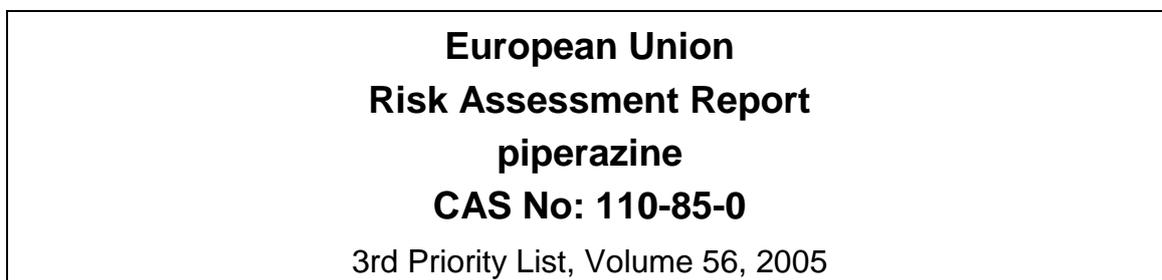
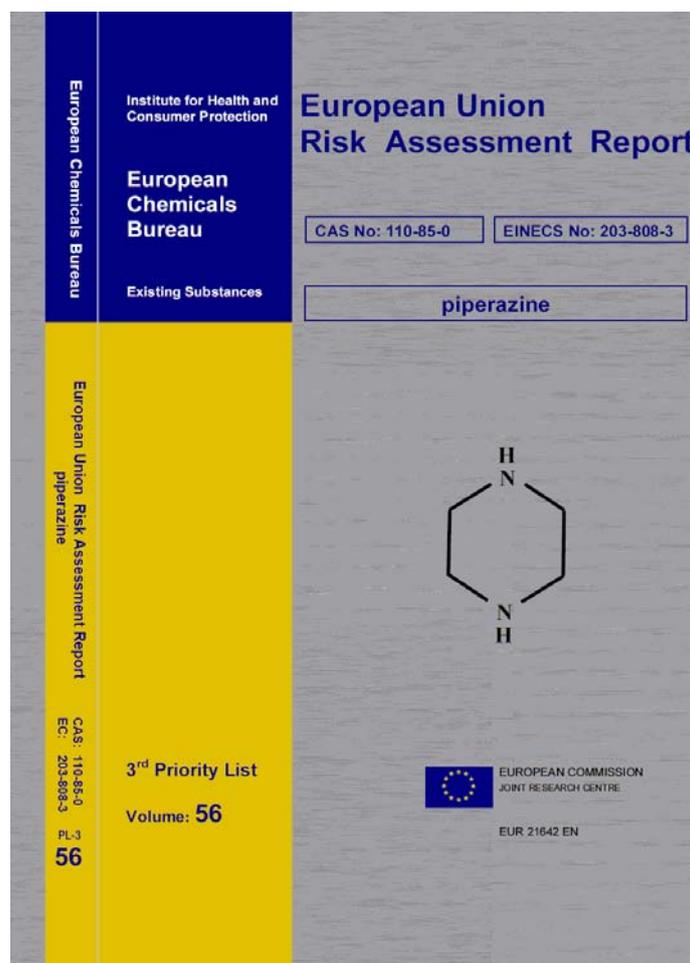


部分翻訳



欧州連合
リスク評価書 (Volume 56, 2005)
ピペラジン



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、piperazine 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/piperazinereport324.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反応関係

ほとんどの評価項目について、ピペラジンそのもので検討した試験データは得られていないが、この RAR で引用している種々の試験は、ピペラジンの塩類や六水和物を用いて実施されている。ピペラジンは水溶液ではかなり強い塩基であり、それは、塩酸、リン酸のような酸との塩、および比較的強い有機酸であるクエン酸との塩では解離度が高いことを示している。pH 依存性の効果に加えて、溶解度にも、塩の種類によって差がある。したがって、例えば経皮曝露時の生物学的利用能には多少の差があるかもしれない。しかし、それら塩類および水和物の毒性学的性質に顕著な相違があるという情報はデータベースにはない。したがって、ここでの評価の論拠としてピペラジンの塩の毒性学的データを使用してもよいと思われる。

4.1.2.1 トキシコキネティクス、代謝、分布、および排泄

ピペラジンのニトロソ化についての研究には相当な努力がなされてきたが、ピペラジン自体の吸収、分布、代謝、排泄についてはあまり知られていない。そのため、経皮吸収または気道吸収について報告した試験は見当たらない。

4.1.2.1.1 動物における試験

主要な試験

ブタを用いたピペラジン二塩酸塩の吸収、分布および排泄に関する試験が最近実施された (Morrison, 1997)。胃内挿管法により、雌雄各 2 匹のブタに ^{14}C -ピペラジンが設定用量 300 mg/kg 体重で単回投与され、2 匹では放射性標識物質の尿および糞便中への排泄が最長で 7 日間追跡され、他の 2 匹は投与 12 および 24 時間後に屠殺され、肝臓、腎臓、筋肉、

脂肪、皮膚中の放射性標識物質の測定が行われた。投与後の最高血漿中濃度到達時間は 1 時間で、その後血中から速やかに消失した。7 日間で総放射活性の 56%が尿中に排泄され、そのうち 46%が最初の 24 時間で排泄された。観察期間には 16%が糞便中に排泄されたが、糞便の場合でも、その多く (8%) が最初の 24 時間で排泄された。ケージのごみや洗浄水中に検出された残りの放射活性も入れると、7 日後で総投与量の約 4 分の 1 が体内に残留していると考えられる。採取された組織で最も放射活性が高かったのは、腎臓と肝臓であった。しかし、腎臓中の放射活性の消失は速く、残留放射活性は投与 12 時間後の値のわずかに 3%ほどにすぎなかったが、肝臓、骨格筋、脂肪、皮膚からの排泄はかなり遅く、7 日後の残留量は 12 時間後の値のそれぞれ 10、11、24、25%であった。腸肝循環や胆汁排泄に関する情報はどちらも無い。薄層クロマトグラフィー (TLC)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、液体クロマトグラフィー - 質量分析法 (LC-MS) によって、尿、糞便、そして組織中に存在する放射性標識物質の特性解析が行われ、その結果、主成分は初めのうちはピペラジン未変化体であることが分かった。0~24 時間で採取された尿の HPLC または TLC 分析では、放射活性の 82~83%を占めるピークがピペラジンと同じ溶出位置で認められた。組織中の放射活性残留物質の分析に LC-MS を使用することにより、クロマトグラフィー分析結果の信頼性が確認されたが、HPLC と TLC のデータには多少の相違がみられた。ピペラジン由来の放射能標識生成物の性質は特定されなかったが、尿中のピペラジン代謝物の割合は時間とともに増加し、HPLC および TLC による判定では 144~168 時間に採取した尿中の残留放射活性の約 40~50%に達した。腎臓では、未同定代謝物質分画の放射活性が、投与 12 時間後では残存放射活性の約 20%であったものが、96 時間後には 80~90%まで増加した。呼気中の二酸化炭素が採取されなかったため、この代謝最終産物を生成するピペラジンの副次的な代謝転換反応が存在することは否定できない。

支持データ

雌のニワトリにクエン酸ピペラジンを 1 羽当たり 0.9 g の用量で経口投与した後の消失半減期は、TLC により試料を精製してダンシル誘導体を HPLC で測定する方法によれば、29 時間であった。投与 2 日後に最高で卵 1 kg 当たり 1.5 mg のピペラジンが検出された。代謝物の測定は実施されなかった (Leuenberger et al., 1986)。

以前に行われた家禽およびブタにおける C-14 標識ピペラジンの代謝物の同定を目的とした試験では、両動物種で代謝物が類似していることが示され、また、ピペラジンの多くは多糖類や六炭糖類、および少量だがアミノ酸といった化合物に代謝されることが標識化合物により示された (Rutter and Voelker, 1975)。おそらく標識分解産物が代謝経路の中で組み込まれていったものと考えられる。また、標識代謝産物の同定が TLC を用いて標準物質の R_f 値との比較により行われており、その結果についてはほかの方法による検証が必

要である。さらに、動物組織では投与 24 時間後に「痕跡量」が検出されたにすぎないと報告されているが、そのあとにブタを用いて一層綿密に行われた試験 (Morrison, 1997) では、7 日後でも投与標識化合物の 23% の残留が認められた (上記参照)。

ピペラジンのニトロソ化

亜硝酸塩存在下でピペラジンをニトロソ化して N-モノニトロソピペラジン (NPZ) を生成する反応の速度は速いが、ジニトロソ誘導体の生成速度は遅い。高用量のピペラジン (3 g) に加えて亜硝酸塩 (400 mg) を与えられたイヌでは、生体内でアミンのニトロソ化が起こり、N,N'-ジニトロソピペラジン (DNP) の排泄がみられた (Sander et al., 1973; Sander et al., 1975)。Sander ら (1975) によれば、ピペラジンと亜硝酸塩を約 25~50 mg/kg の用量で同時投与したラットの胃では、ごく少量の DNP (変換率 1%未満) を検出できただけであった。

これに対して Hecht ら (1984) は、ラットに亜硝酸塩 13 mg とピペラジン 1.7 mg を単回投与したときの DNP の収率は 38%であったと述べているが、これはジニトロソ化合物の直接測定に基づくものではなく、測定された代謝物、すなわち N-ニトロソ (2-ヒドロキシエチル) グリシン、N-ニトロソジエタノールアミン、3-ヒドロキシ-N-ニトロソピロリジンがもっぱら N,N'-ジニトロソピペラジンから生じるという、未検証の前提に基づくものである。

その後、Tricker ら (1991) は、N-ニトロソジエタノールアミンも 3-ヒドロキシ-N-ニトロソピロリジンも、実際には NPZ の代謝物でもあることを示した。重要なことは、ニトロソ化速度は硝酸塩濃度の二乗に比例することから、濃度の低下に伴い収率が急激に減少し、アスコルビン酸のような還元剤があるとさらに収率が相当程度低下する (Sander et al., 1975) ことである。また、げっ歯類の胃内 pH はアミンのニトロソ化に至適の pH に近い (Mirvish, 1982) が、かなり酸性度の高いヒトの胃ではそうではない。最後に、上記の試験で用いられた亜硝酸塩の用量は、成人男性への亜硝酸塩の負荷量が Tannenbaum (1978) により約 1.1~1.7 mg/kg と推定されていることから、非現実的に高いと考えるべきである。より最近の推定ではかなり低い値が得られており、平均値は 0.04~0.06 mg/kg の範囲であった (Fernlöf and Darnerud, 1996)。したがって、70 kg のヒトに対する亜硝酸塩負荷量は、上記のげっ歯類試験で用いられた亜硝酸塩負荷量を数桁下回ることになる。

ピペラジン市販品には 0.06~0.08 ppb の範囲で痕跡量のモノニトロソピペラジンが含まれている [E. Martinsson, アクゾノーベル (AkzoNobel) 社内報] が、この総説での重要性は

ないと考えられる。

4.1.2.1.2 ヒトにおける試験

ピペラジンの塩を経口投与されたヒトでは尿への排泄速度に大きな個体差がみられ、5 時間目までに投与量の約 15%、24 時間目までに 30%が排泄された (Rogers, 1958)。ピペラジンの分析には、1,2-ナフトキノン-4-スルホン酸 (Folin アミノ酸試薬) による比色法が用いられたが、この試薬はピペラジン特異的ではないため、代謝物が存在するかどうかについて推測することはできない。

同様の比色定量法により、クエン酸ピペラジン 3.5 g の単回経口投与を受けたヒト被験者 5 名におけるピペラジンの尿中排泄が研究された。24 時間目までに投与量の 60~75%が排泄された (Hanna and Tang, 1973)。24 時間採取尿中の総回収率は 15~75%と幅があった。

ピペラジン 480 mg を投与された志願者 4 名では、ピペラジン未変化体の 16 時間尿中回収率は 19~35%であり、その後の 24 時間で 2~3%が回収された (Bellander et al., 1985)。

ピペラジンのヒト糞便中排泄に関する情報は見つかっていない。

N-モノニトロソピペラジンの産生

ピペラジン 480 mg の単回経口投与を受けたヒト志願者において胃液中 NPZ 産生量を測定した結果、0.08~0.59 $\mu\text{g/mL}$ であった。NPZ は 24 時間で最大 4.7 μg が尿中に排泄された (Bellander et al., 1981)。著者らはその後、生成する可能性のあった最高 NPZ 総量を約 50 μg (Bellander et al., 1987)、つまり変換効率 0.01%と推定した。しかし、ジニトロソ化合物は、胃液、血液、尿のいずれにおいても検出されなかった (検出限界: 0.004 $\mu\text{g/mL}$)。Hecht と共同研究者 (Hecht et al., 1984) が DNPZ の単回経口投与では投与量の約 20%が DNPZ 未変化体として排泄されたと述べていることを考慮すると、投与された個体では、ピペラジンから一層強力な発がん物質である DNPZ が産生される速度は極めて遅かったにちがいない。

その後の試験では、曝露を受けた作業員の尿から NPZ が検出され、その際、休憩区域では 12 時間でのピペラジンの時間加重平均濃度が 0.03 未満~1.7 mg/m^3 であった。尿中に排泄された NPZ の総量は 1 人 2 時間当たり 0.7~4.7 μg であった。またこの例では、

DNPZ は検出されなかった (Bellander et al., 1987)。曝露期間中と 12 時間目までのピペラジンの総排泄量は 1 人当たり 70~4,700 µg であった。Bellander ら (1985) の知見に従い、吸収量の最大 38% がピペラジン未変化体として排泄されるとして補正すると、吸収量は 184~12,400 µg に相当する。このことから、慢性的曝露時の用量が低くなると変換率が高くなるが、NPZ 生成効率は吸収量の増加に伴って低下することが示された。最高曝露量での変換効率について 1% という慎重を期した推定値を用いると、最大で 124 µg の NPZ が産生されたということになる。これは、ラットに投与された NPZ 量の 10.5% が未変化体として尿中に排泄されたという所見 (Tricker et al., 1991) と、2 倍以内という妥当な範囲で一致している。詳細はセクション 4.1.2.8.3 および 4.1.3.1.6 を参照のこと。

4.1.2.1.3 トキシコキネティクスの要約

ブタにおいては、ピペラジンは消化管から容易に吸収され、吸収された化合物の大部分はピペラジン未変化体として最初の 48 時間で排泄される。曝露評価でも経口吸収率 100% が使用されるが、経皮吸収や呼吸器吸収に関するデータは見つかっていない。経皮および吸入曝露では、吸収率を 100% に設定する。

ピペラジンおよびその代謝物の主要な排泄経路は尿であり、比較的少量 (16%) が糞便から回収されたが、単回経口投与量の約 4 分の 1 が 7 日後も組織に残留した。その中の一部が未同定の変換産物のようである。N-モノニトロソピペラジンのほかに同定された代謝物はない。

ヒトにおけるピペラジンおよびその代謝物の吸収および尿排泄の動態は、ブタでの動態におおよそ似ているようであるが、代謝物への変換の特性や程度は不明のままである。

生体内では亜硝酸塩の存在下でピペラジンから少量のニトロソ化合物が生成することが、ヒトばかりでなく実験動物の消化管でも示された。

4.1.2.2 急性毒性

4.1.2.2.1 動物における試験

哺乳類ではピペラジンの急性毒性は弱い。

Sprague-Dawley ラットを用いて、ピペラジンの急性吸入毒性試験が行われた (BASF, Gewerbehygiene und Toxicologie, 1980)。ピペラジンの細片を満たしたガラス製フラスコを 20°C のウォーターバス中に置き、1 時間当たり 200 L の空気をピペラジン細片の中を

通過させた。粉塵粒子と揮発性ピペラジンを含む空気を、ラット計 12 匹を入れたガラス製チャンバーに通した。曝露時間は 3、10、30 分、1、3、7 時間であった。動物は曝露後 14 日間観察された。死亡例はなく、剖検で症状がみられたものもなかった。ピペラジンの濃度は記載されていない。

マウスとラットにおける急性経口 LD₅₀は 2.4~4.3 g (ピペラジン塩基として) /kg 体重の範囲と報告されている (Cross et al., 1954; Martin, 1993)。試験のほとんどは時代が古く、GLP も最新のガイドラインの基準も満たしていない。しかし、BASF により実施された、ガイドライン準拠試験に匹敵する質の試験が一つある [BASF AG, Department of Toxicology, (79/562) 1980 年 4 月 30 日付未公表データ]。ピペラジンの「細片」が 0.5% カルボキシメチルセルロース水溶液に溶解され、Sprague-Dawley ラット各群雌雄各 5 匹に 1,000、1,210、1,780、2,610、3,830 mg/kg 体重の用量で投与されたあと 14 日間経過観察された。低用量側 3 群では死亡例はなく、概略の経口 LD₅₀ は雌雄ともにピペラジン塩基として 2,600 mg/kg であった。

1954 年から行われた試験では、純粋アジピン酸塩および工業用アジピン酸塩の急性経口毒性を工業用ピペラジン水和物と比較するため、化合物が雄アルビノマウスに、5%アラビアゴム粘稠液を溶媒として強制経口投与された。上記 3 種の調製物の LD₅₀ はピペラジン塩基としてそれぞれ 4.2、3.0、1.9 g であり、わずかに差がみられた (Cross et al., 1954)。

モルモットに 3 ピペラジン 2 クエン酸塩をピペラジン塩基として約 200 mg の用量で単回腹腔内投与したとき、強縮性痙攣発作を起こして死亡する例が発生したという報告 (Ratner et al., 1955) についても、ネコ科の種でピペラジンにより同様の反応が誘発されたこと (Rettig, 1981)、ならびにヒトてんかん患者の発作閾値がピペラジンにより低下したという事実から考えて、触れておく価値がある。

Union Carbide 社の技術データシートでは、ウサギにおける経皮 LD₅₀が 4 g/kg と報告されている (Trochimowicz et al., 1994 において引用)。

セクション 4.1.2.6.1 も参照のこと。そのセクションの「データの不一致 (神経毒性)」の項目下で引用されている試験の中には、投与日数が少ないために急性毒性と考えられるものもあった。

4.1.2.2.2 ヒトにおける試験

ピペラジンの医薬品としての使用経験から、中程度から弱い急性毒性があることが指摘さ

れている。致死量に関するデータは見当たらないが、19世紀の終わりに痛風に対して使用されたことがあり、その際、1回の用量が時には10g（体重70kgと仮定すると144mg/kgの用量に相当する）を超過することがあった（Stewart, 1894; Slaughter, 1896）。

セクション4.1.2.6.2では、数日の投与によりヒトで神経毒性がみられたことを報告しているいくつかの試験について考察している。これらの例の大多数でピペラジンが5～7日間投与された。しかし、12歳の女児の1例では、クエン酸ピペラジンの単回投与を24mg/kgのピペラジン塩基に相当する用量で受けた後、水平眼振、全身性筋力減退（患者は介護なしには立つことも座ることもまったくできなかった）、緊張低下、腱反射の減弱が観察された（Bomb and Bedi, 1976）。24時間後にはそれらの症状は消失した。BelloniとRizzoni（1967）は、それによく似た、44mg/kgのピペラジン塩基への曝露を3日間（すなわち、計132mg/kg）受けた4歳児の例を報告している。89名の小児において、総「1日」用量がピペラジン塩基として90～130mg/kgに相当するピペラジン六水和物を2回に分けて（12時間おき）投与し、その1日後にEEGの変化を調べた試験報告も1件（Padelt et al., 1966）ある。これらの小児では、明らかな神経毒性の徴候は観察されなかったが、37%の小児で、全身性発作の前兆を示すEEG波形を含む有意な病理学的EEG変化がみられた。

ピペラジンは駆虫薬として世界中で極めて多くの人々の治療に用いられており、わずか2例において1～3日間の曝露（それぞれ24および132mg/kg）で比較的重度の症例が報告されているだけであることを考慮すると、これらの症例では、例えば腎臓もしくは肝臓の機能不全、またはおそらく酵素多型性に関するなにがしかのまれな異常により感受性が亢進したのかもしれない。しかし、90～130mg/kgのピペラジン塩基の投与（1日で2回に分けて投与）を受けた89名の小児の37%にEEG変化がみられており、こうした効果を感じ性が極端であったためとして説明することはできない。ピペラジンにはGABA受容体作動性があると考えられており、それがEEG変化の理由を説明する上で妥当と思われる機序である。さらに、総用量でピペラジン塩基としておおよそ200mg/kgを（5～7日間に分けて）投与した後に、神経毒性症状を示したという36例の報告があり、さまざまな毒性性質が記載されている。小児の方が成人より感受性が高い可能性が残っているが、ヒトにおける急性曝露神経毒性に関するLOAELは110mg/kgと考えられる。

4.1.2.2.3 急性毒性の要約

げっ歯類においてピペラジンは経口、経皮、皮下投与時に弱い急性毒性を示した（LD₅₀ 1～5g/kg 体重）が、適切な吸入毒性データは見つかっていない。ヒトにおける致死量は確立されていない。しかし、90～130mg/kgのピペラジン塩基を投与（1日で2回に分けて

投与) された 89 名の小児の 37%で EEG 変化がみられ、その原因としてピペラジンの GABA 受容体作動性が考えられた。曝露用量が高くなる (数日で分割投与) とさらに重度の神経毒性の症状が現れ得ることから、ヒトにおける急性曝露神経毒性に関する LOAEL は 110 mg/kg と考えられる。

4.1.2.3 刺激性

4.1.2.3.1 動物における試験

皮膚

ピペラジンは強い塩基性のアミンである。OECD ガイドライン 404 に従って、白色ウサギの系統「Weisser Wiener」を用いて実施された急性経皮刺激性/腐食性試験でピペラジンは強度皮膚刺激性と判定された (BASF, 1984)。雄 2 匹と雌 1 匹を個別に飼育し、塗布の 15 時間以上前に刈毛した。50%水溶液 (ピペラジン塩基とみなす) を用いてピペラジンとして約 0.5 g を塗布した 6.25 cm² のガーゼパッチを皮膚に貼付し、半閉塞性包帯で被覆した。曝露 4 時間後に被験物質を除去し、30~60 分後、24、48、72 時間後に皮膚反応を評価した。全てのウサギで 48 および 72 時間後に、重度の紅斑と壊死が観察された。

眼

ウサギの角膜では、1~5% (ピペラジン塩基とみなす) のピペラジン水溶液により腐食と壊死が誘発された (Carpenter and Smyth, 1946)。5%フルオレセイン水溶液による染色検査に基づいてウサギの正常眼を選別し、点眼の 20 秒後に蒸留水で洗浄した。2 時間の休息後、眼瞼を開いた状態にして角膜の中央に 5%溶液 0.005 mL を点眼した。約 1 分後に眼瞼を離し、18~24 時間後にフルオレセイン染色により損傷を評価した。硫酸、水酸化アンモニウムとともにピペラジンも 1~10 の尺度でグレード 9 と評価され、壊死は角膜の 60~90%に広がっているのが観察された。

4.1.2.3.2 ヒトにおける試験

ピペラジン六水和物の 25%水溶液 (ピペラジン六水和物 25 g/水 100 mL、11%ピペラジン塩基に等しい) を適用された 12 例の志願者のうち 10 例で一次皮膚刺激反応が誘発されたが、50 g/L (5%ピペラジン六水和物、2.2%ピペラジン塩基に等しい) 未満の濃度では目にみえる有害な影響は認められなかった (McCullagh, 1968b)。被験物質を含ませたパッ

チが皮膚に最長 48 時間適用された。供給元の異なる 2 種の六水和物が用いられており、一方が他方より刺激性が強いように思われ、供給元により明らかな相違が認められた。無反応から紅斑および顕著な小胞形成までの反応がみられた。

4.1.2.3.3 皮膚・眼刺激性の要約

ウサギでは、ピペラジン塩基（ピペラジン無水物）の 50%水溶液で、皮膚壊死の誘発などの強度刺激性がみられた。ピペラジン塩基は 11%の濃度でヒトの皮膚に紅斑および顕著な小胞形成を誘発するおそれがあるが、ピペラジン塩基が 2.2%未満の場合には影響は観察されなかった。

ピペラジンは 1~5%の濃度でウサギの眼に腐食や壊死を引き起こすおそれがある。

4.1.2.4 腐食性

ピペラジン塩基（無水物）とピペラジン六水和物は、ウサギの眼でピペラジン塩基 1~5%溶液により腐食や壊死が起こった（Carpenter and Smyth, 1946）ことから、眼に対して腐食性があると考えられる。ピペラジンに腐食性があることは、現存する生物学的データだけでなく、水溶液中で高い pH を示すことから明らかである（セクション 1.3.13 参照）。ピペラジンは現在 R34 に分類され、ピペラジン塩基とピペラジン六水和物も同様である。ピペラジンの塩で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

最近、ピペラジン（68%水溶液、さらなる明示事項なし）の局所リンパ節試験（LLNA）が実施された。複数の群の Balb/c 若齢成熟マウス（n = 5）の両耳介背面に、水/アセトン/オリーブ油（10 : 4 : 1）（水/AOO）液を溶媒とした 5、10、20%（w/v）ピペラジン溶液各 25 μ L が、1 日 1 回連続 3 日間塗布された。対照群動物には溶媒のみ（n = 10、水/AOO）またはジニトロクロロベンゼン（DNCB）（n = 5）の 1% AOO 溶液が塗布された。適用開始 5 日後にリンパ節の 3 H-チミジン取り込み量が測定され、その結果ピペラジン（10%）では弱い陽性応答が認められた。20%で影響がみられなかったのは、おそらく

この濃度では局所刺激性および腐食性が生じるためであろう (Dearman and Kimber, 2001)。

Dearman と Kimber によりサイトカイン産生も検討された (2001)。剃毛後のマウス側腹部に、水/アセトン/オリーブ油 (10 : 4 : 1) (水/AOO) 液を溶媒とした 5、10% (w/v) ピペラジン溶液各 50 μ L が、1 日目と 6 日目に塗布された。11、12、13 日目に、1 日量 25 μ L が耳介に塗布された。サイトカイン測定は処置開始から 13 日目に行われた。サイトカイン (IFN- γ) 産生が示され、ピペラジンはマウスで接触アレルギー誘発性を示すことが裏づけられた。同じ試験において、ピペラジンは、気道アレルゲンのマーカーと考えられている IL-4 および IL-10 産生を惹起しなかった。

感作性を検討するために、モルモットにクエン酸ピペラジンを 9 日間腹腔内投与し、その 21 日後に静脈内注射によるチャレンジ投与を行った試験では、アナフィラキシー様反応は誘発されなかった。また、ピペラジンをフロイントアジュバントとともに皮下投与し、その後クエン酸ピペラジンを単回で皮内もしくは静脈内投与しても、何ら皮膚反応はみられなかった (Ratner et al., 1955)。モルモットにそれぞれ 3 ピペラジン 2 クエン酸が 9 日間にわたって 4 回、ピペラジン塩基として計 8~40 mg/kg に相当する用量で腹腔内投与または皮下投与された。6~21 日後に動物全例に 4 mg/kg のピペラジンが単回でチャレンジ投与された。フロイントアジュバントとクエン酸ピペラジンの混合物で感作し、その 20 日後に皮内チャレンジ投与 (詳細の報告なし) が行われた場合でも、同じく陰性であった。しかし、陽性対照が設けられておらず、この古い試験での陰性という結果を感作性を持たないとする証拠として受け入れることはできない。

工業用グレードのジエチレントリアミン (DETA-COMM) を用いたモルモットマキシミゼーション試験では、工業用 DETA のチャレンジ投与を受けた 20 例のうち 11 例で反応がみられた。交叉感作性の検討では、対照群動物で刺激性がみられなくても被験動物のうち 1 例でピペラジン (25%水溶液) に対する反応がみられ、多少の交叉感作性が示唆された。強い皮膚感作性 (20 例中 16 例) を示す高純度ジエチレントリアミン (DETA-HP) を使用した場合に、25%ピペラジンに対する明瞭な交叉感作性 (20 例中 11 例) が報告された (Auletta and Daly, 1990)。上記の検討をエチレンジアミン類とピペラジン (25%水溶液) においても展開したところ、ピペラジンは動物の 5%に効力を示す弱い感作性物質であることが示された (Lueng and Auletta, 1997)。

4.1.2.5.2 ヒトにおける試験

アレルギー性皮膚炎

エチレンジアミン、アミノエチルエタノールアミン、3-（ジチルアミノ）プロピルアミン、トリエチレンテトラミンのようなアミン類と同様に、ピペラジンとその塩類は、職業性喘息〔Hagmar の概説（1986）がある〕およびアレルギー性皮膚炎を誘発するおそれがある。以下に、後者に関する公表済みの症例報告を要約する。

通院中の 93 名の患者を対象とした 1%ピペラジン溶液のパッチテストでは、3.2%でアレルギー反応陽性であった。被験者の背中に試験片が貼付され、2、3 日間そのままの状態とした。2～3 日後に試験片が除去され、その後直ちに反応の観察が行われた。採点は国際接触性皮膚炎研究班（International Contact Dermatitis Group）の判定基準に基づいて行われた。試験詳細の報告は不十分であった（Holness and Nethercott, 1977）。

アレルギー疾患の家族歴のない 5 歳の男児のぎょう虫治療に「Antepar Elixir」（クエン酸ピペラジン）が 2 日間連続投与された。2 回目の治療後に、主として顔、眼瞼、陰茎の領域に蕁麻疹性紅斑性腫脹が観察され、明瞭な浮腫にまで悪化した。投薬を中止し、トリプロロジンとエフェドリンが投与されると、反応は徐々にではあるが 4 日目までに治まった（Hill, 1957）。

アレルギー疾患の既往歴のない 37 歳のオーストラリア人女性が、クエン酸ピペラジン約 500 mg の服用から約 45 分後に全身性紅斑性でそう痒性の重度の発疹を発症した。2 回目の服用でも反応が再発した。患者は以前、香港に在住し、そのときピペラジンを含む駆虫薬を使用していたが、有害反応はなかった（Butler, 1968）。

製薬研究室に勤務する 27 歳の女性が手に湿疹を発症した。患者は日常的に、フェニルブタゾン - ピペラジンと半合成グリセリドを含む「Carudolo」坐薬の包装業務に従事していた。病変は休暇中や週末には寛解したが、仕事に戻ると再発した。パッチテストの結果では、「Carudolo」坐薬、フェニルブタゾン - ピペラジン 1%（基剤：ワセリン）、ピペラジン（5%水溶液）に対して強い陽性反応がみられた。71 歳の男性がリウマチ痛治療用 Carudolo ゲルの使用後に両側性の急性湿疹を発症したという、同じ研究者の報告もあった。病変は治療停止から数日のうちに治癒した。Carudolo ゲルにはフェニルブタゾン - ピペラジン、ニコチン酸メチル、ピペラジン六水和物、カルボキシポリメチレン、ジイソプロパノールアミン、エチルアルコール、および水が含まれていた。パッチテストでは、Carudolo ゲルとピペラジン（5%水溶液）に対して強い陽性反応がみられた（Menezes Brandao and Fousserau, 1982）。

製薬工場で薬のアンブルを扱う仕事に従事していた 50 歳の女性が手に皮膚炎を発症し、チオ尿素とピペラジンを含む Thiodazine「Polfa」剤に対するパッチテストを受けた。96 時間後に、アンブル内容物およびピペラジンに対する陽性反応がみられた（48 時間後ではみられなかった）(Rudzki and Grzywa, 1977)。

1963 年に Foussereau が、ピペラジン（5%水溶液）に陽性反応を示すフランス人 9 名の例を報告した。蘇生室の看護師が、ピペラジンのカンファースルホン酸塩を取り扱う間にピペラジンに過敏になった (Foussereau, 1963)。

1973 年、セネガル出身の 49 歳の男性にピペラジン陽性反応がみられた。その男性は調理場で働いており、手に湿疹を発症した。ピペラジンの由来は確定できなかった (Calas et al., 1975)。

13 歳の男児が前腕腹側面に慢性湿疹を発症した。症状は、その男児が腕時計のプラスチック製バンドを付けた時に始まった。ゴムパッチテストを一通り実施したところ、ピペラジン 1%（基剤：ワセリン）に対する陽性反応が 72 および 96 時間目にみられた。プラスチック製バンドを用いたパッチテストでは陰性であった (Savini et al., 1990)。

55 歳の男性がフェニルブタゾン - ピペラジンを含む Carudolo 坐薬の使用後に全身性皮膚炎を発症した。肛門刺激に加えて、軽度のかゆみを伴う紅斑が体中に広がり、1 か月目には鱗屑形成がみられた。その患者にはアトピーの既往および家族歴があった。パッチテストの結果は、ピペラジン 1%水溶液、フェニルブタゾン 5%（基剤：ワセリン）、そのほかの一部のピラゾリン誘導体に対して陽性であった (Fernandez de Corres et al., 1986)。

前述のように、モルモットを用いた試験ではエチレンジアミンとピペラジンに交叉感作性が示され (Auletta and Daly, 1990)、その所見は臨床経験で裏づけられているように思われた。エチレンジアミンに対する皮膚過敏症を有する患者では (Burry, 1968; Price and Hall-Smith, 1984; Geier, 1995)、ピペラジンに対する交叉感作性やそのほかの数種のアミンに対する交叉感作性が報告されている。ピラゾリン誘導体との交叉感作性も報告されている (Fernandez de Corres et al., 1986)。

指に重度の爪ジストロフィーを伴う発疹を発症した製薬会社の研究員が、ピペラジンおよびエチレンジアミンのパッチテストで陽性と判定された (Calman, 1975)。

アトピーの既往歴を有する 37 歳の男性が、ぎょう虫駆除のためにクエン酸ピペラジンを服用してから 12 時間後に全身性で掻痒感のある麻疹状の発疹を発症した。この事象の 1 年後に同じ治療を繰り返したところ、その男性は 3 時間しないうちに重度の表皮剥脱性紅皮症を発症した。50 μ g のピペラジン水和物を経口投与したところ、数時間もしないうち

に振戦、不穏、頻脈を伴う丘疹状紅斑を発症した。その後のパッチテストでは、エチレンジアミン 1%に対して陽性であった（ピペラジンは検査されていない）（Wright and Harman, 1983）。

アトピーの既往を有する 36 歳の男性が、ぎょう虫駆除のためにリン酸ピペラジンを服用してから 4 時間後に全身性紅皮症、顔面腫脹および倦怠感を呈した。パッチテストでは、48 時間目にエチレンジアミン 1%（基剤：ワセリン）およびネオマイシン 20%（基剤：ワセリン）に対する陽性反応がみられた（ピペラジンは試験されていない）（Price and Hall-Smith, 1984）。

イタリアの皮膚科医療機関では、3 年間でエチレンジアミン感作性の症例が 50 例記録された。50 例のうち 48 例が、トリアムシノロンアセトニド、ネオマイシン、グラミシジン、ナイスタチン、エチレンジアミンを含むクリーム、またはハルシノニド、ネオマイシン、ナイスタチン、エチレンジアミンを含む軟膏のいずれかを使用していた。これらの患者の 22 人が、そのほかの化合物とともにピペラジン 5%（基剤：ワセリン）について再検査を受け、5 人（22%）がピペラジンに陽性であった（Balato et al., 1984）。

同じイタリアの医療機関が、その後エチレンジアミンに感受性のある患者 32 人の調査を行ったところ、29 人がエチレンジアミンを含む局所治療薬の使用歴を思い出すことができた。32 人中 2 人（6%）が、ピペラジン 1%（基剤：ワセリン）に対して陽性であった（Balato et al., 1986）。

気道感作性

スウェーデン人作業員のコホートにおける一連の調査から得られた主要データ

スウェーデンの工場ではピペラジン無水物およびいくつかの塩類（アジピン酸塩、クエン酸塩、リン酸塩、二塩酸塩）の製造工程において曝露を受けている作業員を対象として、喘息性反応に関する一連の体系的調査が行われた（Hagmar et al., 1986 による概説あり）。

HCl 吸収液を入れた総ガラス製で毛細管状先端を有する 30 mL 小型インピンジャーで個別に試料採取が行われた。流量は 1.5 L/分で、通常 60 分間採取された。0.8 µg 超の粒子の採取効率は高いと報告されており（Davis et al., 1951）、蒸気の捕集に極めて効果的であった。2 mg/m³ の濃度で 900 L 以上の空気を採取することができ、2 番目のインピンジャーへの漏れはなかった。

試料は蒸発による乾燥後に NaOH に再溶解された。その 0.5 µL が分取され、15%

Carbowax 4,000 Special および 2% KOH をコーティングしたクロマトグラフィー用担体 (80/100 mesh Chromosorb W) を充填した 2 m のカラムに注入された。カラム温度は 150°C、注入口温度が 230°C、検出器温度が 170°C であった。標準溶液は 0.1 M HCl に溶解したピペラジン標準原液から調製され、測定試料と同様の方法で濃縮された。この方法における分析回収率は、1 試料当たり 10~300 µg の範囲で 85%と報告されている。同様の範囲で、試料処理および分析の精度は ±31% (95%信頼区間) ということであった。検出限界は 1 試料当たり 3~10 µg、すなわち 60 分試料で 0.03~0.1 mg/m³であった。回収率評価はそれ自体がいわば分析法の「バリデーション」に相当するものであるが、その分析法は当時では利用可能な最高の方法と考えられ、優良施設で、国際的に認められた労働衛生研究所により実施された。試料採取法には懸念が表明されており、最新の方法であればさらに正確なデータが得られた可能性がある。しかし、現在のところ Hagmar の試験における試料採取の成否を評価するための定量的な情報はほかにはない。

この工場で 1979 年にピペラジン製造に直接従事した 131 名の作業員は、さらにほかの数種の化学物質に曝露された可能性があるが、工場医療健康サービス部門を介して行われた問診により、作業に関係する呼吸器症状についての情報が得られ、肺活量測定も行われた。15 名が喘息と分類されるか、または仕事中に喘息症状を経験したことがあった。離職者 400 名のうち 69 名に喘息の疑いがあることも明らかになった。これらのうちの 58 名に対して電話による問診が実施された結果、職業性喘息がさらに 18 名で明らかになり、そのうち 13 名でそれを裏づける医療記録があった。

化学物質誘発性喘息の基準は、喘鳴と咳を伴う再発性の呼吸困難がみられることと、明らかに特定の物質への曝露を受けたことがあるということであった。病因となった物質は、29 例でピペラジン、3 例でエチレンジアミンと判定された。勤務以前に発作歴があった被験者はなく、アトピーを有する被験者に集中して症状がみられたわけではない。無症状の対照群被験者では気管支狭窄は誘発されなかったが、ピペラジンをを用いた特異抗原曝露試験では陽性であった。

曝露は断続的なことが特徴であり、時折、曝露と曝露の間で何か月か空くことがあった。最初の曝露から喘息の発症までの時間差は、数か月間から数年間であり、喘息反応はほとんどの場合遅延型であったが、一過性の即時型反応のあとで遅延型反応が長引く場合もあった。要するに、上記のような特定の化学工場では職業性喘息は明らかに問題であり、ピペラジン、特に無水物の処理作業がその原因であるように思われた (Hagmar et al., 1982)。

ピペラジンに対する曝露スコアが、被験者別に時間指数 (time-index) (さまざまな業務工程の時間推定値の総計) および時間加重強度指数 (time-weighted intensity index) (各時

間推定値とそれに対応する曝露強度スコアの積の総計を時間指数で除した値)として得られた。気道症状は明らかにピペラジン時間指数と相関していたが、曝露強度との相関はそれほど明確ではなかった。その後、最高曝露をもたらしていた作業は除外され、1年以上経過してから新たな調査が開始された。

1985年に実施された2回目の調査では、肺機能検査、および特異的IgE抗体測定などの詳細な健康診断が実施された。郵便局員60名が対照群として選別され、従業員140名のうち、前年中にピペラジンの曝露を受けたのは72名であった(Hagmar and Welinder, 1986)。曝露を受けた従業員のうち5例では、放射性アレルゲン吸着試験(RAST)およびRAST阻害試験により*in vitro*でピペラジンとヒト血清アルブミンの結合体に特異的なIgE抗体が検出されたが、非曝露の工場作業員64名および郵便局員60名で検出されたものはいなかった。著者らは、喘息症状を有する作業員の一部にIgE抗体がない例を、偽アレルギーまたは非特異的刺激によるものと解釈した(Welinder et al., 1986)。しかし、RASTなどの技術は高分子量アレルゲンに対するIgE媒介性アレルギー反応を検出する上では性能が高いが、低分子量の職業性アレルゲンでは必ずしもそうであるとは限らない。したがって、慢性鼻炎または喘息を有するがIgE媒介性アレルギーの証明ができない人が大勢いるという事実があったとしても必ずしも免疫学的背景が除外されるものではない(Karol, 1992)。

曝露を受けた作業員72名中8名がピペラジンによる喘息の既往歴を有しており、呼吸器症状の発症までの誘導時間は6~168か月であった。RAST陰性喘息の誘導時間は1か月未満であった。ピペラジン誘発性喘息を異なる機序で発症させる作業が、この不一致の原因と考えられる。喘息の発症の原因となることが最も多い作業工程は、加熱した液体無水ピペラジンを冷却されたドラムで固化して手で容器に詰める作業であった。この工程の平均TWAは1.2 mg/m³であったが、洗浄時には約100 mg/m³という最高値を示した。ドラム剥離作業に起因する喘息の直近の例は1983年に見つかっている。その際、空気中のピペラジンのTWA曝露レベルは0.7 mg/m³であったが、六水和物製造ラインの従業員ではTWAレベルは0.3~0.4 mg/m³で、喘息誘発例は見つからなかった。後者の群では、重回帰分析により肺機能評価項目(VC、FEV₁、VTG、VTG/TLC)、年齢、身長、喫煙習慣、アトピーおよびピペラジン曝露についての解析が行われた。

ピペラジンの曝露を受けた作業員の中には、それに耐性のある人に有利な方法で曝露された者がいるかもしれないということから、健康な作業員への影響は否定できない。一般集団に適用できる真のLOAELおよびNOAELは、報告された0.4 mg/m³より実際には低いかもしれない(Hagmar et al, 1982, 1986, 1987; Hagmar and Welinder, 1986; Hagmar, 1986)。

要約すると、スウェーデン人作業員をコホートとするこの一連の試験では、高濃度曝露群作業員の約 3 分の 1 が喘息症状を有していた。調査したコホートでは用量反応関係が明らかであり、空气中ピペラジンの TWA レベル 0.7 mg/m^3 では呼吸器症状が誘導されるが 0.4 mg/m^3 では誘導されないことが分かった。

しかし、一部の工程が停止されているため、それらの工程における曝露の強度および最高濃度は大まかに推定できただけであることから、このコホートにおける喘息誘発に関する LOAEL および NOAEL は、リスク評価の段階で使用するには大いに疑念がある (Hagmar, 1986)。それでも、ピペラジンは、リスク特性評価で考察することが必要な呼吸器刺激物質であることは明らかである。

支持データ

ヒツジ用寄生虫駆除剤の調製中にピペラジンへの曝露により発現した遅延型喘息様反応の明白な症例が、以前オーストラリアの McCullagh により報告された (McCullagh, 1968a)。抗原への曝露試験により、プレドニゾン療法が必要なほどの重度の遅延型喘息発作を発症し、ピペラジンが原因物質であることが確認された。著者は、シドニー、イングランド、スウェーデンの化学工場で呼吸器過敏症の例が発生したという未公表の観察記録にも言及している。

その後、職業曝露を受けた化学者 2 名についての同様の記録がイングランドで公表されている。感作された化学者は、ピペラジン塩酸塩で容易に誘発される遅延型喘息反応を有していたが、反応はクロモグリク酸二ナトリウムで完全に抑制された (Pepeys et al., 1972)。ピペラジンを用いた皮膚プリック試験は陰性であった。

ある工場で 2 か月間就業した 55 歳の男性が手、腕、顔、陰茎に発疹を発症した。症状は、3 週間の休暇中に消失したが、仕事に戻ると再発した。呼吸症状も発症した。その男性は工場を辞めた 2 年後にピペラジン 1%水溶液のパッチテストを受け、その翌日、呼吸器症状とピペラジンテスト部位における痒痒がみられた。呼吸症状は約 5~6 時間後に消失した。検査結果は 48 時間後に強度の陽性であった (Fregert, 1976)。

4.1.2.5.3 感作性の要約

ピペラジンまたはその塩類に曝露されると、アレルギー性皮膚炎および呼吸器感作作用が誘発されることが示されたが、以上の試験からは閾値の推定ができなかったため NOAEL は設定できない。マウスにおける LLNA でも皮膚感作性が示された。モルモットにおいて

ピペラジンとジエチレントリアミンとの交叉感作性がみられた。ヒトに関する報告、疫学調査および動物データに基づいて、ピペラジンは R42、R43 に分類されることが推奨される。

4.1.2.6 反復投与毒性

4.1.2.6.1 動物における試験

主要な試験

ビーグル犬に最高で 3,692 ppm (約 122 mg/kg/日) までの用量で 13 週間混餌投与した試験では、明確な LOEL は得られなかった (Rutter and Voelker, 1975)。各群 8 匹 (雌雄各 4 匹) のイヌにピペラジン二塩酸塩が、低および中間用量群においてはそれぞれ 92 (3 mg/kg/日) および 369 ppm (12 mg/kg/日) の用量で投与された。高用量群では、1~5 週目に 1,476.8 ppm (50 mg/kg/日)、6~13 週目には 3,692.0 ppm が投与された。4 番目の群は対照群とされた。上記の用量はピペラジン塩基として 1.5、6、25 mg/kg/日に相当する。

外観および行動、体重変化、臨床検査データ、検眼鏡所見、器官重量、ならびに肉眼および顕微鏡的病理検査所見が記録された。全例について外観、行動、食欲、排泄および毒性徴候または薬理学的効果が毎日観察された。個体別体重、摂餌量、被験物質摂取量は試験期間中、週 1 回記録された。臨床検査は全例について試験開始時および 4、13 週目に実施された。肉眼病理検査は屠殺後、全例について実施された。各屠殺例について以下の器官の重量が測定され、次いで器官/体重比が求められた。すなわち、甲状腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣上体を含む精巣であった。組織病理学的検査対象は脳、胸部脊髄、下垂体、甲状腺、副腎、心臓、肺、脾臓、肝臓、腎臓、胃、小腸・大腸、膵臓、卵巣、子宮、前立腺、唾液腺、腸間膜リンパ節、膀胱、胆嚢、筋肉に付随する神経、眼、骨髄、肋骨接合部であった。

軽度の肝障害が疑われる徴候以外には、臨床評価項目および行動の観察、体重変化測定、器官重量測定、肉眼・顕微鏡的病理検査ならびに検眼鏡検査所見からは、被験物質による全身毒性の徴候はみられなかった。全例で軽微から中程度の体重増加がみられ、摂餌量は、全般的には被験物質投与群と対照群で同程度であった。4 週間後では、被験物質曝露群の雄の血清グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (SGOT) 値が対照群に比べて有意に高かったが、13 週間後には正常値に戻った。13 週目に中間および高用量群の雌で、このバイオマーカーの上昇がみられた。被験物質曝露群のどの群においても、アルカリホ

スファターゼや血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (SGPT) の有意な変化はみられなかった。群当たりの動物数が少ないこと、対照群でそれぞれ試験開始時、4、13 週間後にベースライン値の明らかな変動がみられたことから、SGOT のデータの解釈は困難であった。雄では、肝臓と脾臓の絶対重量に用量相関的な増加傾向がみられたが、雌ではみられなかった。また、対照群と比べて器官重量/体重比に有意差はみられなかった。そのほかのすべての器官重量および器官重量/体重比は試験施設における背景データの範囲内の値であり、対照値とほぼ同等であった。肉眼および顕微鏡的病理検査では、被験物質投与に起因する可能性のある器官の変化も組織の変化もみられなかった。報告書では、「全例について、外観、行動、食欲、排泄、毒性徴候または薬理学的影響を毎日観察した」と述べられているが、本試験ではイヌにおけるピペラジンの神経毒性は明らかにされていない。獣医学文献には、本試験の最高用量をかなり上回る用量 (145 mg/kg/日、8 週間) および投与期間で、イヌにおいて、Lovell (1990) が概説している様に、運動失調、筋力低下、頭部を圧迫する行為、触覚過敏、異常ミオクローヌス (頭部と頸部を伸ばし、前脚を胸壁に沿って引き、後脚を外側や後方へ伸ばした) などの重篤な神経毒性徴候が惹起されたとする記載がある。この試験に基づいて、用量 50 mg/kg/日 (ピペラジン塩基の 25 mg/kg/日に等しい) が、EU 動物用医薬品委員会 (EU Committee for Veterinary Medicinal Products) により NOAEL とみなされた (CVMP, 1999)。肝毒性に関する NOAEL は、ピペラジン塩基として 25 mg/kg/日と考えられる。

裏づけ試験

Dow Chemical社 (Lockwood, 1957) が実施した 90 日間反復混餌投与試験では、各群雌雄各 10 匹のラットに無水ピペラジンが飼料中濃度 1,000、3,000、10,000 ppm (ピペラジン塩基として約 50、150、500 mg/kg/日⁵⁾ に相当) で、またはピペラジン二塩酸塩が飼料中濃度 1,830、5,500、18,300 ppm (ピペラジン塩基として約 45、140、450 mg/kg/日に相当) で投与された。屠殺後に肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、精巣が摘出され、組織病理検査用に処理された。1,000 ppmでは有害な影響はみられなかったが、10,000 ppm (500 mg/kg/日) では、肝臓にびまん性混濁腫脹および巣状壊死を伴う退行性変化、ならびに腎臓で線維性および退行性変化がみられた。3,000 ppm (150 mg/kg/日) では「やや軽度の」同様の病理学的変化がみられた。最高用量では体重増加の抑制がみられたが、雌でのみ統計学的に有意であった。この試験ではNOAELは 50 mg/kg/日と決定された。ピペラジン二塩酸塩では最高で飼料中濃度 18,300 ppm (ピペラジン塩基として 450 mg/kg/日) まで有害な影響はみられなかったが、この所見は説明が困難であり、試験の信頼性に関して重大な疑義を生じさせるものであった。

⁵⁾ ラット飼料係数 (food factor) : 飼料中濃度 1 ppm が 0.05 mg/kg/日に相当。

さらに最近のラット混餌投与二世代試験でも弱い亜慢性毒性がみられ（下記参照）、10 週間投与を受けた F₀ 雄、11 週間投与を受けた F₁ 雌では LOAEL が飼料中濃度で 12,000 ppm (300 mg/kg/日)、NOAEL が 5,000 ppm (ピペラジン塩基 125 mg/kg/日) であった (Wood and Brooks, 1994)。しかし、生化学的検査データが無く、生殖器官や付属腺以外の器官の組織病理検査が実施されておらず、反復投与の NOAEL の適切な評価ができない。

ラットにおける発生毒性試験 (Ridgway, 1987b) では、妊娠ラットにピペラジン塩基として 0、105、420、2,100 mg/kg/日が妊娠 6~15 日目に強制経口投与された。最高用量の雌で、過剰流涎、嗜眠、ならびに体重増加量、体重および摂餌量の減少がみられたことから、雌における NOAEL は 420 mg/kg/日と報告された。

ウサギにおける発生毒性試験 (Ridgway, 1987b) では、妊娠ウサギにピペラジン塩基として 0、42、94、210 mg/kg/日が妊娠 6~18 日目に強制経口投与された。投与期間の最初の 4 日間で摂餌量の減少 (-39%) と体重増加抑制がみられたことから、雌における NOAEL は 42 mg/kg/日と報告された。

ラットにピペラジンを 110 mg/kg 体重 (アジピン酸塩として) の用量で 8 週間経口投与した試験では、有意な病理学的変化はみられなかった (Cross et al., 1954)。Dow Chemical 社は、モルモットに 100 ppm の 3 時間吸入曝露を 11 日間で 7 回行ったが、毒性反応は惹起されなかったと報告している (Trochimowicz et al., 1994 において引用)。

Kerala 大学 (インド) で実施されたラットにおける 30 日間強制経口投与試験では、ピペラジン六水和物 150 mg/kg/日が投与された (Kaleysa Raj, 1973) が、「有害で目立つ症状はなかった」と報告されている。特定の組織の脂質含量および血糖値を除けば、「短報 (short communication)」として公表されたこの試験の評価を可能にするようなデータは全体的に欠落している。

げっ歯類の脂質代謝がピペラジンにより調節されることが示唆されている。例えば、70 mg/kg/日を 30 日間経口投与されたラットでは血清脂質濃度が低下 (Raj, 1973) し、高コレステロール含有飼料で飼育されたウサギの雄に高用量のピペラジンが 5~10 週間投与された場合には、血中、大動脈、肝臓中のコレステロール濃度の低下がみられた。雌ウサギでは効果が逆、つまりピペラジンによりコレステロール濃度が上昇したと報告されているため、この結果の解釈は困難である。トリグリセリド値に対する影響はみられていない。また、低コレステロール飼料で飼育された雄ラットではピペラジンによる脂質に関する作用はみられなかった (Redgrave and West, 1972)。著者らは、効果に差がみられたのは、生体内で安定なエストロゲン - ピペラジン複合体が形成され (Beall et al., 1953)、その複合体によりコレステロール代謝のホルモン制御が調節されたことによるのではないかと述

べている。

データの不一致（神経毒性）

ピペラジンは、獣医領域で駆虫薬として広範囲に用いられており、推奨用量（ピペラジン塩基）はブタ、ウシ、ウマで 110 mg/kg、イヌおよびネコで 45～65 mg/kg である（Lovell, 1990）。ピペラジン塩を駆虫薬として経口投与した際の神経学的副作用が、以下の動物で報告されている。すなわち、イヌ（Sloan et al., 1954; Bownass, 1987; Wooliscroft, 1987）、ネコ（Stoffman and Braithwaite, 1976; Swift, 1984; Goodard and Johnston, 1986）、ピューマ（Rettig, 1981）、トラ、ライオン（Christoph et al., 1962）、ウマ（Drudge et al., 1974; McNeil and Smyth, 1987）、アシカ（Gray, 1972）である。神経学的症状を呈したトラとライオンは約 300 mg/kg 体重のクエン酸ピペラジンを単回投与されていた（Christoph et al., 1962）。イヌの典型的な症状は、急性呼吸促迫、運動失調であり、頭部と頸部を伸ばし、前脚を胸壁に沿って引き、後脚を外側や後方へ伸ばす行動もみられた。ネコ、トラ、ライオンでは、嗜眠、強直性痙攣、および運動失調を伴う筋肉協調性の著しい欠如が報告された。そのような反応は、反復投与ばかりでなく単回投与（通常過剰量だがそうとも限らない）でもみられ、反復投与ではネコ科の動物が特に敏感なようである。

催奇形性試験で、妊娠ウサギにピペラジン塩基 210 mg/kg/日を 12 日間経口投与したときに上記の影響がいくつか観察された（Ridgway, 1987b）ことから、ウサギも敏感なように思われた。

さらに、ウサギにおける予備試験で、ピペラジンの塩（塩の種類は明記されていない）を 1 日用量 150 mg/kg で 4 日間、または 1 日用量 200、250 mg/kg で 1 日～2 日間強制経口投与したところ、EEG パターンに変化が生じたことが報告されている（Kuelz and Rohmann, 1969）。こうした報告は、ヒトおよび動物での高用量投与時に臨床的に観察された神経毒性を、実験的に裏づけるものである（セクション 4.1.2.6.2 参照）。ウサギにおける EEG 変化は、ビタミン B₆ の同時注射により防止されたと報告されている。

ピペラジン塩基として約 200 mg の三ピペラジンニクエン酸が単回腹腔注射されたモルモットが強直性痙攣発作を来たして死亡したという報告（Ratner et al., 1955）があり、ネコ科の動物においてピペラジンにより同様の反応が惹起されたという事実（Rettig, 1981）、ならびにヒトのてんかんでは発作閾値が低下したということから考えて、このことも本項で触れておく意味があると考えられる（下記参照）。

以下に引用している二世世代試験（最高用量 625 mg/kg/日）では、明らかな神経毒性はみら

れなかった (Wood and Brooks, 1994) が、ラットに 2,100 mg/kg のピペラジン塩基が経口投与された催奇形性試験では、明らかに主としてコリン作動性の神経毒性 (過剰流涎) がみられた (Ridgway, 1987b)。

哺乳類に誘発される神経毒性の機序は解明されていないが、ラットの横隔神経 - 横隔膜標本では、クエン酸ピペラジンに神経筋遮断活性があることが示され、高用量 (ピペラジン塩基として 70 または 140 mg/kg に相当) では、マウスでレプタゾールやストリキニーネにより誘導される痙攣の閾値が低下した (Onuaguluchi and Mezue, 1987)。ピペラジンの作用機序に関する検討が、回虫 (*Ascaris*) において多数行われている。ブタ回虫 (*Ascaris suum*) の神経 - 筋標本を用いた試験において、ピペラジンはエゼリンやジエチルカルバマジンのような化合物と異なり、アセチルコリンによる膜電位変化に対する作用を示さなかった (Natarajan et al., 1973)。その一方で、ピペラジンはこの動物種において γ -アミノ酪酸 (GABA) アゴニストとして作用することが証明されている。この寄生性線虫の体性筋細胞には、哺乳類 GABA 受容体サブタイプ A と同様の機序で塩素コンダクタンスを制御する GABA 受容体が存在する。その受容体は哺乳類宿主の受容体に似ているが、同じものではない。最も効力のある GABA アゴニストは回虫にも効力があるが、ムシモールの作用は脊椎動物の受容体に対しては弱く、また、回虫の受容体はピクロトキシンなどのアンタゴニストにはそれほど敏感ではない。この無脊椎動物では、体性筋の GABA 受容体への作用により、神経筋伝達に対する妨害が起これ、その結果、可逆的な麻痺が生じる (Martin, 1993; Martin et al., 1996)。哺乳類では、運動皮質の GABA 阻害は、四肢の円滑な屈曲や伸張動作を開始するために重要であり、運動および姿勢の制御に影響を及ぼす。マカクザルの乳児 3 匹を用いた試験で、GABA アゴニストであるムシモールを手の運動皮質野に注入したところ、前肢運動が遮断され、まるで橈骨神経が麻痺したかのように手首と指が垂れ下がる姿勢をみせた。興味深いことに、ムシモールの用量が被験動物 3 匹で同じであるにもかかわらず、その作用に対する感受性には大きな個体差がみられ、1 匹では低く、2 匹目では中程度で、3 匹目では高かった (Kubota, 1996)。淡蒼球内節に注入すると舞踏病様運動が誘発され、黒質網様部に注入すると、回転運動および対側性筋弛緩を伴う軸方向体位の重度の異常が引き起こされた (Burbaud et al., 1998)。感受性を有する種においてピペラジンによって惹起される症状は、このような様相をいくばくか呈するが、*in vitro* でラットの交感神経節に対するニコチン様作用が一連の試験で報告されていることから、哺乳類における作用にはほかの機序も関係している可能性がある (Connor et al., 1981)。

要約

ラットやイヌを用いた反復経口投与では、肝毒性の徴候が多少みられた以外には、最高試

験用量においても全身毒性の徴候はほとんどみられなかった。ビーグル犬では、軽度の肝障害の誘発に対する NOAEL を、ピペラジン塩基として 25 mg/kg/日と考えることができる。ラットにおける 90 日間試験では、報告内容は不十分ながら、肝臓および腎臓の組織病理学的変化に基づいて、おおよその LOAEL として 150 mg/kg/日が示された。飼いイヌ、飼いネコ、ウマ、アシカ、ピューマ、ライオン、およびトラでは、ピペラジン約 50~300 mg/kg の数回の経口投与で重篤な神経毒性の徴候が誘発された。哺乳類におけるピペラジンによる神経毒性の発生機序は不明であるが、無脊椎動物における作用と同じように GABA アゴニストとして作用すると考えてよいと思われる。入手できた亜急性および亜慢性試験では、そのような毒性徴候は全く見いだすことができず、それが懸念の理由となっており、また、この重要な毒性学的評価項目に関して LOEL および NOEL を決定することを不可能なものとしている。ヒトを含む哺乳動物の中にはピペラジンの 1~7 回の投与で神経毒性が誘発されるものがあるということは疑いなく立証されており、小児は特に感受性が強いようである。したがって、この評価項目については、まだ検討が十分ではないと考えられる。

4.1.2.6.2 ヒトにおける試験

痛風治療に 10 g (体重 70 kg と仮定すると 144 mg/kg 超に相当) を超える量のピペラジンが使用されていた前世紀末には神経毒性の副作用が報告されていた (Stewart, 1894; Slaughter, 1896) にもかかわらず、1950 年代の初頭からピペラジンのさまざまな塩が駆虫薬として広範に使用されている。一般的には、成人 100 mg/kg および小児 50~65 mg/kg で最長 7 日間という推奨用量で使用した場合には、毒性は低レベルであった (White and Staden, 1953) が、筋力低下、不安定性、運動協調性の欠如、筋弛緩、腱反射の低下などの可逆性の神経毒性作用に加えて振戦、間代性痙攣、構音障害、広範性 EEG 異常、精神錯乱、幻覚も観察された。

ピペラジンを毎日数回投与すると神経毒性が惹起されるということを事実として裏づける多数の症例報告が、欧州、米国、中東、東南アジアで得られている。そのため、この物質の医薬品としての登録は、スウェーデンや他のいくつかの国においては、管轄当局により取り消された。このような種類の毒性をラットやマウスで再現することはできないが、ほかの数種の哺乳動物種におけるピペラジン誘発性の神経毒性を裏づける確かなデータがある。この毒性評価項目に関する LOAEL を決定するためには、過量投与されておらず、腎障害やてんかんのような重篤な関連疾患の既往歴もない、成人および小児に関する神経学的所見 (EEG 異常を含む) を取り扱った臨床報告が極めて重要である。この基準を満たす試験が文献中に数件見つかると、そこでは用量などの項目が比較的よく定義されている。以

下にさらに詳細に述べる。

最も重要な試験

Pavia 大学（イタリア）小児科診療所の Belloni および Rizzoni（1967）によると、4 歳児に対して 100 mg/kg 体重のピペラジン六水和物（ピペラジン塩基 44 mg/kg 体重）の投与を 3 日間行ったところ、重度の無力症、不安定歩行、平衡感覚の不良、極端な筋力低下、EEG 変化が発現した。この最初の例が契機となって診療所はピペラジン治療中のすべての小児を調査した。1 日当たりピペラジン（六）水和物 80 mg/kg 体重（ピペラジン塩基 35 mg/kg 体重）の 5 日間投与を受けた小児 11 例中 10 例で、EEG の異常がみられ、それらは以前文献で報告された変化（すなわち、連続性両側性棘波、多棘波、徐波を挟む高振幅速波）に類似していた。小児の中で、交絡の要因となり得る臨床症状が報告されたのは 1 例（慢性心不全による肝腫脹）のみであった。投与が繰り返された上で EEG が正常化した後に、同用量のピペラジン水和物と 1 mg/kg 体重/日のプレドニゾンが併用された小児のうち 6 例では、EEG 変化が現れなかったか、現れてもあまり目立つものではなかったと報告されている。

Padelt および共同研究者（Padelt et al., 1966）がベルリン-ブーフ市民病院小児科およびドイツ科学アカデミーベルリン-ブーフ皮質内臓病理学・治療研究所（Kinderklinik des Städtischen Klinikums Berlin-Buch und Institut fuer Kortiko-Viszerale Pathologie und Therapie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin-Buch, Germany）で行った調査は、すべての報告の中でも、小児のピペラジン誘発性 EEG 異常に関する患者データを、最も多く収集している。そのコホートには 89 名の小児が含まれ、その 41 名が男児、48 名が女児で、ほとんどが感染症のために入院しており、後にぎょう虫感染症の診断も受けた。主とする急性疾患の症状が治まってから約 10 日後にピペラジン投与が行われた。偏った EEG パターンを示していた小児は、調査から除外された。調査は、特に「1 日」投与による神経毒性徴候を検出できるようデザインされた（下記参照）。用量は、後日治療推奨用量とされた量よりやや高かった。小児の EEG 検査は、投与の前日と翌日に行われた。ピペラジン水和物（六水和物）が 1 日に 2 回（12 時間間隔）、以下の総用量で投与された。すなわち、1~2 歳に 3 g、5 歳以下に 5 g、7 歳以下に 6 g、9 歳以下に 8 g、11 歳以下に 10 g、12 歳以上に 12 g であった。なお、小児は 1~3 歳がほとんどであった。著者らは、用量は総「1 日」用量としてピペラジン塩基で 90~130 mg/kg に相当すると報告している。投与量のこのような不確定要素を考慮すると、その投与間隔による投与量は、110 mg/kg の単回投与と解釈できると考えられる。外表には神経毒性徴候は観察されなかった。

被験者は、EEG パターン異常の度合いに応じて 4 グループに分類された。

Classification of effect	Number of children /group ^a	Number of children /category
Category A – No or light abnormalities		56
1) Normal EEG with respect to age.	16	
2) Light to moderate general changes.	40	
Category B – Moderate to severe changes		33
3) Increased activity with high amplitude waves and seizure potential.	11	
4) Tendency for a slow-down activity mostly occipital; many, mostly polymorphic theta waves or delta-frequencies (according to age). Occurrence of high amplitudes, often rhythmic slow waves, maximal occipital, multiple generalisations.	17	

a) 5 children in Category B were not assigned any group, as the effects were intermediate to those in groups 2 and 3.

EEG 変化は、小児 56 例 (63%) についてはカテゴリーA (無変化またはわずかな変化)、33 例 (37%) についてはカテゴリーB に分類された。しかし、後者のカテゴリーに分類されたうちの 5 例はグループ 2 と 3 の間と評価されたため、上記の表がやや不明確になった。

異常 EEG パターンは感染症にも年齢にも関係がなかった。カテゴリーA には脳炎 5 例、髄膜炎 1 例 (56 例中) が含まれ、一方、カテゴリーB には 33 例中で脳炎 1 例、髄膜炎 3 例が含まれていた。

主要な裏づけ資料

Hadassah 大学病院神経科 (エルサレム、イスラエル) の Berger および共同研究者 (Berger et al., 1979) が、以前は健康であった 33 歳の女性に、アジピン酸ピペラジンを用量 11 mg/kg 体重で 1 日 4 回 (44 mg/kg/日)、7 日間 (ピペラジン塩基として 16 mg/kg 体重/日に相当) 投与したところ、神経毒性作用 (両側性対称性緊張低下、変換運動障害、誤示および極度の失調性歩行を伴う測定障害) がみられたことを報告している。患者の状態は治療中止後には改善し、血液化学検査 (BUN および肝酵素) ならびに尿検査などの診察では正常値が得られた。

R.N.T.医科大学医学科 (ウダイプール、インド) の Bomb と Bedi (1976) によれば、12 歳の女児の回虫症の治療のために、100 mg/kg 体重のクエン酸ピペラジン (三ピペラジン

ニクエン酸、ピペラジン塩基として 24 mg/kg 体重/日に相当) が就寝時に投与された。翌朝、その女兒は介助なしにはベッドに起き上がることができなかった。神経学的検査では、水平眼振、全身性筋力低下 (患者は介助なしには立つことも座ることもまったくできなかった)、緊張低下、腱反射の低下がみられた。症状は 24 時間後に消失した。神経疾患、腎疾患、肝疾患が疑われる既往歴はなく、血液中の尿素値は正常であった。

国立小児医療センター外傷救急医療センター (Emergency Medical Trauma Centre, Children's National Medical Centre) (ワシントン DC、米国) の Connors (1995) が、以前は健康であったが、共調運動不能で、よく倒れ、物を繰り返し落とすことから救急部門へ移された 9 歳の男児の症例を報告している。その男児には、クエン酸ピペラジンが 65 mg/kg (ピペラジン塩基 23 mg/kg 体重) の用量で 7 日間毎朝投与されていた。患者は歩隔が拡大しており、指鼻試験および踵膝試験は明らかに異常であった。急速交互運動能力は不良であった。身体的異常はほかにはみられず、24 時間後には症状が消失した。

Hopital d'Instruction des Armées Saint-Anne 神経科 (トゥーロン軍港、フランス) の Drouet および Valance (1994) によれば、体重 65 kg の 50 歳の女性が、ピペラジン塩基として 30.5 mg/kg に相当する用量のピペラジンを 5 日間投与され、ミオクローヌスを発症した。症状は悪化し、5 日目には一過性の複視および歩行困難が現れ、早期の入院が必要となった。

診察では、能動的な筋運動によって亢進するミオクローヌス性収縮がみとめられた。片側性または両側性に、特に四肢でみとめられたが、頸部についても同様であった。患者には失調性歩行、EEG 異常がみられたが、基礎疾患が疑われる臨床的異常はほかにはなかった。異常所見は、軽度の小赤血球性貧血と中等度の好酸球増加症のみであり、それらの神経毒性所見への影響はなかったと考えられる。症状はすべてピペラジン投与終了から 4 日後には次第に消失した。

Hopital d'Aulnay (フランス) の Eliachar と共同研究者 (Eliachar et al., 1960) は、2 歳 9 か月の小児の中毒症例について報告している。この小児は、約 100 mg/kg 体重/日のピペラジン (六) 水和物 (ピペラジン塩基として 44 mg/kg 体重/日) に相当する茶さじ 1 杯分のピペラジンシロップを 1 日 1 回 5 日間服用しており、まっすぐに座ることができず、診察では、非協調運動と顕著な緊張低下がみられた。そのほかにも異常はみられなかった。入院から 3 日後に EEG 検査が実施され、異常波形からびまん性脳障害であることが分かった。3 日後には EEG 波形はほぼ正常に戻った。

Academic Hospital (ウプサラ、スウェーデン) の Ljunggren (1967) によれば、以前は健康であった 3 歳半の女兒が、ピペラジン塩基 50 mg/kg 体重/日に相当する用量で連続 5

日間毎日ピペラジンの投与を受けたあと神経症状を呈し、その後投与は中断された。4日後に症状が消失してから同じ用量で投与を再開したところ、再び神経症状が現れ、早期の入院が必要となった。診察では、運動失調および起立不能がみられたが、筋緊張の消失は認められなかった。入院 36 時間後に行われた EEG 検査では、「特に中心後回部にわたる部位におけるやや重度の非特異的発作性の病的な活動」の所見が得られた。肉眼的臨床神経症状は 2 日目までに軽減したが、ある程度正常化したにもかかわらず、2 週間後でも EEG の異常パターンは持続した。しかし、この時点で続発性アデノウイルス感染を起こしたため、残った異常の原因は不明確であると思われる。それでもなお、得られた所見は文献で報告されている所見とかなりの程度一致していた。

そのほかにもいくつかの症例報告があり、その質や規模は多岐にわたっている (Bettecken, 1956; Combes et al., 1956; Wechselberg, 1956; Cavalcante and de Mello, 1958; Schuch et al., 1963; Külz, 1964; Fassetta, 1965; Point, 1965; Neff, 1966; Chateau et al., 1966; Savage, 1967; Külz and Rohmann, 1967, 1969; Miller and Carpenter, 1967; Sethi et al., 1968; Jakubowska et al., 1968; Boulos and Davis, 1969; Parsons, 1971; Fournier et al., 1972; Kömpf and Neundörfer, 1974; Vanneste et al., 1975; Gupta, 1976; Graf, 1978; Solanki, 1978; Sörensen, 1980; Lahori and Sharma, 1981; Neau et al., 1984; Yohai and Barnett, 1989; Buemi et al., 1995; Nickey, 1996)。

結論：このセクションでは患者の臨床報告を紹介したが、ヒトにおける所見については、言うまでもなく、動物での比較試験から得られたデータなどにおける所見とは異なる方法で評価すべきである。同質のすべての臨床試験に関していえば、上述の報告は、それぞれ単独でみると当然のことながら幾分不十分であるが、包括的にみると、疾病素質がない場合でも推奨用量でピペラジンにより神経毒性が誘発されることを示す説得力のある確証を提示している。動物試験でよく行われているような、特別に「重要な試験」を 1 つ選び出すのは不可能である。それでも、試験を担当した医師たちの多くが有名な医療機関に属しており、臨床所見を適切に考察できるだけの十分な能力を有しているのが当然であることを考えると、Belloni と Rizzoni (1967) の報告、および Padelt et al. (1966) によって公表された小児に関する報告は、投与スケジュールが臨床的に管理され、データが比較的多いことから、特に重きを置くべきである。すべての患者の中で神経毒性を発現したのは少数にすぎないという事実は、因果関係を否定する証拠とすることはできず、むしろ、感受性に大きな個体差があることを反映するものであり、周知の知見として見落としてはならないものである。

上記のセクション 4.1.2.6.1 で述べたように、ピペラジンは回虫において GABA アゴニストであることが証明され、ヒトで散見される症状の多くが、強い GABA アゴニストであるムシモールで引き起こされる症状に似ている。既に述べたことであるが、類人猿ではムシ

モールのような GABA アゴニストに対する感受性に大きな個体差があるということ (Kubota, 1996) が、ここでは特に意味があるかもしれない。

ピペラジンは、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ欠損患者で溶血性貧血を誘発することが報告されている (Buchanan, 1971)。しかし、このまれな所見ひとつだけから結論を導くことはできない。

喘息のほかにも、ピペラジンへの慢性曝露により慢性気管支炎が起こることが分かっている。ピペラジン製造・処理事業に従事したスウェーデン人作業員における気管支炎の全般的有病率は約 16%であり、明確な用量反応関係があった (Hagmar et al., 1984)。

イソシアン酸エステルのような感作性物質への職業的曝露により、内径が 2 mm 未満の末梢気道の閉塞を意味する「末梢気道病変」といわれる症候群が誘発されることが報告されている (Hjortsberg et al., 1983)。そのような閉塞は肺活量測定などの普通の検査法では必ずしも検出されずとは限らないと思われるが、窒素洗い出し法では診断でき、肺の捕捉ガスの容積を測定できる。しかし、ピペラジンへの曝露を受けたスウェーデン人作業員では、そのような影響は検出できなかった (Hagmar et al., 1987)。

4.1.2.6.3 反復曝露の要約

ビーグル犬における肝毒性に関する NOAEL は、ピペラジン塩基として 25 mg/kg/日と考えられる。この NOAEL は EMEA (欧州医薬品審査庁) により、動物用駆虫薬としてブタと家禽にピペラジンを使用する際の 1 日摂取許容量 (ADI) および暫定的最少リスクレベル (MRLs) を設定するための基準として採択された (EMEA, 2001a)。

しかし、適切な長期間の生物検定法はなく、体系的な実験が行われた試験の中に神経毒性影響を報告したものはないということから、深刻な懸念が生じる。重篤な場合もあるそのような影響は、臨床現場で十分に立証されており、獣医師によりウサギ、イヌ、ネコ、トラ、ウマ、プーマ、アシカにおいても報告されている。以前は健康であったヒトに関しては、3~7 日間投与に制限した場合の LOAEL は、ピペラジン塩基として約 30 mg/kg/日と考えられる。治療用量を下回る用量での影響については情報がほとんどないことから、30 mg/kg/日の用量は真の LOAEL (最小毒性量) というよりむしろ 'low OAE' (低毒性量) と考えるべきである。この用量は今後も LOAEL (新たな用語を導入する代わりに) と呼ばれるだろうが、これが真の LOAEL ではないという所見に留意して MOS (安全マージン) を考察する必要がある。既存のデータからは、感受性のある動物種においてもヒトの長期曝露においても、ピペラジンによる神経毒性に関する NOAEL は決定できない。リス

ク評価では、ヒトにおける3～7日間曝露に制限した場合のLOAELである30 mg/kg/日
が用いられるであろう。ヒトの神経毒性データが、イヌを基にした上述のNOAELより優
先されてきた。その理由は、動物データよりヒト試験の重要度が高い（例えば、毒性作用
へのヒトの感受性に関して）こと、および動物試験に基づくよりヒト試験に基づいてリス
クの特性評価を行う場合の方が評価係数の必要性が低いことである。同様に軽度の肝毒性
よりも神経毒性の方が、より大きな懸念として扱われることも有り得る。

ヒトでは、ピペラジン反復吸入曝露により慢性気管支炎が誘発されることがあるが、この
評価項目についてはLOAELもNOAELも確立されていない。

4.1.2.7 変異原性

4.1.2.7.1 *In vitro* 試験

ピペラジンについてネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) 復帰突然変異試験を菌
株 TA 1535、TA 1537、TA 98、TA 100 を用いて 33、100、333、1,000、2,167 µg/plate
の濃度で行ったところ、代謝活性化系の存在下でも非存在下でも陰性であった (Haworth et
al., 1983)。

OECD 試験ガイドラインの要求項目に従って実施されたリン酸ピペラジンの試験では、同
様の結果が 8～5,000 µg/plate の濃度で、菌株 TA 100 および TA 1535 (塩基対置換) ばかり
ではなく TA 97 および TA 98 (フレームシフト突然変異) においても確認された
(Marshall, 1986)。

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) においては、ピペラジンのクエン酸塩、アジピン酸塩、
メベンダゾール塩、チアベンダゾール塩のいずれも、復帰突然変異、有糸分裂組換えおよ
び遺伝子変換を誘発しなかった (Hennig et al., 1987)。

チャイニーズハムスター卵巣細胞の培養試料を用いた GLP 試験において、リン酸ピペラ
ジンは、1.7～110 mg/mL の濃度で代謝活性化系の存在下でも非存在下でも染色体異常誘
発性を示さなかった (Allen et al., 1986)。

Conaway ら (1982) は、記載内容が不十分であるが、ピペラジンが L5178 マウスリンフ
ォーマ試験において代謝活性化系の存在下で突然変異を誘発したことを報告している。

しかし、リン酸ピペラジン濃度 200、250、300、350、400 µg/L の試験液を用いた別のマ
ウスリンフォーマ試験では、代謝活性化系の存在下でも非存在下でも陰性の結果であった

(Cole and Arlett, 1976)。また、GLP およびガイドラインに準拠し、適切に報告されたマウスリンフォーマ彷徨変異試験においては、リン酸ピペラジンを 400 µg/L の濃度で使用し、ラット肝マイクロソームの存在下で試験した結果、6-チオグアニン抵抗性誘発に関して弱い活性がみられたが、背景溶媒対照データの範囲内の変動にとどまっており、再現性もなかった (Kennelly, 1987)。

4.1.2.7.2 *In vivo* 試験

複数の群の CD-1 マウスにリン酸ピペラジンを 5,000 mg/kg の用量で経口投与した GLP 準拠試験では、骨髄の多染性赤血球および正染性赤血球における小核の出現頻度に有意な上昇はみられなかった (Marshall, 1987)。最初の毒性用量設定試験では、雌雄各 2 匹のマウスに被験物質が 4,000、4,500、5,000 mg/kg の用量で経口投与された。後に本小核試験の用量として用いた 5,000 mg/kg で、死亡例はみられなかった。

陰性対照として、蒸留水を溶媒とするカルボキシメチルセルロースが使用された。陽性対照として、蒸留水を溶媒とするシクロホスファミド (CPA) が 80 mg/kg の用量で雌雄各 5 匹の 1 群のマウスに経口投与され、動物は 48 時間後に屠殺された。ピペラジン 5,000 mg/kg の投与を受けた各群雌雄各 5 匹のマウスが 24、48、72 時間後に屠殺され、試料を採取された。全般的に陽性対照動物では、正染性赤血球 (NCE) の割合が増加し、骨髄毒性が示され、また、小核を有する多染性赤血球 (PCE) および NCE の数の増加がみられ、陽性対照群の小核発現頻度は対照群に比べて有意に高かった ($p < 0.001$)。

陰性対照マウスでは NCE に対する PCE の比は正常であり、雌雄の群平均値は 0.9~1.59 で、小核を有する PCE の発現頻度 (平均 1.2~2.8/1,000) および小核を有する NCE の発現頻度 (平均 0.32~1.8/1,000) も正常であった。リン酸ピペラジン投与マウスでは PCE/NCE 比および小核を有する PCE および NCE の発現頻度は対照値とほぼ同等であった。群平均 PCE/NCE 比は 1.16~2.04、小核を有する PCE の発現頻度は 0.8~2.8/1,000、小核を有する NCE の発現頻度は 0.9~2.85/1,000 であった。リン酸ピペラジン投与動物のいずれにおいても、どの試料採取時間でも、小核発現頻度に被験物質投与に起因する統計学的有意な増加はみられなかった。

Wistar ラットの肝を部分切除し、肝再生期間にトリチウム化チミジンを用いて肝臓を標識し、2 週間後に、ピペラジン 50 mg、N,N-ジニトロソピペラジン 10~50 mg/kg が単回腹腔内投与された。肝 DNA が単離され、アルカリ溶出法で一本鎖および二本鎖切断が測定された。ジニトロソピペラジンでは陽性であったが、ピペラジンそのものには DNA 損傷誘発性の徴候はみられなかった (Stewart and Farber, 1973)。同様に、宿主經由ネズミチ

フス菌 (TA 1950) マウス試験でもピペラジンだけでは作用はみられなかった (Braun et al., 1977)。

ネズミチフス菌とマウスを用いた宿主経路試験では、N,N'-ジニトロソピペラジン (DNPZ) ばかりでなく N-モノニトロソピペラジン (NPZ) にも *in vivo* 突然変異誘発性があることが分かった (Zeiger et al., 1972)。さらに、この方法でピペラジン二塩酸塩と亜硝酸塩を同時投与したときも陽性応答がみられた (Braun et al., 1977)。

4.1.2.7.3 ヒトにおける遺伝毒性

ピペラジンの曝露を受けたスウェーデン人男性作業員 30 名および対照 30 名において、末梢リンパ球に小核が誘導されるかどうか検討された (Högstedt et al., 1988)。この作業員のコホートでは以前、非ホジキンリンパ腫の発症率上昇が報告されている (Hagmar et al., 1986)。培養リンパ球において、ポークウィード (pokeweed) 分裂刺激剤で細胞分裂が刺激されると小核の発現頻度が有意に上昇したが、フィトヘマグルチニンでは有意な上昇はみられなかった。これは、これら 2 種の細胞分裂促進因子が、染色体異常誘発物質に対する感受性が異なる別々のリンパ球亜集団を刺激するためである。すなわち、フィトヘマグルチニンは主に T 細胞を刺激し、ポークウィード分裂刺激剤は B 細胞に特異的である。統計学的に有意ではあるが、増加の程度は大きくなかった (1.1%対 0.6%)。また、被験物質曝露群の 4 例および対照群の 2 例が外れ値で、はるかに高い発現率 (3%対 2%) を示した。ポークウィード分裂刺激剤を用いると、フィトヘマグルチニンの場合に比べて小核発現率が上昇したが、対照群由来のリンパ球ではそのような上昇はみられなかった。しかし、ピペラジンの原料であるエチレンオキシドなどの遺伝毒性物質を含む、ピペラジン以外の多くの有機化学物質が同じ工場で製造されていたため、この試験結果を確信的に解釈することはできない。こうした他の物質への曝露は重大な交絡を生じる可能性があるが、直前の曝露についての情報は報告されていない。

上記と同じコホートにおいて、DNA 損傷の誘発および修復に関係するといわれている多くの項目が検討された (Pero et al., 1988)。検討項目は、N-アセトキシ-N-アセチル-2-アミノフルオレン (NA-AAF) によって誘発される不定期 DNA 合成 (UDS)、恒常的な γ 線放射によって誘導されるアデノシン二リン酸リボシルトランスフェラーゼ (ADPRT)、エポキシド加水分解酵素およびグルタチオントランスフェラーゼなどであり、評価には曝露を受けた 76 名の作業員から採取した分裂静止期の単核白血球が使用された。エポキシド加水分解酵素とグルタチオントランスフェラーゼ活性には影響はみられなかったが、NA-AAF 誘発 UDS および ADPRT 活性には、作業員 48 名から成る対照群に比べて有意な上昇がみられた。しかし著者らは、多くの既知の発がん物質を含む 100 種以上の化学物質に

曝露された可能性があり、特定の物質への曝露との明確に有意な関連性は確定できなかったと述べている。さらに、エポキシド加水分解酵素およびグルタチオントランスフェラーゼは、DNA 損傷の直接的発生にも修復にも関係なく、ほかの 2 種のマーカーについても、電離放射線照射および N-アセトキシ-N-アセチル-2-アミノフルオレンによる負荷の前からリンパ球に存在する DNA 損傷を検出できるため、疑義を生じ得る。

4.1.2.7.4 遺伝毒性の要約

In vivo 試験だけでなく、*in vitro* 試験でも、ピペラジンが点突然変異も染色体異常も誘発しないことが示された。曝露を受けた作業員の 1 コホートで小核の発現頻度が多少上昇したものの、ほかの染色体異常誘発物質の曝露を受けた可能性があるために、その意義を確定することはできない。しかし、ピペラジンのニトロソ化により生成するニトロソピペラジン類は、*in vivo* で明確な遺伝毒性を示す (*in vivo* DNA 鎖切断および突然変異)。

4.1.2.8 がん原性

4.1.2.8.1 動物における試験

各群雌雄各 15 匹の MRC ラットにピペラジン濃度 0.025% (20~25 mg/kg/日) の飲料水が毎週 5 日間、75 週間にわたって与えられたあと死亡するまで飼育され、死亡後には徹底した病理検査が行われた。被験物質投与群の動物では、雌雄各 15 匹の対照群と比べて腫瘍の増加はみられなかった (Garcia and Lijinsky, 1973)。

各群雌雄各 40 匹の Swiss マウスに濃度 6.25 g/kg の飼料 (約 938 mg/kg/日⁶) を用いて 28 週間混餌投与し、40 週目に屠殺した試験では、対照群 (雌雄各 80 匹) と比べて肺腺腫の発現率に有意な上昇はみられなかった (Greenblatt et al., 1971)。剖検後どの程度までの病理組織学的検査がなされたかは分からないが、肺腺腫およびリンパ腫に加えて、肝臓、乳腺および生殖器官が検査されたようである。意義のある所見はピペラジン投与群動物における悪性リンパ腫発現数の減少のみであった。

上記と同様に、A 系マウスを用いてピペラジンを 6.3 g/kg (938 mg/kg/日) または 18.8 g/kg (2,820 mg/kg/日) の飼料を用いて 25 週間混餌投与し、投与後 13 週間追跡観察した試験では、肺腺腫の発現数の有意な増加はみられなかった。そのほかの器官の病理組織学

⁶ マウス飼料因子 : 1 ppm = 0.15 mg/kg/日

の検査は実施されていないようである (Greenblatt and Mirvish, 1973)。

ピペラジンに関して入手し得たがん原性試験の報告は、不十分なものであり、ほとんどの点で現在の基準に適合していない。

N-モノニトロソピペラジン (NPZ) および N,N'-ジニトロソピペラジン (DNPZ) は、ともにげっ歯類に対して発がん性を有しており、中でも後者の作用が強い (Druckrey et al., 1967; Garcia et al., 1970; Love and Lijinski, 1977)。これらに関する試験の中の 2 試験において、NPZ が異なる用量で混水投与された。Love と Lijinsky の試験 (Love and Lijinski, 1977) では、NPZ が MRC ラットに 400 および 800 mg/L (1 日平均用量約 27 および 54 mg/kg に相当) の濃度で飲水投与され、その結果、鼻腔腫瘍の発現に明確な用量反応関係がみとめられた。

ピペラジン 0.025%と亜硝酸ナトリウム 0.05%を含む水を用いて週 5 日間、75 日間にわたり飲水投与 (ピペラジン 20~25 mg/kg/日) された各群雌雄各 15 匹の MRC ラットでは、ピペラジンと亜硝酸塩が併用された雌で下垂体腺腫の発現率に有意ではない増加 (対照群で 3/13 例であったのに対し 6/12 例) がみられた以外には、腫瘍発現率の上昇はみられなかった (Garcia and Lijinsky, 1973)。しかし、下垂体腺腫はラットではもっともよくみられる新生物の一つであり、この系統のそのように週齢の高い (100 週) 動物に関してみれば、発現率の上昇の程度は背景対照データの範囲内の変動にとどまっていた。ニトロソアミンではよくみられる種類の腫瘍 (鼻腔など) の発現率の上昇はみられなかった。

各群雌雄各 40 匹の Swiss マウスに、ピペラジン濃度 6.25 g/kg の飼料 (約 938 mg/kg/日) および亜硝酸塩濃度 1 g/L の飲料水が週 5 日で 28 日間にわたり与えられ、マウスは 40 週目に屠殺された (Greenblatt et al., 1971)。投与群では、対照群 (雌雄各 80 匹) に比較して肺腺腫の有意な増加 (腺腫担がんマウス発現率が対照群で 14%であったのに対して 64%) がみられた。そのほかの種類腫瘍の増加はみられなかった。データは、雌雄別々に報告されていない。また、Swiss マウスの雌ではいくつかの系統で、肺腺腫の自然発生率が最大で約 50%であることが報告されている (Sher, 1974) ことに留意する必要がある。

A 系マウスを用いたその後の試験 (Greenblatt and Mirvish, 1973) では、各群雌雄各 40 匹に対して種々の濃度のピペラジン (104~2,820 mg/kg/日) が、亜硝酸塩濃度一定の飲料水 (1 g/L) とともに週 5 日間、25 週間にわたり混餌投与され、動物は投与後 13 週間たつてから屠殺された。この試験の第 2 シリーズでは、亜硝酸塩が種々の濃度 (0.05~2.0 g/L) で飲水投与され、飼料中ピペラジン濃度は一定 (938 mg/kg) とされた。ピペラジン 938 mg/kg の飼料と亜硝酸塩 0.05 g/L 飲料水の併用時を除く、すべての併用曝露群で肺腺

腫の増加がみられた。ほかの種類腫瘍のデータは報告されていないが、A系マウスは、多くの発がんイニシエーターおよびプロモーターによる肺腺腫誘導作用を極めて受けやすいことがかなり以前から知られている。多くの研究者が報告しているように、この腫瘍の自然発生率は高く、それに加えて極めて変動しやすい。例えば、Heston (Heston, 1942) は、対照として用いた A系マウスの肺腫瘍の発生率を、6か月齢で 20%、12か月齢で 50%、18か月齢で 90%と報告している。このような背景発生率には発がん物質への曝露だけでなく、多くの不特定因子も影響している。例えば、発生率は、飼料の制限により低下するが、コルチコステロンにより上昇する。この場合でも対照群の背景発生率が高かったという事実に加えて、著しい変動がみられた（腺腫がみられた対照群マウスは 1 回目の実験では 32%で、2 回目では 13%）ことから、動物の投与群への無作為割付ができていなかった可能性がある。このような理由から、上記の試験で信頼できる結論を導くことは極めて困難である。

4.1.2.8.2 ヒトにおけるがん原性

スウェーデンの化学工場で、ピペラジンおよびそれ以外にエチレンオキシド、エピクロロヒドリン、ウレタンのような発がん物質を含む多数の化学物質への曝露を受けた男性作業員 664 名に関する後ろ向きコホート研究では、悪性リンパ腫または骨髄腫の罹病率に統計学的に有意な上昇がみられた。しかし、複合的な曝露による交絡があるため、この報告から信頼できる結論を導くことはできない。このコホート内で行われた症例-対照研究では、何らかの特定の化学物質との有意な関連性は示されなかった (Hagmar et al., 1986)。

4.1.2.8.3 ピペラジンの二次的ニトロソ化の重要性

第二および第三級アミノ化合物のニトロソ化によりニトロソアミン化合物が生成されるが、第二および第三級アミノ化合物を含む食物や飲料があり、ヒトの胃の酸性環境下でニトロソアミン化合物が生成されることは、極めて強く懸念されている (Magee, 1982; IARC, 1991)。また、少数であるが、ヒトのがんの原因を N-ニトロソアミンへの曝露に帰することができる例がある。例えば、高レベルのジメチル-およびジエチルニトロソアミンを含む広東風漬け魚を食する集団でみられる鼻咽癌 (Fong, 1982)、(Yu et al., 1986)、およびタバコに含まれるニトロソアミン化合物による口腔・咽頭癌 (IARC, 1985; Nilsson, 1998) である。ピペラジンの 2 種のニトロソ誘導体、すなわち、N-モノニトロソピペラジン (NPZ) および N,N'-ジニトロソピペラジン (DNPZ) は *in vivo* で突然変異を誘発し、げっ歯類では発がん性を示すことが分かっている (セクション 4.1.3.1.6 参照)。

動物用医薬品委員会 (EMEA, 1999) は、N-モノニトロソピペラジンがヒトで発がん性を示すことを前提に、ピペラジンに考えられる発がん性リスクを数値化した。その際、種々の数学的モデルを、それらがこの場合に有している制約を十分加味しながら利用した。計算から得られた結論は、リスクが仮にあったとしても、委員会が仮定を行った集団では極めて小さいように思われるというものであった。

4.1.2.8.4 がん原性試験の要約

ピペラジンの発がん作用を示す確かな指摘は動物試験でもヒトの研究でもみられなかったが、明確な結論を出せるだけの十分な確証データベースがない。しかし、遺伝毒性作用がないことを考えると、ピペラジンに発がんリスクがあるとは考えられない。ピペラジンの2種のニトロソ誘導体、すなわち NPZ および DNPZ (そのうち、NPZ はピペラジンの副次的代謝物として同定された) は、*in vivo* で突然変異を誘発することが判っており、げっ歯類では発がん性を示すことも明らかとなっている (セクション 4.1.3.1.6 参照)。

4.1.2.9 生殖毒性

4.1.2.9.1 動物における試験

発生毒性

各群雌 24 匹の Charles River CD(SD)BR ラットに、リン酸ピペラジンが 250、1,000、5,000 mg/kg 体重 (ピペラジン塩基として 105、420、2,100 mg/kg) の用量で、妊娠 6～15 日目に強制経口投与された。一般状態、体重、摂餌量が記録され、動物は 20 日目に屠殺され、胎子について詳細な外表、内臓および骨格検査が行われた。被験物質投与による死亡例はなかったが、最高用量では過剰流涎、嗜眠、体重増加抑制 (6～15 日目)、体重減少 (15 日目に 7%) および摂餌量の減少 (6～11 日目で 14%、11～15 日目で 9%) などの母体毒性の徴候がみられた。この用量では、胎子体重の相対的低値 (7%) が記録されたが、どの用量でも催奇形性は報告されていない。着床前および着床後胚損失、同腹仔数および性比に対するピペラジン投与の影響はみられなかった (Ridgway, 1987b)。

ニュージーランド白色ウサギを用いて、胚・胎子発生に対するリン酸ピペラジンの影響を評価するために GLP 準拠試験も行われた (Ridgway, 1987a)。その試験は、曝露期間が器官形成期に限られていたため、現在の OECD ガイドライン 414 の要求事項を満たすものではない。各群 16 匹の動物に、リン酸ピペラジン 1% w/v メチルセルロース懸濁液が 0、

100、225、500 mg/kg/日（ピペラジン塩基として0、42、94、210 mg/kg）の用量で胃内挿管により経口投与された。雌に対する投与は妊娠 6～18 日目に行われ、一般状態、体重、摂餌量が記録された。母動物は妊娠 28 日目に屠殺され、剖検に供された。胎仔については、詳細な外表、内臓および骨格検査が行われた。ピペラジン塩基 210 mg/kg では、投与母動物に神経毒性徴候などの明瞭な毒性徴候がみられた。その神経毒性徴候は過剰流涎および神経過敏であり、被験物質投与群のすべての動物にみられた。ほかの有害な影響の症状は、食欲不振、糞便量減少または無便、体重減少（対照群で 6%の体重増加に対して高用量で 9%の体重減少）を伴う摂餌量減少（6～14 日で 85%など）であった。雌 2 例が切迫屠殺され、1 例が流産した。雌の屠殺例では、胃および十二指腸の粘膜のびらんを含む腸の異常がみられた。ピペラジン塩基 94 mg/kg/日では、体重に対する影響はみられなかったが、投与の最初の 4 日間は摂餌量の一時的減少（-39%）および体重増加の一時的抑制がみられた。雌 1 例が流産し、雌 5 例に短期間の糞便量の減少がみられた。雌 1 例が死亡したが、これは肺への誤投与によるものとされた。ピペラジン塩基 42 mg/kg/日では影響はみられなかった。ピペラジン塩基 94 mg/kg/日は、境界上限値であるが、本試験における母体に関する LOAEL であると考えられる。

ピペラジン塩基 210 mg/kg/日では、強い胚毒性がみられ、催奇形性も示された。着床後胚損失率は高く、吸収率は 4 腹で 100%であった。胎仔体重は軽く、軽微な骨化遅延がみられた。さらに、合計 8 腹の胎仔 56 例中 15 例（23%）で、重大な異常（口蓋裂 6 例、臍ヘルニア 9 例）がみられた〔比較対照群でみられたのは 86 例中 2 例（1.7%）〕。対照、低用量、中間用量、高用量の 4 群における重大な異常の発現頻度は、腹ごとに表わすと、それぞれ 14 腹中 2 腹、14 腹中 4 腹、14 腹中 0 腹、8 腹中 5 腹（さらに高用量群の流産例の 1 腹が加わる）であった。その異常は特殊でまれなものであったが、ウサギの絶食試験でもみられた（Clarke, 1986）。そのため、それらの異常は、母体毒性から続発的に生じたものと考えられる。後肢の骨化遅延の発現頻度も上昇した（骨端で対照群の 40%に対して 86%、距骨で対照群は 0%という例数であったのに対して 5.7%）が、これはおそらく母体毒性によると思われる。ピペラジン塩基 94 および 42 mg/kg では、着床後胚損失、胎仔体重、骨化度および胎仔の性比に投与の影響はみられなかった。また、低用量 2 群では胎仔異常の有意な増加はみられなかった。全体的に見て、ピペラジン塩基 210 mg/kg/日で観察された作用は、母体毒性から派生したものと考えられる。

要約すると、ピペラジンは、ラットでは催奇形性物質ではないと考えられる。ウサギでは、母体毒性が発現する用量になると催奇形性も惹起される可能性がある。母体毒性に関する LOAEL はピペラジン塩基として 94 mg/kg/日で、NOAEL は 42 mg/kg/日である。

多世代試験

Sprague-Dawley CD ラットを用いた、OECD 試験ガイドライン No. 416 に準拠した二世世代生殖試験では、各群の雌雄に、ピペラジン二塩酸塩が、飼料中 0、5,000、12,000、25,000 ppm (250、600、1,250 mg/kg/日) の用量で、二世世代連続で成熟、交配、妊娠、哺育の全期間にわたり投与された (Wood and Brooks, 1994)。用量をピペラジン塩基として表わすと 125、300、625 mg/kg/日であった。F₀ の雌雄 (各群雌雄 32 匹ずつ) では、雄が 73 日間、雌が 17 日間投与を受け、それぞれの投与用量群内で最長 21 日間同居飼育された。その後の混餌投与は、両世代の交配、妊娠、授乳の全期間にわたって続けられた。生後 21 日目の離乳時に、各群雌雄 28 匹ずつの出生仔が無作為に選別され、親 F₁ 世代とされた。同世代の残りの動物は屠殺され、肉眼的病理検査に供された。F₁ 動物はピペラジンを 80 日間混餌投与され、全例の性的発育が観察された。雌雄は最長 21 日間同居飼育された。妊娠雌を分娩させ、出生仔は成長・発育が観察された。F₀ 成熟動物および F₁ 雌雄は屠殺され、肉眼的病理検査に供された。所定の組織および器官について、重量の測定や固定剤への保存が行われた。F₀ および F₁ 成熟動物の高用量群および対照群動物では、所定の組織と器官について、病理組織学的検査が行われた。さらに、F₁ 雌全例で着床痕が計数された。しかし、肉眼的剖検所見は記録されたが、病理組織学的検査は生殖器官と下垂体に限られていた。親動物では一般状態が毎日観察され、体重および摂餌量は成熟期間では週 1 回記録され、さらに雄については交配期間以後も続けられた。交尾が確認された雌については、交尾後と分娩後の所定の日に体重が測定され、摂餌量が記録された。出生仔については、一般状態が毎日観察され、体重が記録された。授乳期間には、出生仔の身体的発育を示す指標が、同腹仔全体で見えていつ発現し始め、いつ達成し終えたかについて観察が行われた。授乳期間の所定の日に、出生仔の反射機能検査が行われた。この検査には、平面立ち直り反射 (生後 1 日目)、空中立ち直り反射 (生後 17 日目)、驚愕反射 (生後 21 日目)、瞳孔反射 (生後 21 日目) が含まれていた。

最高用量群の F₀ 雌 1 例が分娩後 19 日目に死亡したが、ピペラジン塩基 300 および 125 mg/kg/日投与群では死亡例はなかった。また、被験物質投与群のいずれにおいても体内や外表に被験物質による重大な肉眼病変はみられず、雌雄の生殖器官の組織切片を顕微鏡検査したところ、重大な組織病理学的異常はみられなかった。

Table 4.16 に、11 週間の投与後に得られた、異性との同居飼育前の F₀ および F₁ 雄ならびに F₀ および F₁ 雌の群平均体重を示す。妊娠期間においても、F₀ の最高用量群および F₁ 母動物の中間用量以上で体重増加量の減少がみられた (なお、F₀ の中間用量群動物では妊娠 14 日目に 3% の減少がみられた)。しかし、体重増加量は補正 (体重増加量からの子宮内容物重量の減算) されていない。**Table 4.17** には、試験第 11 週の同居飼育前の群平均摂餌量 (fc) および飼料要求率 (fcr) を示す。

Table 4.16 Group mean body weights after 11 week's treatment for F₀ and F₁ males as well as for F₀ and F₁ females before pairing

Dose (mg/kg/day)	Generation	Bodyweight/Females	Bodyweight/Males
0	F ₀	273±15	569±58
125	F ₀	276±17	548±52
300	F ₀	273±13	534±43**
625	F ₀	265±12*	518±41***
0	F ₁	290±24	481±49
125	F ₁	291±26	470±52
300	F ₁	263±27***	440±54**
625	F ₁	240±22***	386±46***

Table 4.17 Group mean food consumption (fc) and group mean food conversion ratios^a (fcr) before pairing at study week 11 for F₁ males and females.

Dose (mg/kg)	fc, males F ₁	fc, females F ₁	fcr, males	fcr, females
0	29.5±3.0	22.0±1.0	0.09	0.04
125	29.3±1.5	22.0±0.8	0.09	0.05
300	28.7±1.3	20.6±1.0*	0.10	0.05
625	27.3±2.3	19.1±0.9***	0.11	0.06

* p<0.05

** p<0.01

*** p<0.001

a) Food conversion ratio = group mean body weight gain (g/day) during week divided by group mean food consumption (g/rat/day)

F₀ および F₁ 動物の両性で統計学的に有意な体重増加抑制が起こったことから分かるように、ピペラジン塩基 625 mg/kg/日では成熟ラットに対する毒性が明確に認められ、その影響は第二世代の方がより明白であった (F₀ 雌で 3%、F₀ 雄で 9%、F₁ 雌で 17%、F₁ 雄で 20%) (Table 4.16)。さらに妊娠数の減少がみられたが、その減少が統計学的有意に達したのは F₁ (対照群の 100%に対して 81.5%) に限られた。一腹出生仔数は、両世代で減少した (F₁ および F₂ で対照群のそれぞれ 59% および 32%) (Table 4.18) が、生存出生率や授乳期間生存率には影響はなく、一連の反射機能検査でも出生仔の身体発育への影響はみられなかった。しかし、出生仔の性比にはいずれの用量でも有意差はみられなかったものの、F₁ 世代では雌雄 (F₂ は検査されていない) とともに性成熟 (雌では膈開口、雄では包皮分離が観察されること) の遅延がみられた。だが、Carney ら (1998) による制限給餌試験で示されたように、性的発達の遅延は、2 週目以降に観察された体重減少 (それぞれ約 25%) に起因する可能性が高い。

F₂ 成熟動物では妊娠率の低下に加えて着床痕数の減少および同一母体における全胚死亡がみられたことから、着床前および着床後胚損失の発生が考えられる。

Table 4.18 Summary of reproductive outcome

Generation	Endpoint	control	125 mg/kg/day	300 mg/kg/day	625 mg/kg/day
F0	number of animals paired	32	32	32	32
	numbers pregnant	29	29	32	21
	numbers with live offspring	29	29	32	21
	numbers failing to conceive	3	3	0	11
	number of females dying during lactation/parturition	2	0	0	1
	total litter loss	3	1	1	0
	number of implantation sites	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	number of females rearing young to weaning	24	28	31	20
	F0 offspring (=young F1)	litter size at birth	15.7±2.2 (24)	15.3±2.3 (28)	14.3±2.6* (31)
	group mean birth weights	6.0±0.7	6.0±0.6	6.2±0.6	6.7±0.9**
	live birth index (%)	94	94	96	95
Adult F1	number of animals paired	28	28	28	28
	numbers pregnant	28	27	26	22*
	numbers with live offspring	28	26	25	14
	numbers failing to conceive	0	1	2	6
	number of females dying during lactation/parturition	0	1	1	2
	total litter loss	0	0	0	6 gestation /4 lactation
	number of implantation sites	16.6±2.2	16.1±2.3	13.2±4.3***	4.2±3.1***
	number of females rearing young to weaning	28	26	25	10
F1 offspring (=young F2)	litter size at birth	15.1±2.4 (28)	14.4±2.4 (27)	12.8±3.3** (25)	4.9±3.0*** (12)
	group mean birth weights	6.2±0.7	6.3±0.7	6.3±0.7	7.2±0.7***
	live birth index (%)	98	92	99	95

n.i. Not investigated,

* p<0.05,

** p<0.01

*** p<0.001, (number of litters in parenthesis)

ピペラジン塩基 300 mg/kg/日では、体重増加への影響は少なめであった。しかし、F₀ 雌では統計学的に有意ではなかったが、F₀ 雄では統計学的に有意な低減 (9%) を示した。F₁ 親世代では、雌雄ともに 2 週目から体重の有意な減少がみられ、摂餌量の軽微な減少もみられた (F₁ 雌で 9%、F₁ 雄で 9%)。しかし、飼料要求率は対照値とほぼ同等であった。妊娠数に対する影響はなかったが、出生時の一腹仔数は両世代ともに統計学的有意に減少した (F₀ 出生仔および F₁ 出生仔でそれぞれ対照値の 91%および 85%)。F₁ 雌では着床痕数の減少 (群平均値 = 対照群で 16.6 であったのに対して 13.2) がみられた。さらに、

F₁雄 (F₂では検査なし) で性成熟 (包皮分離) の遅延がみられたが、出生仔の性比に有意差はみられなかった。出生仔の性的発達の群平均完了日数も雌では増加したが、この増加は統計学的に有意ではなかった。性的発達遅延が成長速度の低下 (性成熟時の体重減少は約 9%) によるものかどうかは不明である (Table 4.19)。

Table 4.19 Group mean day of completion of offspring sexual development, F₁ generation

Dose (mg/kg)	males	females
0	42.3±1.3	42.6±8.6
125	42.1±1.6	44.8±12.1
300	43.5±1.6**	49.5±9.2
625	44.8±1.9***	54.3±11.2***

* p<0.05
 ** p<0.01
 *** p<0.001

ピペラジン塩基 125 mg/kg/日では、ピペラジン投与に起因すると考えられる影響はみられなかった。この用量でみられた臨床所見は、曝露された雌全例 (全群) の床敷に鮮黄色の尿がみられたことだけである。これは対照群動物でも曝露群の雄でもみられなかった。

生殖機能への影響に関しては、当試験によれば、5,000 ppm (ピペラジン塩基として 125 mg/kg/日) が NOAEL、12,000 ppm (300 mg/kg/日) が主に受胎能への影響に対する LOAEL と考えられる (受胎能への影響は、すなわち妊娠率の低下および着床痕数の減少であるが、着床後胚損失も、F₂においてみられた同腹全胚損失により示唆される)。ラット発生毒性試験 (Ridgway, 1987b) では影響がみられなかったということは、ラットの生殖機能に対するピペラジンの主な作用は受胎能に対するものであるということをサポートするものと考えられる。性的発達の遅延は成長の遅れ (体重は 2 週目以降に減少した) に起因する可能性があるため、実際のところ、毒性学的意義はないと考えられる。母動物において毒性影響が誘発されているが、300 mg/kg/日群の F₀雌では体重増加抑制はみられなかった。F₁雌では、妊娠期間における体重増加率は、対照群で 49%であったのに対して 44%であった。しかし、F₁雌の妊娠前の体重は、対照群より 9%軽かった。F₀および F₁雄ならびに F₁雌では 300 mg/kg/日で体重増加量の有意な減少がみられたことから、成熟動物に対する NOAEL は、ピペラジン塩基として 125 mg/kg/日と推定される。生殖器官と下垂体以外の器官については、病理組織検査データはない。

4.1.2.9.2 ヒトの生殖機能

手足に奇形のある女児の症例報告が 1 例あり、母親がピペラジンの曝露を受けたためと思われる (Keyer and Brenner, 1988)。母親はアジピン酸ピペラジンを、おそらく妊娠 41～47 日目および 55～61 日目にかけての期間に、7 日間の服用 (2,100 mg/日すなわち体重 55 kg と仮定すると 38 mg/kg/日) を 2 回繰り返した。出生時に両手と片足の奇形がみられた。その両親は既に 2 児 (この例の 4 年および 7 年前) をもうけており、ともに健常である。この例だけでピペラジン投与との関係があるかどうかを評価することは難しい。

4.1.2.9.3 生殖毒性の要約

生殖毒性に関しては、主効果である同腹仔数の減少から判断して、NOAEL はピペラジン塩基として 125 mg/kg/日、LOAEL は 300 mg/kg/日と考えられる。F₁ の雌雄および F₀ の雄では 300 mg/kg/日で体重減少 (10%未満) がみられたことから、成熟動物に対する NOAEL はピペラジン塩基 125 mg/kg/日と推定される。ニュージーランドウサギで胚毒性および催奇形性がみられたのは、母動物で明白な毒性徴候が発現した用量に限られた (母体毒性に関する LOAEL は 94、NOAEL は 42 mg/kg/日)。

したがって、受胎能に対する影響、すなわち妊娠率の低下、着床痕数の減少および同腹仔数の減少に関する NOAEL および LOAEL は、それぞれ 125 および 300 mg/kg/日であった。

ピペラジンの分類としては、生殖毒性カテゴリー 3 (Repr. Cat 3) ; R62～R63 が提言される。