした所見は発育遅延と整合している。1 および 5 ppm 群では胎仔に毒性徴候は認められず、いずれの用量でも N-VP 誘発性の特異的奇形は何も認められなかった。

全般的にいうと、この試験では N-VP により特異的奇形が誘発されることはなく、母体毒性がない濃度では胎仔毒性もないことが示された。母体毒性の NOAEL は 1 ppm であり、胎仔毒性の NOAEL は 5 ppm であることが示された。さらに、妊娠ラットの N-VP の毒性に対する感受性は、非妊娠ラットより高い可能性があることが示された。

4.1.2.9.2 ヒトの生殖能に関する試験

ヒトの生殖能を検討する試験は、行われていない。

4.1.2.9.3 生殖毒性の要約

ヒトの生殖能に対する N-VP の影響に関する情報は得られていない。N-VP が受胎能にどの程度有害な影響を及ぼすかに関して特化した試験は、実験動物においても行われていないが、反復投与試験では、N-VP が生殖器官に有害な影響を及ぼすという徴候はなかった。ラットおよびマウスを最高で 45 ppm の N-VP に 3 か月間吸入曝露した試験、またラットを最高で 20 ppm の N-VP に 2 年間吸入曝露した試験において、生殖器官の検査が行われた。生殖器官の検査は、ラットに N-VP を最高 8.3 mg/kg までの用量で 3 か月間飲水投与した試験でも行われた。これらの結果に基づくと、N-VP が受胎能に有害な影響を及ぼし得ることを示唆する徴候はなかった。

ラットを用いた吸入毒性試験で発生毒性が評価された。母体毒性を示さない濃度では、N-

VP が特異的な奇形を誘発したり、胎仔毒性を示したりする徴候はみられなかった。母体毒性の NOAEL は 1 ppm、胎仔毒性の NOAEL は 5 ppm であることが示された。さらに、妊娠ラットの N-VP の毒性に対する感受性は、非妊娠ラットより高い可能性があることが示された。