

内閣府食品安全委員会事務局
平成23年度食品安全確保総合調査

ポジティブリスト制度施行に伴う暫定基準の設定された
農薬、動物用医薬品及び飼料添加物に係る
食品健康影響評価に関する調査報告書

ゼラノール

平成24年1月

株式会社三菱化学テクノロジー

はじめに

食品安全委員会では、ポジティブリスト制度導入に伴い、暫定基準の設定された農薬、動物用医薬品及び飼料添加物(以下「農薬等」という。)について、海外のリスク評価機関等で実施された評価結果を活用し、順次食品健康影響評価を行っているところである。

本報告書はこの内、ゼラノールについて、国際的な評価機関である **FAO/WHO** 合同添加物専門家会議(以下「**JECFA**」という。)の評価書の翻訳を行うとともに、評価に必要な情報について整理し、取りまとめたものである。

平成 24 年 1 月

株式会社三菱化学テクニサーチ

目 次

ゼラノール

1. 調査の目的	5
2. 作業の概要	5
2.1. 調査対象物質	5
2.2. 評価書の翻訳	7
2.2.1. 評価書	7
2.3. 翻訳の整理	7
3. 評価書和訳	7
3.1 JECFA(1987年)	9
3.2 JECFA(1987年)	25

海外のリスク評価機関における農薬の評価結果に関する調査 報告書

ゼラノール

1. 調査の目的

食品衛生法の一部を改正する法律(平成15年法律第55号)の施行に伴い、いわゆるポジティブリスト制度が、平成18年5月29日に導入された。本施行に伴い、農薬、動物用医薬品及び飼料添加物(以下「農薬等」という。)758物質に暫定基準が設定され、食品安全委員会では、これらの物質について、海外のリスク評価機関等で実施された評価結果を活用し、順次食品健康影響評価を行っているところである。

本調査は、国際的な評価機関である JMPR (FAO/WHO 合同残留農薬専門家会議) 及び JECFA (FAO/WHO 合同残留添加物専門家会議) と最新の評価を行っている EFSA (欧州食品安全委員会) の評価書が、我が国での評価を行う上で有益性が高いため、今後評価を行うべき農薬のうち、JMPR 及び JECFA と EFSA の双方の評価を比較できるものについて、双方の評価書の翻訳を行うとともに評価に必要な情報について整理し、評価書ごとに毒性試験とその結果の概要を一覧表に取りまとめたものである。

2. 作業の概要

本調査では JMPR 及び JECFA と EFSA における評価書の翻訳及び整理を以下のように実施した。

2.1. 調査対象物質

本調査全体では、ポジティブリスト制度施行に伴う暫定基準が設定された農薬等の 758 物質のうち、表1に示した 38 物質を調査対象とした。本報告書では、これらのうちゼラノールの調査について報告した。

表 1 調査対象の農薬等

番号	物質名	主な用途
1	5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン (アルベンダゾール)	動物薬・寄生虫駆除剤
2	イソメタミジウム	動物薬・寄生虫駆除剤
3	エトキシキン	農薬/飼料添加物・成長調整剤・抗酸化剤
4	オイゲノール	動物薬・麻酔薬
5	オルトフェニルフェノール	農薬・殺菌剤
6	カルバドックス(キノキサリン-2-カルボン酸含む)	動物薬・合成抗菌剤
7	キントゼン(PCNB)	農薬・殺菌剤
8	クロサンテル	動物薬・寄生虫駆除剤
9	クロルプロマジン	動物薬・鎮静剤
10	酢酸トレンボロン	動物薬・ホルモン剤
11	サラフロキサシン	動物薬・合成抗菌剤
12	ジエチルスチルベストロール(DES)	動物薬・ホルモン剤
13	ジクラズリル	動物薬・寄生虫駆除剤
14	シクロキシジム	農薬・除草剤
15	ジブチルヒドロキシトルエン	飼料添加物・抗酸化剤
16	ジメトリダゾール	動物薬・寄生虫駆除・抗寄生虫剤
17	スペクチノマイシン	動物薬・抗生物質
18	スルファジミジン	動物薬・合成抗菌剤
19	ゼラノール	動物薬・ホルモン剤
20	デキサメタゾン	動物薬・ホルモン剤

番号	物質名	主な用途
21	テクナゼン	農薬・殺菌剤・成長調整剤
22	ドジン	農薬・殺菌剤
23	トリクラベンダゾール	動物薬・寄生虫駆除剤
24	トリベヌロンメチル	農薬・除草剤
25	ナイカルバジン	動物薬/飼料添加物・合成抗菌剤・寄生虫駆除剤
26	ネオマイシン	動物薬・抗生物質
27	バシトラシン	動物薬/飼料添加物・抗生物質
28	ビオレスメリン	農薬・殺虫剤
29	ピペロニルブトキシド	農薬/動物薬・共力剤
30	ブチルヒドロキシアニソール	飼料添加物・抗酸化剤
31	フルアズロン	動物薬・ダニ駆除剤
32	フルメリン	農薬/動物薬・殺虫剤
33	ブロモプロピレート	農薬・ダニ駆除剤
34	ポリミキシンB	動物薬・抗生物質
35	マレイン酸ヒドラジン	農薬・除草剤・成長調整剤
36	メトロニダゾール	動物薬・寄生虫駆除剤・抗原虫剤
37	モキシデクチン	動物薬・寄生虫駆除剤
38	ロニダゾール	動物薬・寄生虫駆除剤・抗原虫剤

2.2. 評価書の翻訳

2.2.1. 評価書

ゼラノールに関して、これまでに食品安全委員会にて収集を行っている JECFA における評価書の指定部分の翻訳を行った。各評価書等を表 2 に示した。

表 2 調査対象の評価書

機関	発行年	タイトル
JECFA	1987	FNP 41-JECFA 32/38, 1987
JECFA	1987	FAS 23-JECFA 32/123, 1987

2.3. 翻訳の整理

評価書の翻訳について、評価書ごとに以下のように整理した。

- ・評価書ごとに見出しを整理し、原文の目次を作成した。
- ・翻訳の見出し部分に原文の該当ページを記載した。
- ・毒性試験とその結果の概要を一覧表に取りまとめた。

3. 評価書訳

以下に評価書の指定箇所の全訳を、評価書ごとに掲載した。

ゼラノール 評価書和訳と情報整理

JECFA 1987

ウェブサイト:<ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jecfa/vetdrug/41-1-zeranol.pdf>

FNP 41-JECFA 32/38, 1987

ゼラノール 評価書訳和訳と情報整理 JMPR (1987) 目次

評価対象動物薬の概要 (p. 38)	13
その他の概要特性 (p. 38)	13
純粋な有効成分 (p. 38)	13
工業品中の有効成分: (p. 38)	13
天然物: (p. 38)	14
食物中残留物とその評価 (p. 40)	15
使用条件 (p. 40)	15
全般的事項 (p. 40)	15
用法: (p. 40)	16
放射性標識残留物試験 (p. 40)	16
全般的事項 (p. 40)	16
ラット (p. 41)	16
カニクイザル (p. 41)	17
牛 (p. 41)	17
代謝及び代謝の比較 (p. 43)	18
残留物試験 (p. 44)	19
不正使用条件 (p. 44)	20
残留物分析の方法 (p. 45)	21
全般的事項 (p. 45)	21
RIA (p. 45)	21
キャピラリーGC (p. 45)	22
GC/MS (p. 46)	22
評価 (p. 46)	22
略称	23

原文 目次

原文ページ

IDENTITY-----	38
OTHER INFORMATION ON IDENTITY AND PROPERTIES-----	38
Pure active ingredient-----	38
Technical active ingredient-----	38
Natural occurrence-----	38
RESIDUES IN FOOD AND THEIR EVALUATION-----	40
CONDITIONS OF USE-----	40
General-----	40
Dosages-----	40
RADIOLABELED RESIDUE STUDIES-----	40
General-----	40
Rats-----	41
Cynomolgus Monkeys-----	41
Cattle-----	41
Metabolism and Comparative Metabolism-----	43
RESIDUE STUDIES-----	44
Abusive Conditions of Use-----	44
METHODS OF RESIDUE ANALYSES-----	45
General-----	45
RIA-----	45
CAPILLARY GC-----	45
GC/MS-----	46
APPRAISAL-----	46

ゼラノール

評価対象動物薬の概要 (p. 38)

化学名： (3S,7R)-3,4,5,6,7,8,9,10,11,12-デカヒドロ-7,14,16-トリヒドロキシ-3-メチル-1H-2-ベンズオクサシクロテトラデシン-1-オン

(3S,7R)-3,4,5,6,7,8,9,10,11,12-decahydro-7,14,16-trihydroxy-3-methyl-1H-2-benzoxacyclotetradecin-1-one

6-(6,10-ジヒドロキシウンデシル)-β-レゾルシル酸 α-ラクトン

6-(6,10-dihydroxyundecyl)-β-resorcylic acid α-lactone

別名： α-ゼアラノール (zearalanol)

P-1496

構造式： ゼラノール及び関連するレゾルシル酸ラクトン (RAL) 化合物の構造式を図 1 に示す。

分子式： C₁₈H₂₆O₅

分子量： 322.40

その他の概要特性 (p. 38)

純粋な有効成分 (p. 38)

外見： 白色の結晶性で無臭の粉末

融点： 181～185°C

旋光度： $[\alpha]_D^{25} = +44.5^\circ \sim 47.5^\circ$ (c = 1.0 メタノール溶液中)

UV_{max}： 218, 265, 304 nm

(Windholz, 1983)

工業品中の有効成分： (p. 38)

ゼラノールは、フザリウム・グラミネアラム菌 (*Fusarium graminearum*, *Gibberella Zeae*) の液体培養で産生されるカビ毒のゼアラレノンから得られる。ゼアラレノンを経還元すると 7-位のケトンがα-及びβ-の水酸基へと変換され、それらの混合物となる。また、この時同時に起こる C-11 位と 12 位の不飽和結合に対する水素添加反応でα-及びβ-のゼアラノールの混合物が得られる。市販のゼラノールにはα-ジアステレオマーのみが特異的に含まれている。

不純物合計: $\leq 2 \text{ g}/100 \text{ g}$

不純物の性質: タレラノール (β -ゼアララノール): $\leq 1.5 \%$

ゼアララノン: $\leq 0.15 \%$

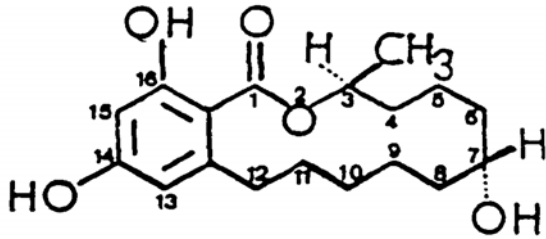
ゼアラレノン: $\leq 0.01 \%$

天然物: (p. 38)

ゼラノールは、ゼアラレノンを生産する 7 つのフザリウム (Fusarium spp.) 分離株により天然で生産される代謝物であることが明らかにされている。7 つのフザリウム株 (6 つの異なる菌種) は、飼料製品又は飼料用植物 (クローバー又はアルファルファ) から分離された。フザリウム分離株によるゼラノール (及びタレラノール) の天然で直接的な産生は、家畜用飼料中においてもこれらの誘導体が生成することを示唆するもので、重要である。実際、と殺された牛において組織残留物として検出されたゼラノール及びその代謝物並びにその他のレゾルシル酸ラクトンは天然由来のものである可能性があり、必ずしも同化剤の埋め込み投与が原因ではないことを意味する (Richardson et al., 1985)。

図 1

RAL の命名法

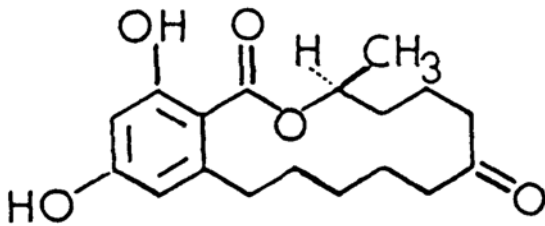


ゼラノール

α -ゼアラノール

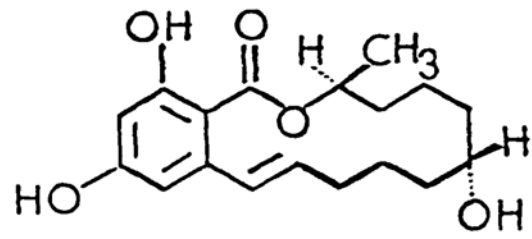
P-1496

HMTHFES



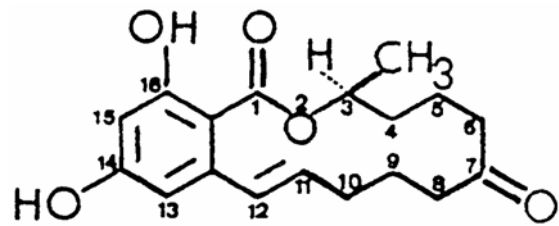
ゼアララノン

P-1502



α -ゼアラレノール

P-1504

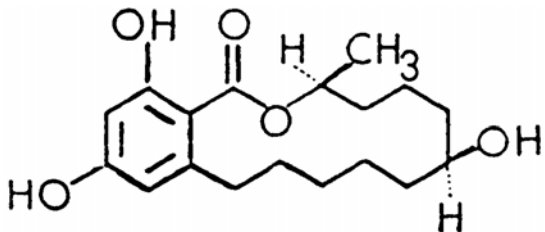


ゼアラレノン

P-1492

F-2 toxin

(文献にある天然の「マイコトキシン」)

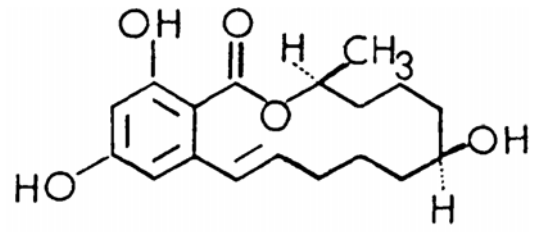


タレラノール

β -ゼアララノール

P-1560

LMTHFES



β -ゼアラレノール

P-1503

食品中残留物及びその評価 (p. 40)

使用条件 (p. 40)

全般的事項 (p. 40)

ゼラノールは非ステロイド性同化剤であり、授乳期、離乳期、育成期及び仕上げ期の牛に対して耳の皮下に埋込んで投与する。この埋め込み剤は、体重増加量及び飼料効率を向上するために、単剤で用いられるか、他のホルモン剤と併用で用いられる。

用法：(p. 40)

ラルグロ (Ralgro、ゼラノール 36 mg)

フォルプリックス (Forplix、酢酸トレボロン 140 mg + ゼラノール 36 mg)

放射性標識残留物試験 (p. 40)

全般的事項 (p. 40)

ゼラノールの代謝については、ゼラノールが用いられる種々の動物種において(11,12-³H)ゼラノールを用いて試験が実施されている。放射能標識体の純度は 97 % よりも高いものが用いられた。ラットに皮下(sc)投与し、その組織及び排泄物を ³H₂O について調べた結果、³H の交換は極めて少ないことが示された。³H の交換が起こらないことは、いくつもの代謝試験でゼラノール分子のラクトン環が安定であることが示されたことから、さらに証明された。

表 I. ラットにおける総残留物及びその構成成分

	肝臓	尿 ¹	糞 ²	血液
全残留物	84-207 µg/kg	7-13 mg/kg	0.1-0.3 mg/kg	10-17 µg/kg
雌				
ゼラノール	25-30 %	21 %	20 %	
ゼアララノン	25-30 %	26 %	50 %	
タレラノール	6-7 %	4 %	<10 %	
極性成分 ³	6-7 %	34 %	<10 %	
雄				
ゼラノール	13 %	3-9 %		
ゼアララノン	20 %	"		
タレラノール	13 %	"		
極性成分	13 %	69 %		

¹ 加水分解処理をしない尿を用いての特徴付け

² 結果は両動物種で同じだった

³ 極性成分とは逆相 HPLC カラムで早く溶出された成分として定義される

ラット (p. 41)

ラット(雌雄各 2 匹、計 4 匹)を用いた ³H-ゼラノール(1.5 mg)の経口投与試験が実施された。全血、肝臓、尿及び糞中の放射能を定量し、HPLC を用いて肝臓、尿及び糞中の ³H-残留物を同定し、定量した。試験結果を表 I にまとめた。雌ラットの肝臓中の主要残留物はゼラノール及びゼアララノンであり、それぞれ ³H-総残留物の 25 ~ 30 % を占め、タレラノール及び極性成分がそれぞれ 6 ~ 7 % を占めた。雄ラットの肝臓中の主な残留物は代謝物であるゼアララノン(20 %)であった。ラットにおける尿中の主要残留物は雌雄とも極性成分であった。雌雄ラットの尿をグルスラーゼ (Glusulase) で酵素加水分解処理すると極性成分が減少した。糞中ではゼアララノン

が³H-総残留物の約 50%を占め、ゼラノールは約 20 %を占めていた。これらの結果には、大きな性差はみられなかった(Mulkey, 1985a)。

カニクイザル(p. 41)

カニクイザル(雌雄 2 頭、計 4 頭)を用いた³H-ゼラノール(1.5 mg)の経口投与試験が実施された。血清、肝臓、尿及び糞中の放射能を定量し、HPLCを用いて肝臓、尿及び糞中の³H-残留物を同定し、定量した。試験結果を表 II にまとめた。性差は明確ではなく、肝臓及び糞中の主要残留物はゼラノールであった。加水分解処理をしない尿中の残留物はいずれも極性成分であった。グルスラーゼ(β-グルクロニダーゼ/スルファターゼ)で加水分解処理した後では、放射標識された主要残留物はゼラノールであり、³H-総残留物の約 25 %を占めていた(Mulkey, 1985b)。

表 II. カニクイザルにおける総残留物及びその構成成分

	肝臓	尿 ¹	糞	血清
全残留物	102-195 µg/kg	5 mg/kg	5 mg/kg	28-49 µg/kg
成分 ²				
ゼラノール	25 %	25 %	50 %	—
ゼアララノン	10	5	20	—
タレラノール	10	5	<10	—
極性	10	5	<10	—

¹ 加水分解処理後

² 性差なし

牛(p. 41)

肉用牛(雌雄各 9 頭、計 18 頭。平均体重:221 kg)を用いた³H-ゼラノール(30 mg)の埋込投与試験が実施された。牛は埋込み投与 2、5、15、30、45 及び 65 日後の各時点でそれぞれ雄 2 頭/雌 1 頭又は雄 1 頭/雌 2 頭をと殺した。対照には牛 2 頭を用いた。この試験における総残留物の測定結果を表 III にまとめた。

表 III. 牛における³H-ゼラノールの総残留物(µg/kg)

休薬期間 (日数)	組織				
	肝臓	腎臓	筋肉	脂肪 ¹	胆汁
2	2.5 ²	0.74	0.099	0.10	80
5	8.2	1.7	0.13	0.30	270
15	7.3	1.3	0.10	0.25	230
30	4.2	0.97	0.054	0.26	140
45	3.4	0.89	0.047	0.14	120
65	1.5	0.75	0.044	0.098	56
検出濃度	0.07	0.07	0.014	0.035	

¹ 腎周囲脂肪

² 各数値は牛 3 頭の平均値を示す

耳への埋込み後、組織残留物は 5～15 日後にピークに達し、埋め込み後の時間が経つにつれて徐々に減少した。埋込み 65 日後には、投与量の約 60 %が埋込み部位に残存していた。埋め込み部位から消失した 40 %のうち、12～18 %が尿中から、また 21～34 %が糞中からそれぞれ回収された。尿、糞、肝臓及び腎臓中の残留物は HPLC を用いて分析され、その結果を表 IV にまとめた。

表 IV. 排泄物／組織中の残留物の構成

	尿	糞 ²	肝臓 ³	腎臓
加水分解なし				
ゼラノール	—	25 %	12 %	
ゼアララノン	—	10～15 %	17 %	
タレラノール	—	25 %	12 %	
極性	98 %	—	52 %	
加水分解あり ¹				
ゼラノール	17 %		21.5～32.9 %	17.8 %
ゼアララノン	3.8 %		7.1～19.5 %	12.6 %
タレラノール	43.5 %		24.1～32.4 %	32.8 %
極性	4 %		4.1～20.3 %	34.0 %

¹ グルスキーゼを用いてインキュベート

² 放射能抽出率: 82 %

³ 放射能抽出率: >95 %

可食組織中の残留物濃度は、埋め込み後のいずれの時点においても極めて低かった。残留物濃度は肝臓で最も高かったが、10 µg/kg を超えることはなかった。筋肉中の残留物濃度は埋め込み後のいずれの時点においても 0.13 µg/kg を超えることはなかった (Tarr et al., 1984)。

代謝及び代謝の比較 (p. 43)

³H-ゼラノールの *in vivo* における生体内変換によって生成した組織、体液及び排泄物中の代謝物の同定及び定量が、牛における耳の皮下への埋め込み投与後並びにサル及びラットにおける経口投与後に実施された。³H-ゼラノールの *in vivo* における生体内変換によって生成した体液及び排泄物の代謝物の同定及び定量は、ラット、ウサギ、イヌ、サル及びヒトにおける経口投与後に実施された。

調べたほ乳類のいずれにおいても、ゼアララノン及びタレラノールが唯一第 I 相反応で生じた主要代謝物であり、調べたほ乳類のいずれもゼラノールをゼアララノン及びタレラノールへと代謝する。組織中及び排泄物中の

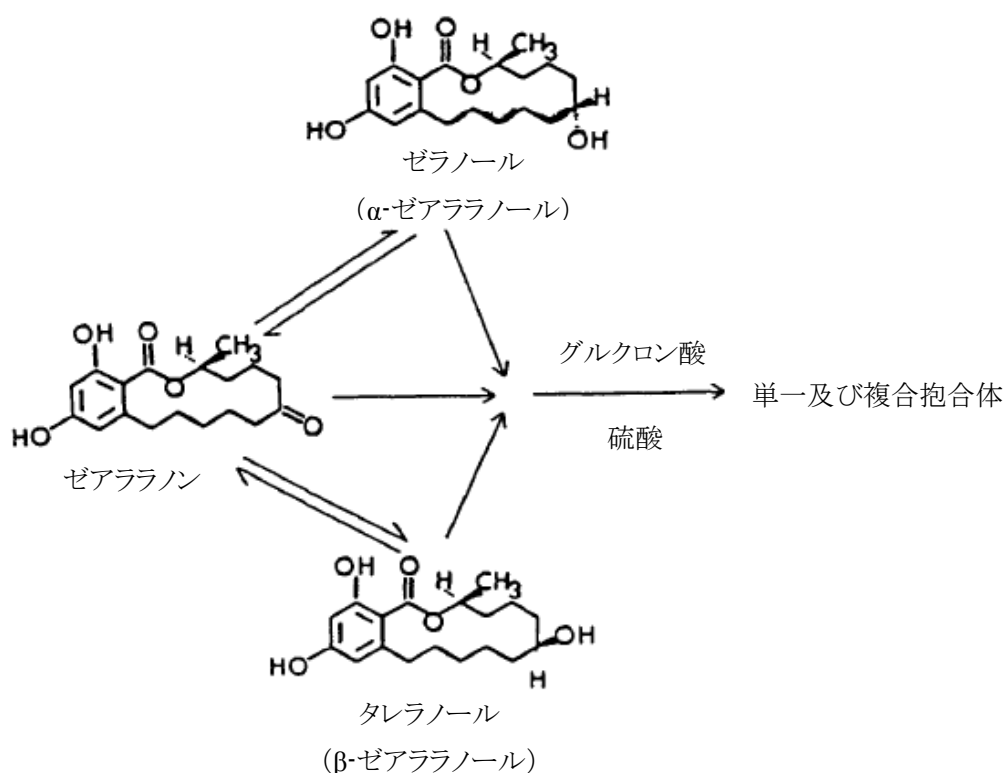
ゼラノール:ゼアララノン:タレラノールの比は種によって異なる。ゼラノール及びその代謝物は、いずれも遊離体及び抱合体(グルクロン酸及び硫酸抱合体、又はそのどちらか一方)として排泄される。

その他高い極性を示す未知の微量代謝物が、³H-ゼラノールを投与した牛、ラット及びサル尿、肝臓及び糞中に認められた。これらの化合物量は、グルクロニダーゼ及びスルファターゼの粗製標品を用いた長時間のインキュベートにより減少したが、消失することはなかった。これらの化合物はゼラノール及び代謝物の複合抱合体であると推察される。図2参照のこと。

ゼラノールを埋め込まれた牛の可食組織中には、ゼラノールを摂取した実験動物及びヒトが生成するものと同じ代謝物が含まれる。従って、実験動物を用いたゼラノールの安全性試験は、ゼラノール及びその代謝物に自動的に暴露されることになるので、これらのヒトに対する安全性評価に直接適用することができる(Tarr, et al., 1984) (Mulkey, 1985a) (Mulkey, 1985b) (Migdalof, et al., 1983)。

図2

ほ乳類におけるゼラノールの代謝経路(推定)



残留物試験(p. 44)

牛(雌4頭)を用いたラルグロ(36 mg)の埋め込み試験が実施された。動物は、埋め込み投与70日後にと殺し、採取した組織をモノクローナル抗体を用いた放射免疫測定法で分析した。この測定法の定量限界は、筋肉試料では0.278 µg/kg、脂肪試料では0.121 µg/kg、肝臓試料では0.373 µg/kg、腎臓試料では0.110 µg/kgであった。牛4頭における平均残留濃度は、筋肉中では0.127 µg/kg、脂肪中では0.184 µg/kg、肝臓中では0.299 µg/kg、腎臓中では0.157 µg/kgであった(Dixon & Russell, 1986)。

牛(去勢牛 27 頭)を用いたラルグロ(36 mg)の埋め込み試験が実施された。埋め込み投与 7、14、21、30 又は 50 日後に生検を行い、肝臓、筋肉及び脂肪の組織を採取した。動物は、埋め込み投与 70、90 又は 120 日後にと殺した。埋め込み投与 70 日後(少なくとも牛 17 頭がと殺されたとみられる時点)の組織中の残留物の値 (ng/kg)は、肝臓では 200 ± 147 、腎臓では 126 ± 94 、筋肉では 725 ± 886 、脂肪では 73 ± 40 であった。埋め込み投与 70 日後の胆汁中の残留物の値は 3.28 ± 1.74 mg/L であった (Dixon, et al., 1986)。

牛(食用子牛、13 週齢)を用いたゼラノール(36 mg)及び酢酸トレンボロン(140 mg)の埋め込み試験が実施された。化学発光免疫測定法を用いて尿中のゼラノール、ゼアララノン及びタレラノールを定量した。尿抽出物を、逆相 HPLC システムを用いて分画した。牛における尿中の主要代謝物はタレラノールであった (Jansen, et al., 1986)。

牛(6 群、一群 3 頭)を用いたラルグロ(36 mg/回)の 1 回から 6 回までの埋め込み試験が実施された。複数回の埋め込みについては、初回埋め込みを 60 日齢で行い、その後の埋め込みを 65 日間隔で実施した。いずれの動物も、最終埋め込み 65 日後にと殺した。放射性免疫測定法を用いて分析したところ、6 群のいずれの牛においても筋肉、腎臓及び脂肪中の残留物は検出されなかった (D.L. = 0.5 µg/kg)。埋め込みの回数が 3 回までの牛においては、肝臓中に残留物は検出されなかった (D.L. = 0.5 µg/kg)が、埋め込み回数が 4 回の牛では 0.73 µg/kg の残留物が、5 回の牛では 1.52 µg/kg の、また 6 回の牛では 1.10 µg/kg の残留物がそれぞれ平均で肝臓中に検出された (IMC、日付なし)。

牛(去勢牛 6 頭)を用いた酢酸トレンボロン(300 mg)及びゼラノール(36 mg)を埋め込む試験及び牛(去勢牛 5 頭)を用いたゼラノール(36 mg)の埋め込み試験が実施された。と殺時(埋め込み 67 日後)に採取した試料について、著者らが考案した抽出法並びに Dixon 及び Russell (1983) が考案した放射免疫測定法を用いて分析し、ゼラノールの残留物濃度を得た。残留物濃度は、肝臓(0.349 µg/kg)と腎臓(0.076 µg/kg)においてのみ、対照群と比べて有意に高かった (O'Keefe, 1984)。

牛(雌牛 3 頭、去勢していない若い雄牛 1 頭)を用いた酢酸トレンボロン(200 mg)及びゼラノール(36 mg)を埋め込む試験が実施された。薬物の埋め込みは、雌牛に対してはと殺 84 及び 56 日前に、また雄牛に対してはと殺 271 及び 183 日前に実施した。残留物濃度は、筋肉及び脂肪ではいずれも 0.2 µg/kg 未満、腎臓では 0.3 µg/kg 未満、肝臓では 0.5 µg/kg 未満であった (Gaspar, et al., 1985)。

不正使用条件(p. 44)

米国農務省及びテキサス A & M 大学は、共同で残留試験を実施した。牛(去勢牛)にゼラノール(24~168 mg)を埋め込み、5 日後にと殺した。別の群の牛にはゼラノール/ジメチルスルホキシド(DMSO)/生理食塩水溶液を 1 日 2 回、連続 3 日間静脈内投与した。これらの牛に静脈内投与されたゼラノールの合計は 552~4128 mg であった。静脈内投与した牛は、最終投与 3 日後にと殺して、組織を採取した。結果を表 V にまとめた (Cross and Byers, 1987)。

表 V. 埋め込み及び静脈内投与によるゼラノール及びその代謝物の残留物レベル

投与量	ゼラノール	筋肉 (µg/kg)		肝臓 (µg/kg)	
		ゼアララノン	タレラノール	ゼラノール	タレラノール
埋め込み 24 mg	.13	.05	<.02	1.0	—
" 48 mg	.21	.1	<.02	NA	—
" 72 mg	.16	.2	<.02	NA	—
" 120 mg	.16	.09	<.02	NA	—
" 168 mg	.13	.09	<.02	2.9	—
静脈内投与 552 mg	.14	—	.03	15.0	5.0
" 1,374 mg	.29	.19	.06	65.0	40.0
" 2,748 mg	.32	.23	.10	50.0	25.0
" 4,128 mg	.55	.09	.08	60.0	70.0

NA = 分析せず

残留分析の方法 (p 45)

全般的事項 (p. 45)

牛(去勢牛)における放射能標識体を用いた試験により、認可された条件下で使用する限り、肝臓中の総残留物は 10 µg/kg を、また筋肉中では 2 µg/kg を超えないことが示された。親化合物の残留物量はこれらの組織中ではいずれも総残留物の 25 % を超えないことから、ゼラノール濃度は肝臓中では 2.5 µg/kg を、また筋肉中では 0.5 µg/kg を超えないはずである。また、同時又は一定期間に複数回埋め込むなどの誤使用条件下では、親化合物であるゼラノールの残留物濃度の増加は 2 倍未満であることが示されている。これらの理由から、肝臓及び筋肉中における定量限界が ≤10 及び ≤2 µg/kg の手法についてのみ議論する。

RIA (p. 45)

ヘーズルトン・ラルテック社 (Hazleton Raltech, Inc.) は国際ミネラル & ケミカル社 (International Minerals and Chemical Corporation) のために、RIA による動物組織中のゼラノールの分析法を開発した。この方法では、分析対象とする組織を凍結乾燥し、有機溶媒(メタノール)を用いてゼラノールを抽出する。抽出したゼラノールについては、溶媒分配、カラムクロマトグラフィーと順次行い、最終的には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で精製する。定量は、ゼラノールに対して高度に特異的な抗体を用いて行われる。この方法では肝臓、筋肉、腎臓及び脂肪中のゼラノールを 0.5 µg/kg まで定量することができる。しかし、この方法は煩雑であり、分析結果を得るまでに 2 週間の作業を要する (IMC、日付不明)。

ポリクローナル又はモノクローナル抗体を用いた RIA がいくつか公表されている。これらの方法は、動物組織中のゼラノールを µg/kg より低い範囲をモニタリングするのに適しているが、放射能を用いる作業及び放射能標識体の標準品を必要とする。最近の方法では、化学発光及び酵素による検出を利用することにより、これらの問題が軽減されている (Jansen et al., 1986)。

キャピラリーGC(p. 45)

キャピラリーガスクロマトグラフィーを用いたゼラノールの定量法が開発されたが、この分析法ではまず、肝臓の酵素加水分解物をジエチルエーテルで抽出し、溶媒分配を行った後、ゼラノールのトリメチルシリルエーテル (TMS) 誘導体をキャピラリーガスクロマトグラフィーで定量する。ゼラノールの TMS 誘導体の確認には、キャピラリーガスクロマトグラフィー及びイオントラップ検出法を用いる。この分析法は 1~10 µg/kg の範囲で直線性が認められ、精度は±15 %であり、この方法を通した回収率は 90 %である(Boyll et al., 1987)。

GC/MS(p. 46)

この方法では、タレラノール、ゼアラレノン、α-ゼアラレノール、β-ゼアラレノール及びゼラノールの遊離体及びグルクロン酸抱合体を回収する。試料は三相溶媒により抽出後、四級アンモニウムの陽イオンによるイオン交換部分と結合させたポリエスチレンジビニルベンゼン共重合樹脂を充填した固相カートリッジ上で各抽出物を精製する。スクリーニングは電気化学的検出を用いた HPLC で行い、定量及び確認はオンカラム誘導体化及び内部標準を用いた GC/MS で行う。

この方法は次の点で優れている。すなわち、抽出による回収率が高いこと(100 ng/kg 濃度の試料で 60~80 %)、分析に要する試料量が少ないこと(5 g)及び市販されている機器を用いて分析を自動化することが可能なことである。この方法では必要とする機器が高価であることが問題であるが、この点は高い試料処理能力で部分的に解消できる。この方法は、現在も協同研究が行われており、定量限界は最終的には 0.5~1.0 µg/kg 程度になるものと見込まれる(USDA, 1986)。

評価(p. 46)

ゼラノールを牛の耳の根元へ埋め込む(36 mg/頭)と、埋め込み後のいずれの時点においても可食組織中には薬物関連した残留物が非常に低い濃度で生じる。残留物濃度は埋め込み後約 5 日でピークとなり、その後は埋め込み 65 日後まで徐々に減少する。おそらくこれは、時間とともに埋め込んだ薬物がカプセル化したためと考えられる。残留物の主成分は、ゼラノール、ゼアラレノン及びタレラノールである。これらの成分の総残留物に対する割合は、休薬期間の最終日である埋め込み 65 日後までのどの時点においてもほぼ一定である。標的組織は肝臓であり、胆汁には埋め込み後どの時点においても高濃度の残留物が含まれる。総残留物の濃度は、埋め込み後のいずれの時点においても肝臓では 10 µg/kg、腎臓では 2 µg/kg、筋肉では 0.2 µg/kg、脂肪では 0.3 µg/kg を超えることはない。

ゼラノールの毒性試験と結果の概要（評価書：JECFA 1987）

該当する試験なし

略称

略称	正式名称(英語)	日本語訳
D.L.	detection limit	検出限界
GC	gas chromatography	ガスクロマトグラフィー
HPLC	high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフ法
i.v.	intravenous	静脈内
RAL	resorcylic acid lactone	レゾルシル酸ラクトン
RIA	radioimmunoassay	放射免疫測定法
s.c.	subcutaneous	皮下
TMS	trimethylsilylether	トリメチルシリルエーテル

ゼラノール 評価書和訳と情報整理

JECFA 1987

ウェブサイト:<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v23je04.htm>

FAS 23-JECFA 32/123, 1987

ゼラノール評価書和訳と情報整理 JECFA (2011) 目次

説明 (原文 p.1)	29
生物学的データ (原文 p.1)	29
毒性試験 (原文 p.1)	29
発がん性に関する特殊試験 (原文 p.1)	29
マウス (原文 p.1)	29
ラット (原文 p.2)	31
エストロゲン様力価に関する特殊試験 (原文 p.4)	32
サル (原文 p.4)	32
変異原性に関する特殊試験 (原文 p.5)	34
繁殖に関する特殊試験 (原文 p.5)	34
ラット (原文 p.5)	34
催奇形性に関する特殊試験 (原文 p.7)	35
マウス (原文 p.7)	35
ラット (原文 p.7)	36
ウサギ (原文 p.8)	37
短期試験 (原文 p.8)	37
マウス (原文 p.8)	37
ラット (原文 p.9)	37
イヌ (原文 p.10)	39
長期試験 (原文 p.10)	39
ラット (原文 p.10)	40
イヌ (原文 p.11)	40
サル (原文 p.12)	41
コメント (原文 p.13)	43
評価 (原文 p.13)	43
ゼラノールの毒性試験と結果の概要 (評価書: JECFA 2011)	44
略称	47

原文 目次

原文ページ

ゼラノール	1
説明	1
生物学的データ	1
毒性試験	1
発がん性に関する特殊試験	1
エストロゲン様力価に関する特殊試験	4
非ホルモン様作用レベルに関する特殊試験	4
変異原性に関する特殊試験	5
繁殖に関する特殊試験	5
催奇形性に関する特殊試験	7
急性毒性	8
短期試験	8
長期試験	10
コメント	13
評価	13
ホルモン作用を起こさないレベル	13
一日摂取許容量の推定	13
引用文献	13
ZERANOL	1
EXPLANATION	1
BIOLOGICAL DATA	1
Toxicological studies	1
Special studies on carcinogenicity	1
Special study on estrogenic potency	4
Special studies on no-hormonal effect levels	4
Special studies on mutagenicity	5
Special studies on reproduction	5
Acute toxicity	8
Short-term studies	8
Long-term studies	10
COMMENTS	13
EVALUATION	13
Level causing no hormonal effect	13
Estimate of acceptable daily intake	13
REFERENCES	13

ゼラノール

説明 (原文 p.1)

ゼラノールはFAO/WHO合同食品添加物専門家委員会(Annex 1, 参照 59)の第26回会合で検討されたが、その段階では、ゼラノール使用に関連する残留濃度や、適正家畜飼育(good animal husbandry)に必要な資料及び分析法の詳細が利用できなかったため、評価することができなかった。第27回会合(Annex 1, 参照 62)では、適正家畜飼育行動規範(good animal husbandry practice)に従って、ヒト用食肉生産のための同化剤としてのゼラノールの使用を条件付で受け入れ、(1) ヒト以外の霊長類におけるホルモン活性に対する無作用量を確定するために現在進行中であると知られている試験、及び(2) 2種類のげっ歯類動物を用いた適切な発がん性試験の結果の提出を求めた。

本文には、最近提出されたデータと同様に、この委員会で以前検討されたデータも含まれている。

生物学的データ (原文 p.1)

毒性試験 (原文 p.1)

発がん性に関する特殊試験 (原文 p.1)

マウス (原文 p.1)

CDIマウス(雄雌各50匹、4群)に、ゼラノール0、0.15、1.5及び15 ppmの濃度の飼料を104週間混餌投与して飼育した。また、陽性対照には、2.5 ppmのエストラジオール-17βを含む飼料を与えた。血液学的検査を、試験開始後26、52及び8週目では一群雌雄各10匹について、また、104週目では、生存している全てのマウスについて実施した。更に、104週目には、生存している全てのマウスをと殺し、剖検した。全病理組織学的検査では、試験期間中に死亡した全てのマウスと同様、全ての対照群、ゼラノール最高用量群、及びエストラジオール17β群のマウスで実施した。部分的病理組織学的検査(副腎、腎臓、肝臓、肺、乳腺、子宮、膣、子宮頸部、前立腺、精囊腺、精巣、下垂体、皮膚及び直接みられる全ての塊状組織(masses))が、全ての他のマウスで実施された。

ゼラノール投与群のマウスの死亡率(mortality)は、対照群に比べ、若干高かった。しかし、エストラジオール17β投与群のマウスでは明確に増加し、特に雌で顕著であった。ゼラノール投与群の雄マウスは、試験の最初の52週間は対照群と比較して若干の体重減少を示したが、次の52週間では、その影響は明確ではなかった。対照的に、エストラジオール17β投与群の雄マウスは、この全試験期間を通じて、有意な体重減少を示した。この試験飼料投与群の雌マウスは、対照群と同程度の体重増加を示した。ゼラノール投与群の雌雄及びエストラジオール17β投与群の雄の摂餌量は対照群と同様であった。エストラジオール17β投与群の雌では、対照群と比較して摂餌量の増加(80週目から)が認められた。

試験期間を通じて、ゼラノール投与マウスの血液学的検査パラメーターに、微小な変化があった。エストラジオール17β投与群では、雄にヘモグロビン値及び赤血球数の減少並びに雌に異なる白血球パターンの変化がみられた。剖検時に、2、3の有意な変化が15 ppmゼラノール投与群で観察され、それらは雄マウスにおける下垂体の腫大及び精囊腺の拡張(dilation)であった。雌マウスでは、脱毛症(alopecia)の発生頻度の増加があ

った。これらの変化の発生頻度は、陽性対照群のマウスにおいて大きく増加した。

ゼラノールの最高用量群の病理組織学的検査では、雌雄に副腎の褐色変性(brown degeneration)並びに雄に下顎唾液腺の雌型への転換(conversion of the submaxillary salivary glands)、胸骨(sterum*)の小柱形成(trabeculation)及び精囊腺の拡張が示された。

*原文ではsterumであるが、sternumとして訳した

これらのエストロゲン様作用は、エストラジオール17β投与群のマウスへの作用と比較して、非常に穏やかであった。ゼラノール1.5 ppm投与群ではなく、0.15 ppm投与群では、黄体を含む卵巣の存在、及び、無二次卵胞(no secondary follicles)(雌)及び精囊膨張(dilatation)(雄)の発生頻度は、対照群と比較して有意に減少した。しかしながら、これらの作用は、真のホルモン様作用とは考えられなかった。何故なら、(1) 卵巣に対する作用に用量依存性がなく、(2) 精囊膨張は老齢動物において一般的によく見られるものであり、そしてゼラノール投与群の動物における低発生頻度は、おそらく対照群と比較してより長い平均生存期間によるものと思われるからである。他の有意な作用は、ゼラノール15 ppm投与群で観察された。この投与群は、頸管粘液(mucous cervical)や膣上皮(vaginal epithelium)の増加(ゼラノール15 ppm投与群: 対照群: 陽性対照群=20/46: 10/48: 0/47)及び雄における副腎の被膜下過形成(subcapsular hyperplasia)の増加(ゼラノール15 ppm投与群: 対照群=30/49: 16/50)を含んでいる。この試験で認められた唯一のゼラノールの腫瘍発生(tumourogenic*)作用は、最高用量群における雄の脳下垂体中にあった。この試験で認められた前葉における前葉腺腫(anterior lobe adenomas)と過形成+腫瘍の発生頻度を表1.にとりまとめる。

*原文ではtumourogenicであるが、tumourigenicとして訳した。

表1. 雄マウスにおける脳下垂体の過形成及び腫瘍(rumours*)の発生頻度

所見	陰性対照	ゼラノール(飼料中濃度 ppm)			陽性対照
		0.15	1.5	15	
前葉腺腫	1	0	0	8	28
前葉における過形成+腫瘍 (rumours*)	1	2	2	12	33

*原文はrumoursであるが、tumoursとして訳した。

これらの腫瘍は、マウスにおいて、まれに自然発生する。しかしながら、脳下垂体の新生物(neoplasia)は、マウスのある系統へのエストロゲン投与と関連しており(Gardner, 1941)、エストロゲン様ホルモン投与に起因するホルモン不安定性と関係していると考えられる(Gardner, 1941, 1948)。

エストラジオール17β投与群では、エストロゲン様作用は、ゼラノール投与群のマウスで観察された作用よりさらに顕著に現れていた。これらの作用には、副腎における褐色変性(brown degeneration)、胸骨における小柱形成(trabeculation)の増加、雄の下顎唾液腺の雌型への変換、精囊腺の萎縮、卵巣における二次卵胞及び黄体の不足(scarcity)、子宮の炎症(uterine inflammation)、子宮内膜症(endometriosis)及び硝子化(hyalinization)、子宮頸部腺炎(cervical adenosis)、膣上皮の角化(vaginal epithelial keratinization)並びに乳腺発達が含まれていた。

陽性対照群の腫瘍化(tumourigenic)作用には、雄における脳下垂体前葉の腫瘍(anteior lobe tumours)及び精巣の間質細胞腫瘍(testicular interstitial cell tumours)並びに雌における転移性腺癌

(metastasizing adenocarcinomas)を伴う乳腺癌(mammary gland carcinomas)が含まれていた。(Everett et al., 1987a)

ラット (原文 p.2)

SD系ラット(一群雄雌各50匹、4群)に、それぞれゼラノール0(陰性対照)、0.25、2.5及び25 ppmの濃度の飼料を104週間混餌投与して飼育した。他の2群(一群雄雌各25匹)は陽性対照群として飼養し、試験を通して2.5 ppmエストラジオール17βを投与するか、又は最初の8週間のみ25 ppmエストラジオール17βを混餌投与し、残りの試験期間は2.5 ppmに減少して投与した(25 ppm投与群では、毒性が発現した)。また、他の投与群(雌25匹)は、埋め込み投与陽性対照群とし、試験開始時に約15 mgのエストラジオール17βを個々のラットの皮下に埋め込んだ。

血液学的検査を、それぞれ26、52及び78週目では一群雄雌各10匹について、さらに、104週目では全ての生存ラットについて実施した。血液学検査、臨床化学分析及び尿分析(urinalyses*)を、一群雌雄各(試験可能な)15匹について、103週目に実施した。104週に全ての生存ラットをと殺し、剖検した。全病理組織学的検査は、対照群、ゼラノール最高用量群及びエストラジオール17β投与群の全ラットで行われた。部分的病理組織学検査(副腎、子宮頸部、卵巣、脳下垂体、前立腺、精嚢腺、精巣、皮膚、腎臓、肝臓、肺、乳腺及び塊状組織(masses))を、他の試験群の全てのラットで実施した。試験期間中に死亡したラットを剖検し、完全組織学的検査(complete histological examination)を行った。

*原文ではurinalysesであるが、urinalysisとして訳した。

ゼラノール最高用量群の雄ラットは、試験最初の52週間で陰性対照群と比べて体重増加量の僅かな減少を示したが、残りの試験期間では対照群と同様であった。0.25 ppm投与群の雄並びに0.25及び2.5 ppm投与群の雌において、体重の僅かな減少が見られた。最高用量群の雌では体重減少が観察された最初の90日間を除いて、対照群と同程度の体重増加量を示した。対照的に、エストラジオール17β投与群のラットは顕著な体重減少を示し、エストラジオール17β埋め込み投与群の雌で最大の体重減少を示した。陰性対照群の摂餌量は、ゼラノール投与群のものと同様であった。陽性対照群ラットでは多少の摂餌量の減少がみられた。

血液学的検査では、0.25 ppmゼラノール投与群の雌ラットにおいて、対照群に比べて赤血球パラメーター(ヘモグロビン(haemaglobin*) 値及び赤血球数)及び白血球数に増加が見られた。他の全てのゼラノール試験群では、陰性対照群と同様であった。陽性飼料対照群の雌ラットでは白血球数の上昇を示したが、一方、エストラジオール17β埋め込み投与群の雌ラットでは赤血球パラメーターの減少及び好中球数の増加がみられた。臨床化学又は検尿結果では、投与群間の有意な差はみられなかった。

*原文ではhaemaglobinであるが、haemoglobinとして訳した。

試験動物の生存は、陰性対照群とゼラノール投与群は同様であった。陽性飼料対照群では、生存率がゼラノール投与群より低かったが、ほとんどの死亡は試験開始後80週以降に生じた。エストラジオール17β埋め込み投与群では、死亡は20週目以降に起こり、試験44週目での生存は一切なかった。エストラジオール17β投与群では、対照群に比べて腫大化した下垂体のより高い発生頻度を示したが、ゼラノール投与群の動物における死亡の一般的な原因は示されなかった。

剖検時のゼラノール投与群ラットの臓器重量分析では、雄ラットと対照群の雄ラットとの間で有意差はみられなかった。ゼラノール最高用量群における雌の子宮重量では明瞭な増加がみられたが、この投与群で卵巣重量に大きなバラツキがみられたため統計的に有意差はなかった。エストラジオール17β混餌投与群の雄ラット

は、対照群と比較して腎臓重量の有意な減少がみられ、また、雌では、絶対卵巣重量の減少がみられた。

ゼラノール投与群の動物の組織学的検査では、化合物に起因する新生物(neoplasms)の増加は示されなかった。雌ラットにおける非新生物の所見には、ゼラノール最高用量群における子宮の腫大の増加、同様に2.5及び25 ppm投与群における頸部(cervix)の重層扁平上皮細胞(stratified squamous epithelial cells)の増加が含まれていた。2.5 ppm投与群において乳房過形成の増加が認められたが、年齢補正分析を実施すると、統計的に有意ではなかった。0.25 ppm投与群では、対照群に比べて腎尿細管上皮のヘモシデリン沈着症(kidney tubular epithelial haemosiderosis)がより頻繁に発生したが、化合物に起因する作用とは考えられなかった。

エストラジオール17β投与群の全ての雌は、卵巣、子宮(扁平上皮化生(squamous metaplasia)及び上皮異形成(epithelial dysplasia)を含む)、膣及び頸部並びに乳腺などで顕著なエストロゲン様を示した。この作用は、脾臓、胸骨、胃、腎臓及び肺でも報告された。エストラジオール17β投与群の雄では、肝臓、膵臓、乳腺、心臓、精巣、腎臓及び脾臓でこの作用が観察された。エストラジオール17β埋め込み投与群の動物の病理組織学的変化は、エストラジオール17β混餌投与群の動物の変化より重度であった。埋め込み投与群の動物では、対照群に比べて下垂体腺腫(pituitary adenomas)(タイプ3)の明確な増加がみられた。(Everett et al., 1987b)

エストロゲン様力価に関する特殊試験(原文 p.4)

性的未成熟ラットにおける子宮への作用(uterotropic)を調べるため、ゼラノール及びその代謝物のゼアラノン(zearalanone)(7-ケト酸化誘導体)及びエストラジオール17βを有するタレラノール(taleranol)((ゼラノールの7-β-ヒドロキシエピマー)のエストロゲン様力価を比較検討した。被験物質の経口投与では、ゼラノール、ゼアラノン及びタレラノールのエストロゲン様力価は、エストラジオール17βのそれぞれ1/150、1/400及び1/350であった。皮下投与によるゼラノールのエストロゲン様力価は、エストラジオール17βの力価の1/500であった。(Everett et al., 1987c)

非ホルモン様作用レベルに関する特殊試験(原文 p.4)

サル(原文 p.4)

雌カニクイザル(18頭)の両側卵巣が摘出された。11週目の安定期に入った後、動物は3群に分けられた。次に各群に0.2%カルボキシメチルセルロースの風味飲料水溶液で調合した0.05、0.5又は5 mg/kg体重/日相当のゼラノールを13週間経口投与した。対照群は設定しなかった。投与1ヶ月前及び試験期間の1及び3ヶ月目に所定の臨床化学、血液学及び尿検査が行われた。血清中のインスリン及び甲状腺刺激ホルモン(TSH)濃度は、投与前に一度、また、試験期間の1及び3ヶ月目に測定された。FSHは投与終了後4週間を通した試験中に基本的に毎週測定された。

臨床化学、血液学的及び尿検査の各パラメーターは、正常範囲内であった。インスリン又はTSHの血清濃度に関しては、化合物に起因する作用は観察されなかった。ゼラノールの初回投与後24時間のFSH値はいくらか変動を示したが、二相性反応は認められなかった。試験期間中に測定されたFSH値はバラツキを示し、一貫し

た減少は観察されなかった。

試験中のベースライン測定及び膣上皮細胞(vaginal epithelial cells)の成熟指数測定では、ゼラノール0.5及び5 mg/kg体重/日投与群の動物においてエストロゲン様作用が示された。この作用は、0.05 mg/kg体重/日投与群ではみられなかった。(Singh et al., 1984a; CIC, 1985)

成熟カニクイザル(一群雄6頭、3群)に、ゼラノール0.05、0.5又は5 mg/kg体重/日相当を13週間、毎日投与した。投与前の2回並びに投与後1及び3ヶ月目に、所定の臨床化学、血液学的及び尿検査が個々のサルで行われた。血清中のインスリン、FSH及びテストステロン濃度も測定された。投与終了時に精巢生検を実施し、顕微鏡検査が行われた。

試験期間中、体重増加量は正常であった。臨床化学、血液学的検査及び尿検査の各パラメーターは、正常範囲内にあった。血清中のインスリン、TSH及びFSH濃度には、化合物に起因する変化はみられなかった。テストステロン濃度は、個々の動物で大きな変動はあったが、化合物に起因する作用は認められなかった。精巢生検検査では、精祖細胞、一次及び二次精母細胞又は精子は影響を受けなかった。ライディッヒ細胞は正常であった(Singh et al., 1984b)。

正常な成獣カニクイザル(*cynomolgusa**) (一群雌6頭、5群)を用いた。3群には、0.05、0.5又は5 mg/kg体重/日相当のゼラノールを、毎日、3月経周期に経口投与した。1群には、媒体(0.2 %カルボキシメチルセルロース(carboxymethylcellulose**)の果実風味飲料水溶液)、またもう1群には、エストラジオール17βを0.01 mg/kg体重/日相当量を投与した。投与前、投与期間中及び休薬期間中に、血液学的、臨床化学及び尿検査を行った。インスリン、TSH、FSH、エストラジオール17β及びプロゲステロンの血清中濃度は、試験期間中(3月経周期毎)に測定された性皮着色(sex skin coloration)又は腫大(swelling)変化の測定のため、膣の角化(vaginal cornification)(成熟度指数)及び日常観察が毎日実施された。

*原文では*cynomolgusa*であるが、*cynomolgusa*として訳した。

**原文は*carboxymethylcellulose* であるが、*carboxymethylcellulose*として訳した。

体重に関して投与に起因する作用は観察されなかった。投与及び休薬周期の間の性皮の変化については、ゼラノール又はエストラジオール17β投与動物において化合物に起因する作用は示されなかった。臨床化学又は血液学的検査パラメーター、若しくは血清中のインスリン又はTSH濃度に関しては、投与に起因する有意な影響は認められなかった。いずれの試験群のFSH、エストラジオール又はプロゲステロンの血清濃度又は周期的挙動(cyclic behavior)には、化合物に起因する影響はみられなかった。本試験の投与期間における膣上皮細胞型においても有意な変化は全くみられなかった。(Singh et al., 1984c; Singh & Griffin, 1984)

成熟アカゲザル(一群雌8頭、3群)に、前投与制御周期の後、0.5、5又は50 mg/kg体重/日相当のゼラノールを3月経周期間又は111日間、毎日投与した。対照群(6頭)には、ゼラノールの懸濁液に用いた媒体(オレンジジュース)を与えた。最終前投与制御周期中は毎日、また、最初の2投与サイクル期間中では隔日、個々の動物から血液サンプルを採取した。エストラジオール、プロゲステロン、LH及びFSHの血清濃度は、放射免疫法により測定された。

平均的な月経周期において、0.5及び5 mg/kg体重/日投与群では化合物に起因する有意な影響は示されなかった。対照的に、高用量群の月経周期は、投与後最初の60日間は完全に抑制され、また、第3周期中では明

確に抑制された。排卵率は、対照群、低用量群、及び中用量群で同様であったが、高用量群では、明確に抑制された。対照群及び中用量群におけるエストラジオール分泌の定量的パターンに、差異は観察されなかった。しかしながら、そのパターンは高用量群で変化すると共に、エストラジオール濃度は有意に減少した。対照群、低用量及び中用量群のLH及びFSH濃度並びに分泌パターンは、前投与周期で観察されたものと同様であったが、高用量群では高く、また、その分泌パターンも他の投与群と異なっていた。(Hess, 1986)

変異原性に関する特殊試験 (原文 p.5)

ゼラノール並びにその代謝物のゼアララノン (zearalanone) 及びタレラノール (taleranol) についての利用可能な変異原性データを表2、3及び4にまとめた。

繁殖に関する特殊試験 (原文 p.5)

ラット (原文 p.5)

SD系ラット(一群雄雌各10匹、試験開始時7週齢、体重約200 g)に、ゼラノール0、0.25、1.77、12.5又は25 ppmの濃度で混餌投与した。この投与は交配前4週目に開始し、試験終了まで継続した。児動物(F₁世代)は、離乳後3~4週間この試験飼料により飼育された。F₀雌雄は、それぞれの機能が成熟した後に殺され、剖検された。F₁世代の動物は、約6週齢でと殺され、剖検された。

F₀の雄は、全ての投与群で、対照群に比べて体重の減少(高用量群では19%)を示した。ゼラノール投与群の雄ラットの摂餌量も減少した。ゼラノール投与F₀の雌は、対照群に比べて摂餌量で若干の減少のみを見せたが、12.5及び25 ppm投与群では、有意な体重の減少(高用量群では21%)を示した。受胎率、妊娠指数、出生率、生存能力指数(0-4日)及び哺育率(4-21日)を用いて、受胎能及び一般的な生殖指標が評価された。有意な用量に相関した影響はなかった。高用量群の雌雄児動物では、哺乳期間中の体重増加量が有意に減少し、また、この傾向は離乳期においても持続した。体重増加量の減少は、12.5 ppm投与群でも観察されたが、低用量群では観察されなかった。

剖検時のF₀世代動物の絶対及び相対臓器重量の測定では、すべての投与群において、肝重量の減少を示した。ゼラノール投与群の全ての雄では、精嚢腺に絶対及び相対重量の減少が、また雌では卵巣の絶対及び相対重量の減少がみられた。両世代の動物の肉眼的剖検所見は、化合物に起因する影響を何も示さなかった。(Everett & Perry, 1984)

試験システム	試験対象	濃度	結果	参照
エームス試験 ¹	<u>S. typhimurium</u> TA98, TA100, TA1538	1-500 µg/プレート	陰性	Bartholomew & Ryan, 1980
エームス試験 ²	<u>S. typhimurium</u> TA100	1 - 10,000 µg/プレート	陰性	Jagannath, 1982a
前進突然変異試験 ¹	マウスリンフォーマL5178Y TK+/-3.7.2C細胞	25 - 600 µg/mL	陰性	Cifone, 1982

骨髓細胞発生試験	CD-1マウス	0.5、1.5、5 g/kg	陰性	Cimino, 1982
肝細胞一次培養 DNA修復試験	F344ラット(成獣雄)	$1.3 \times 10^{-3} \sim 1.3 \times 10^{-5}$ mg/mL	陰性	Williams, 1983
DNA結合試験	ラット肝細胞一次細胞培養	利用可能ではない	陰性	Williams, 1984
Rec-試験	<u>B. subtilis</u> H17、M45	利用可能ではない	陽性	Scheutwinkel et al., 1986
SOS-クロモ試験 ²	<u>E. coli</u> PQ37	利用可能ではない	陰性	Scheutwinkel et al., 1986
V79/SCE試験 ²	チャイニーズハムスター V79細胞	利用可能ではない	陰性	Scheutwinkel et al., 1986

1 ラット肝 S-9 分画の存在下

2 ラット肝 S-9 分画の存在下及び非存在下の両方で実施

表 3. ゼアララノン(zearalanone)¹に関する変異原性試験の結果

試験システム	試験対象	濃度	結果	参照
エームス試験 ²	S. typhimurium TA98、 TA100、TA1535、 TA1537、TA1538	50、500、1,000 µg/プ レート	陰性	Ingerowski et al., 1981
エームス試験 ³	S. typhimurium TA98、 TA100、TA1535、 TA1537、TA1538	1.0 – 10,000 µg/プレ ート	陰性	Jagannath, 1982b
前進突然変異試験	マウスリンフォーマ L5178Y TK +/-細胞	3.13 – 300 µg/mL	陰性	Cifone, 1983
骨髓細胞発生試験	CD-1 マウス	0.5、1.67、5 g/kg	陰性	Cimino, 1983
肝細胞一次培養 DNA 修復試験	F344 ラット(成獣雄)	$5 \times 10^{-10} \sim 5 \times 10^{-4}$ mg/mL	陰性	Williams, 1985a

1 ゼラノールの 7-ケト酸化誘導体

2 ラット肝 S-9 画分の存在下

3 ラット肝 S-9 画分の存在下及び非存在下の両方で実施

催奇形性に関する特殊試験(原文 p.7)

マウス(原文 p.7)

妊娠CDI-1マウスの妊娠の6-10日に、10~10,000 µg/kg体重/日の範囲の対数用量のゼラノールを皮下投与した。マウスの半数は正常出産させ、また、残りの半数は帝王切開によって出産した。1000 µg/kg体重/日以上投与群では、同腹児数が対照群の81%から投与群の35%まで減少した。児動物の平均体重の減少及び死産胎児数の増加が観察された。限定的肉眼観察では、骨中の髄質小柱(medullary trabeculae)の増加が示

された。(Davies et al., 1977)

ラット(原文 p.7)

妊娠ラット(一群雌4匹)に、ゼラノール4 mgを妊娠1、2、3、4及び5日に単回で、1 mg/日を妊娠1-4日の4日間又は妊娠6日に8 mgを単回で経口投与した。これらのラットは、妊娠9日にと殺された。ゼラノールは、投与4日まで着床を阻害したように見えた。着床が起こった試験では、胎児は9日まで吸収され始めていた。(IMC, 1980a)

表 4. タレラノール(taleranol¹)に関する変異原性試験の結果

試験システム	試験対象	濃度	結果	参照
エームス試験 ²	S. typhimurium TA98、 TA100、TA 1548	1-500 µg/プレート	陰性	Bartholomew & Ryan, 1980
エームス試験 ³	S. typhimurium TA100	1-5,000 µg/プレート	陰性	Jagannath, 1983
前進突然変異試験 ²	マウスリンフォーマ L5178Y TK+/-3.7.2C 細胞	20 - 160 µg/mL	境界	Cifone, 1985
骨髄細胞発生試験	ICR マウス	8.5 - 85 mg/mL	陰性	Ivett, 1985a
肝細胞一次培養 DNA 修復試験	F344 ラット(成獣雄)	2 × 10 ⁻⁵ ~ 2 × 10 ⁻¹ mg/mL	陰性	Williams, 1985b
染色体異常頻度試験 ³	チャイニーズハムスター卵 単細胞	12.5 - 250 µg/mL	陽性(- act.) 陰性(+ act.)	Ivett, 1985b
優性致死試験	H/a(ICR)BR マウス	0.5, 1.5, 5.0 g/kg 体 重/日	陰性	Brusick & Myhr, 1986

1 ゼラノールの 7β-ヒドロキシエピマー

2 ラット肝 S-9 画分の存在下

3 ラット肝 S-9 画分の存在下及び非存在下の両方で実施

ラットを用いた3世代試験が実施された。雄は体重69-113 g、雌は体重65-109 gのラットであり、3回連続した同腹児からなる(each comprising three consecutive litters)世代に連続して、各々、0、0.01、0.10又は0.20 ppmのゼラノールを混餌投与した。各世代の動物はゼラノールを交配前70日間混餌投与され、母動物の出産から哺乳期間を通して離乳するまではその飼料から離し、更に、この試験の開始時と同じ濃度のものに戻された。Fb由来の児動物は、次世代の繁殖に使用された。Fc由来の児動物は、催奇形性試験に使用された。3連続世代の産児データにおいて有意と見られた幾つかの差異があったが、傾向的な、又は用量反応的な関係はなかった。ゼラノール投与に起因すると考えられる化合物の副作用は、観察されなかった(Wazeter & Goldenthal, 1976)。

雄ラットに、未投与の雌と交配させる前60日間、ゼラノール0.312、1.25又は5 mg/kg体重/日の経口投与を行ったところ、交尾(cohabitation)上での受精遅延(delayed insemination)及び雌における受胎開始遅延

(delayed initiation of conception) がもたらされた (Williams, 1982)。

雌ラットに、未投与の雄と交配させる前60日間、ゼラノール0.312、1.25又は5 mg/kg体重/日の経口投与を行ったところ、産児数の減少、死産の増加及び新生児生存率の減少が起こった (Williams, 1982)。

妊娠雌ラットの妊娠6-15日に、ゼラノール2又は6 mg/kg体重/日を経口投与した。妊娠20日での開腹時点で、生存胎児数の減少及び吸収 (resorption) 数の増加が認められた (Williams, 1982)。

ウサギ (原文 p.8)

妊娠6-18日に、ゼラノール1又は5 mg/kg 体重/日を経口投与した。胎児は、28日に開腹術によって取り出された。異常は、認められなかった (Williams, 1982)。

急性毒性 (原文 p.8)

動物種	性	投与経路	LD ₅₀ (g/kg 体重)	参照
マウス	?	経口	> 40	IMC, 1980b
	雌	腹腔内	4.4	IMC, 1980b
ラット	?	経口	> 40	IMC, 1980b
	雌	腹腔内	9-11	IMC, 1980b

ラット(一群雄雌各25匹)に、ゼラノール0又は200 mg/kg体重を強制経口投与し、その投与24時間後にと殺した。全ての投与ラットで血糖値の減少、雄における総コレステロールの上昇及び雌における減少がみられた。雄の精巣上体重量の減少及び雌の子宮重量の増加がみとめられた。(Albany Medical Collage, 1980)

短期試験 (原文 p.8)

マウス (原文 p.8)

CD-1マウス(雄雌均等に分けた一群20匹)に、ゼラノール0、1、5、25、50又は100 ppmの濃度で8週間混餌投与した。試験期間中、死亡又は臨床的影響は観察されなかった。投与群と対照群の間に、体重、摂餌量又は飲水量における有意な差はみられなかった。剖検では、化合物に起因する肉眼的変化は観察されなかった。雌雄の肝臓又は雄の精巣の絶対又は相対重量も、試験群と対照群の間に化合物に起因する差異は観察されなかった。しかしながら、ゼラノールの25、50及び100 ppm投与群の雌において卵巣の絶対及び相対重量の変化(減少)、100 ppm投与群の雌において子宮の絶対及び相対重量の変化(増加)が認められた。(Perry & Everett, 1984)

ラット (原文 p.9)

SDラット(雄雌均等に分けた一群40匹)に、ゼラノール0、0.02、0.18、1.2又は8.8 mg/kg体重/日 相当を13

週間混餌投与して飼育した。体重及び摂餌量は、毎週測定した。血液学的、臨床化学及び尿検査が、5及び13週目に行った。眼科的検査は10週目に実施された。試験終了時に、肉眼観察及び臓器重量の測定が全動物で行われ、高用量群及び対照群の雄雌各10匹の主要器官及び組織についての病理組織学的検査を実施した。

試験期間中に6匹が死亡したが、化合物に起因していなかった。摂餌量では、対照群と比較して投与群における唯一の僅かな減少が認められた。しかしながら、高用量群、特に、その雄において、対照群に比べて体重増加量における顕著な減少がみられた。血液学、臨床化学又は尿検査のパラメーターについては、化合物に起因する変化は、認められなかった。臓器重量測定では、雌雄いずれにおいても、肝臓の相対重量の僅かな増加及び高用量群ラットの腎臓の微かな増加が示された。組織学的検査では、細胞内脂肪蓄積と同様、高用量群の雌雄いずれにおいても肝細胞の空胞化(vacuolation)の発生頻度増加が示された。高用量群の雄の腎臓では、石灰化円柱(calcified casts)の有意な増加が示された。これらの影響は、1.2 mg/kg体重/日投与群で、唯一、限界付近(marginal)にあった。ゼラノール0.18 mg/kg体重/日投与群では、化合物に起因する影響は観察されなかった(Everett et al., 1983)。

正常な幼若ラット(雌20匹)に、ゼラノール12 mgのペレットを皮下に埋め込み投与し、150日後にと殺した。対照群は5匹とした。成長、卵巣嚢胞(cysts)、乳腺及び体の他の部位の減少がみられ、卵巣及び子宮重量の減少、黄体の欠如(absence of corpora lutea)並びに子宮粘膜(uterine mucosa)の顕著な扁平上皮化生(squamous metaplasia)が認められた(Huis in't & Kroes, 1974)。

ラット(一群雄雌各30-35匹)に、ゼラノール0又は200 mg/kg体重/日を4日間強制経口投与した。総コレステロール及び血糖値の低下、雄の精巣、精嚢腺及び精巣上体(epididmes*)の重量の減少、雄の副腎重量の増加及び雌の子宮と副腎重量の増加がみられた。顕微鏡観察では、卵巣が黄体隆起(prominent corpora lutea)を示しており、また、精細管は精祖細胞を含んではいたが、成獣の又は成熟した精子はみられなかった。リンパ組織は多くの大型多核細胞(large multinucleated cells)を含んでいた(Albany Medical College, 1980)

*原文ではepididmesであるが、epididymisとして訳した。

アルビノManor Farmラット(一群雄雌各5匹)に、ゼラノール25、50、100、200又は400 mg/kg体重/日を毎週5日、6週間強制経口投与した。対照群は設定しなかった。試験の第4週目に、100 mg投与群は800 mg投与へ、また、200 mg投与群は1,600 mg投与へと増量した。全ての投与群において変化がいくつか認められたが、これには外性器(external genitalia)(雄の精巣サイズの縮小及び雌の外陰部の肥大)の変化が含まれていた。被刺激性(irritability)、弛緩(flaccidity)、脱毛症(alopecia)、過剰な排尿(excessive micturition)及び成長率の減少も示された。顕微鏡検査後、精子形成停止(spermatogenic arrest)、前立腺、精嚢腺及び凝固腺(coagulating glands)の萎縮(atrophy)、グラーフ卵胞の欠損(absence of graafian follicles)、子宮内膜の過形成(endometrial hyperplasia)、精嚢腺の扁平上皮化生及び腎臓の石灰化円柱(calcified casts)が示された(IMC, 1980c)。

SDラット(雌雄3群、数は不明)に、ゼラノール0、2.25、9.0 mg/kg体重/日を14日間皮下投与した。投与群では成長率が減少した。雄の生殖腺、前立腺及び胸腺並びに雌の生殖腺及び胸腺の相対重量が減少した。更

に、雄の精囊腺及び副腎並びに雌の子宮及び副腎の相対重量が増加した。黄体数の有意な減少も認められた(IMC, 1980d)。

ラットの雄雌の群に、ゼラノール0.25、1.25又は6.25 mg/kg体重/日を13週間混餌投与した。上位2つの高用量群において軽度の成長抑制が観察された(Williams, 1982)。

ラットの雄雌の群に、ゼラノール0.1、0.8又は6.4 mg/kg体重/日を26週間投与した。最高用量群において、摂餌量及び体重増加量の減少、雄にヘモグロビン値の低下傾向並びに雌に肝細胞サイズの不規則性を含む軽度な肝変化が認められた(Williams, 1982)。

イヌ(原文 p.10)

イヌ(一群雄雌各1匹)に、ゼラノール25、50、100、200又は400 mg/kg体重/日を、週5日で6週間カプセル経口投与した。投与4週目から、100 mg用量は800 mgに、また、200 mg用量は1,600 mgに増量した。対照群は設定しなかった。投与第2週の初めに、全ての雌において外陰部の腫大(swollen vulvae)が示された。全ての雄において精巣サイズの減少がみられた。100 mg以上投与群では、雌雄共に、若干ではあるが白血球の顕著な増加及びリンパ球の相対的減少が示された。200/1,600 mg投与群では、ヘモグロビン及びヘマクリット値の僅かな減少並びに赤血球沈降率(erythrocyte sedimentation)の増加があった。顕微鏡検査では、乳管増殖(mammary ductal proliferation)が雌雄共に見られ、雌において膺上皮の角化を伴う外陰部の腫大(vulval swelling)及び卵巣萎縮が認められた。また、雄において、精上皮(seminiferous epithelium)及び前立腺の萎縮並びに尿道前立腺部(prostatic urethra)の過形成(hyperplasia)又は扁平上皮化生(squamous metaplasia)が認められた。400 mg以上投与群では、骨髄での細胞実質(cellularity)及び骨髓球(myeloid)/赤血球比の増加がみられた(Williams, 1982)。

イヌ(雄雌)に、ゼラノール0.25、1.25又は6.25 mg/kg体重/日を14週間カプセル経口投与した。31日目の投与以降、0.25 mg用量は12.5 mgへと増量した。雄の生殖器サイズの縮小及び子宮重量の増加傾向がみられた。顕微鏡検査では、精子形成停止がみられ、また、12.5 mg投与群の雄1頭において前立腺上皮萎縮がみられた(Williams, 1982)。

イヌ(雄雌)に、ゼラノール10、100又は1,000 ppmを29週間混餌投与した。1,000 ppm投与群における変化には、雄1匹における体重の減少及びの雄3匹における急速な沈降速度(rapid sedimentation rates)、ヘモグロビンの減少、白血球の増加及びリンパ球の減少が含まれていた。顕微鏡検査では、1,000 ppm投与群において、精巣の萎縮、前立腺の扁平上皮化生(squamous metaplasia)、子宮内膜肥厚及び卵巣萎縮を含む変化が認められた。骨髄の細胞過形成(hypercellularity*)及び膀胱の軽度の扁平上皮化生も認められた(Williams, 1982)。

* 原文ではhypercellularityであるが、hypercellularityとして訳した。

長期試験 (原文 p.10)

ラット (原文 p.10)

ラット(一群雄雌25-35匹)に、ゼラノール0、0.1、0.8又は6.4 mg/kg体重/日を1年間混餌投与した。試験の36週目から、0.1 mg用量は20 mg用量に増量した。全投与群で体重増加の低下がみられた。0.1/20 mg投与群のラットは、ヘモグロビンの減少、血小板の増加、プロトロンビン時間の増加、前立腺、卵巣及び精嚢腺の絶対及び相対重量の減少並びに子宮及び脳下垂体の絶対及び相対的重量の増加を示した。肝細胞グリコーゲン枯渇(hepatic cell glycogen depletion)及び肝細胞サイズの不規則性が雄ラットにのみ観察された。この動物群でネフロンの変性変化(nephron degenerative changes)、卵巣、精嚢腺及び前立腺の軽度～中程度の萎縮、成熟精子数の若干の減少、そして骨髄の細胞実質不全(hypocellularity)の症例も認められた。本試験中に死亡した動物の肝臓に著しい退行性変化(degenerative changes)がみられた(Williams, 1982)。

チャールスリバーCDラット(一群雄雌各25匹)に、ゼラノール0、0.1、0.8又は6.4 mg/kg体重/日を104-105週間混餌投与した。試験の28週目から、0.1 mg用量は20 mg用量に増量した。6.4及び0.1/20 mg投与群の全投与動物で体重増加が抑制された。上位2つの高用量群で、極めて多くの頻度で脱毛症(alopecia)が見られ、また、6.4 mg投与群の1匹及び0.1/20 mg投与群の4匹のラットには、試験の最終四半期中に白内障(cataracts)が出現した。0.1/20 mg投与群ではヘモグロビン及びヘマクリット値が減少し、これは雄よりも雌において重篤(severe)であった。0.1/20 mg投与群の動物は、精嚢腺、精巣、卵巣及び前立腺の絶対重量が低かった。肉眼的所見では、これらの事象は老齢動物で一般的に見られるものであった。顕微鏡検査では、ゼラノールを投与した全てのラットで、肝臓、卵巣、子宮、精嚢腺、前立腺及びの精嚢に変化が見られた。肝臓における変化は、肝細胞の枯渇化(hepatic cell depletion)、肝細胞サイズの不規則性、実質細胞の空胞化(parenchymal cell vacuolation)、慢性炎症細胞の浸潤(chronic inflammatory cell infiltrates)及び結節性過形成(nodular hyperplasia)に時々みられる症例を含んでいた。卵巣、前立腺、精嚢腺及び精巣では、軽度～中程度(slight to moderate)の萎縮が認められた。子宮に見られた変化は、子宮内膜炎(endometritis)、扁平上皮化生及び子宮内膜の嚢胞性増殖(cystic hyperplasia)を含んでいた(Woodard, 1968)。

イヌ(原文 p.11)

イヌ(雄雌)に、ゼラノール0.025、2.5又は25 mg/kg体重/日を1年間混餌投与した。中用量群において、軽度の精巣萎縮、中等度の前立腺萎縮及び扁平上皮化生が認められた。高用量群で見られた変化には、血小板の増加、リンパ球の減少、速い沈降速度、白血球数の上昇及び膀胱上皮細胞の顕著な角化(cornification)が含まれていた。最終的にと殺した際、25mg投与群において、投与に起因した変化が見られ、それには、生殖腺の明確な萎縮、前立腺及び子宮における扁平上皮化生及び炎症性変化(inflammatory changes)、膀胱粘膜組織(urinary bladder epithelium)の扁平上皮化生、骨髄の脊髄性要素(myeloid elements)における明白な増加及び子宮内膜の過形成が含まれていた(Williams, 1982)。

ビーグル犬(一群雄雌各4匹)に、ゼラノール0、1、100又は1,000 ppmを104週間混餌投与した。全投与群の雄イヌの体重は、対照群の体重に比べて若干高かった。観察された変化のほとんどは、最高用量群で認められた。血液学的変化には、速い沈降速度、高い白血球数及びリンパ球の減少が含まれた。最高用量群において、雄に前立腺及び下垂体の相対重量の増加並びに生殖腺の相対重量の減少、雌に子宮の相対重量の増加並びに雌雄に肝臓、腎臓、副腎及び甲状腺の相対重量の増加が見られた。肉眼所見での変化には、乳腺腫

大、精巣の小型化、包皮の浮腫(edematous prepuces)並びに外陰部、前立腺及び子宮の腫大化が含まれていた。顕微鏡的所見では、生殖腺、特に、卵巣(嚢胞状の減縮)の明確な萎縮、子宮及び前立腺における扁平上皮化生及び炎症性変化、並びに膀胱の慢性炎症性変化(chronic inflammatory changes)が観察された。100 ppm投与群の雄2匹及び雌1匹には、ある程度多様化した骨髓球系過形成(myeloid hyperplasia)がみられ、また、1匹の雄は、明らかな骨髓萎縮を示した(Woodard, 1968)。

ビーグル犬(雌16匹)に、ゼラノール0、15又は38 mg/kg体重/日をカプセル経口投与したが、これは循環法(cyclic manner)(21日間連続投与し、その後7日間は無投与)によって、7年間(91サイクル)行われた。試験開始3年目までに、高用量群及び低用量群で、各々2匹のイヌが死亡し、また、この試験の4年目に、低用量群の3匹が死亡又は瀕死状態で切迫と殺された。これらのイヌでは、中毒症の臨床症状及び化膿性子宮炎(pyometritis)と関連する肉眼的病変が認められた。化膿性子宮炎による更なる死亡を防ぐために、生存していた全てのイヌは、試験の3~3.5年目に、子宮を摘出された。子宮摘出の前には、投与動物において食欲不振(anorexia)及び嗜眠(lethargy)の発生頻度増加が認められた。15 mg投与群の平均体重は、対照群に比べてやや低かった。高用量群では、対照群に比べて有意に低かった。血液学的変化では、4年目の中間と殺時点で、低用量群の副腎の絶対及び相対重量について軽度だが、一定した減少が含まれていた。試験終了時と殺時点では、2つのゼラノール投与群の動物の卵巣の平均及び相対的重量に有意な増加が示された。ゼラノールは相対的に強い子宮走性作用(uterotropic effect)があり、膣、頸部及び外陰部の粘膜の増殖及び角化、嚢胞性子宮内膜過形成(cystic endometrial hyperplasia)、内性子宮内膜症(endometriosis interna)及び化膿性子宮炎(pyometritis)の著しい増加を引き起こした(Hogan, 1981a)。

サル (原文 p.12)

性的成熟アカゲザル(一群雌16頭)に、循環法(21日間の連続投与と7日間の休薬期間)で10年間(131サイクル)、ゼラノール0、15又は75 mg/kg体重/日を強制経口投与した。対照群にはエタノール及びメチルセルロース混合物の媒体を投与した。1年目(2頭)、2及び4年目(各4頭)に中間と殺を実施した。

試験投与と関係しない原因で、最初の9ヶ月間に7頭が死亡したことから、グループあたりの動物数を維持するために、その7頭は置き換えられた。眼科的变化には、網膜の黄斑及び黄斑周辺部位(perimacular regions)における両側性脱色素焦点(bilateral hypopigmented foci)、黄斑の粒状出現(grainy appearance)及び細胞一部脱落(diminution)又は黄斑反射欠落(macular reflex loss)が含まれていた。触知可能な乳房結節(palpable mammary nodules)及び/又は腋窩リンパ節(axillary lymph nodes)の腫大は、何頭かの動物で散発的に見られた。高用量群では、対照群及び低用量群に比べて触知可能な子宮腫瘤(palpable uterine masses)が明確に高い発生頻度で観察された。無月経の長期化は高用量群で見られたが、これは、試験後年の長期膣出血(prolonged periods of vaginal bleeding)を引き起こすことに繋がった。投与群のサルは、試験期間を通じて対照群より体重増加量が低かった。試験終了時における15 mg投与群の雌の平均体重は、対照群に比べて15%低く、また、75 mg投与群では、25%低かった。

本試験の最初の1.5年間、投与群では対照群に比べて平均ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値及び赤血球値の一過性の減少がみられた。測定した凝固時間の散発的増加(sporadic increases)が、全試験を通じて認められた。その他の血液学的変化は、認められなかった。SGPT活性の散発的な増加が15 mg投与群でみられ

たが、75 mg投与群では安定的により高いSGPT活性が観察された。類似のパターンは、血清トリグリセリド及びコレステロール濃度にもみられた。

高用量群の動物では、対照群と比べて肝臓及び子宮の平均絶対及び相対重量が安定的に高く、また、卵巣の平均絶対及び相対重量は安定的に低かった。同様の観察は、ゼラノール15 mg投与群でもみられたが、その度合は低かった。試験終了時のと殺では、高用量群の動物の下垂体の平均相対重量並びに副腎の平均絶対及び相対重量が、対照群のそれらに比べてより高かった。1及び2年目の中間と殺時点では、投与に関連した肉眼的変化は認められなかった。A年度の時点(At A years)*で、子宮内膜の増殖の発生頻度及びその度合に投与に起因する増加がみられた。10年目の時点での投与に起因する変化には、子宮の腫大、子宮内膜及び子宮筋層の肥厚、卵管の肥大及び外性子宮内膜症(endometriosis externa)が含まれていた。

*誤記と思われるが原文通りとした。

本試験の1年目では、投与に関連する顕微鏡的变化は認められなかった。2年目では、1つの良性腺腫(benign adenoma)が1頭の動物で認められ、また、ゼラノールの75 mg投与群に乳腺腺房組織(mammary acinar tissue)及び管発達(duct development)の相対的な増加が認められた。4年目では、高用量群における投与に起因する変化として、時折の濾胞性拡張腺(cystically dilated glands)を伴った子宮内膜の増殖(endometrial-hyperplasia) (4頭全て)、成熟卵胞及び黄体の欠如、子宮頸管腺(cervical glands)の基底部(basilar portions)の扁平上皮化生を伴う頸部上皮の表在性萎縮(superficial atrophy)並びに小葉発達(lobular development)増加及び軽度な管上皮増殖(ductular epithelial proliferation)が含まれていた。10年目の高用量群のほとんどの動物で認められた投与に起因した変化には、腔における上皮下結合組織(subepithelial connective tissue)の硝子化(hyalization*)、子宮頸管腺基底部の扁平上皮化生、卵巣の萎縮及び黄体の欠如、並びに乳腺における明らかな乳管及び腺房(acinar)の過形成が含まれた。75 mg投与群の全動物並びに低用量群の3頭で、嚢胞性子宮内膜増殖症、子宮筋層肥大及び外性子宮内膜症が認められた。対照群、低用量群及び高用量群の子宮/頸部(筋腫(fibroids))の平滑筋腫(leiomyomas)は、それぞれ、1/12、2/7及び2/14であった(Hogan, 1981b)

*原文ではhyalinationであるが、hyalinizationとして訳した

コメント（原文 p.13）

この委員会で利用可能な毒性データは、変異原性、生殖及び催奇形性のデータと同様、要求された試験結果が含まれていた。

マウス、ラット、イヌ及びサルを使った長期試験では、ゼラノールは弱いエストロゲンであることが分かった。ほとんどの変化は、乳腺及び生殖器官に発生した。ゼラノールは、ラットにおいて、他の生殖パラメーターに変化を引き起こさず、また、マウス又はラットに催奇形性はなかった。ゼラノール並びにその代謝物ゼアララノン (zearalanone) 及びタレラノール (taleranol) は、細菌及び哺乳動物実験系を使った多くの試験において、変異原性を示さなかった。ゼラノール (特殊な濃度ではない) は、Rec-assay 試験 (枯草菌) で陽性結果を示し、また、タレラノール (taleranol) は、チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた試験の非活性下で陽性結果を示したが、活性化存在下では陰性であった。

ラットで実施された発がん性試験では、ゼラノール 25 ppm (1.25 mg/kg 体重/日相当) までの飼料混餌濃度においては、エストロゲン様作用が認められたが、発がん作用はみられなかった。マウスで行われた試験では、ゼラノール 15 ppm (2.25 mg/kg 体重/日相当) を混餌投与した最高用量群の雄マウスにおいて、有意なエストロゲン様作用が認められた。また、これらのマウスは、陰性対照群に比べて脳下垂体の前葉腫瘍の高い発生頻度を示した。そのような腫瘍は、マウスにおいて稀に自然発生するが、エストロゲンホルモンの投与結果でも良く知られている。エストラジオール 17β の 2.5 ppm を混餌投与した陽性対照群では、ゼラノール投与群又は陰性対照群に比べて下垂体前葉腫瘍の高い発生頻度が示された。従って、本委員会は、ゼラノールの発がん作用は、そのエストロゲン様特性に関係しており、また、腫瘍に対するホルモンの無作用量 (no-hormonal-effect level) の決定から、暴露される際の安全レベルの推定が可能になるであろうと結論した。

雄のカニクイザルを使った試験では、最高用量群 (5 mg/kg 体重/日) でもエストロゲン様作用が観察されなかったため、ホルモンの無作用量 (no-hormonal-effect level) は確定できなかった。正常雌のカニクイザル及びアカゲザルでは、ホルモンの無作用量 (no-hormonal-effect level) は 5 mg/kg 体重/日と確定された。卵巣摘出 (ovariectomized) された雌カニクイザルにおけるホルモンの無作用量 (no-hormonal-effect level) は、0.05 mg/kg 体重/日であった。本委員会は、このモデルは、ヒト集団 (human population) に関連しており、卵巣摘出雌カニクイザルがエストロゲン様物質に高い感受性を示すことから、ヒトにおける一日摂取許容量 (ADI) を設定する基礎として、この試験を使用することによる従来のアプローチ法を採用できると結論した。

評価（原文 p.13）

ホルモン作用を引き起こさないレベル

サル: 0.05 mg/kg 体重/日

一日摂取許容量の推定

0~0.5 µg/kg 体重

ゼラノールの毒性試験と結果の概要（評価書：JECFA 2011）

試験の種類	供試動物等	投与量	結果
急性毒性試験（強制経口投与） 急性毒性試験	ラット	0、200 mg/kg 体重	血糖値減少、総コレステロール上昇（雄）及び減少（雌）、雄で精巣上体重量減少、雌で子宮重量増 表 2 を参照のこと
4 日間急性毒性試験（強制経口投与）	ラット	0、200 mg/kg 体重 / 日	総コレステロール及び血糖値の低下。雄で精巣、精嚢腺及び精巣上体の重量減少、副腎重量の増加、精細管の成熟精子の欠損。雌で子宮及び副腎重量の増加、卵巣の黄体隆起。
8 週間短期毒性試験（混餌投与）	マウス	0、1、5、25、50、100 ppm	≥ 25 ppm 群：雌で卵巣絶対及び相対重量の減少 100 ppm 群：雌で子宮重量の変化（増）
13 週間短期毒性試験（飼料添加）	ラット	0、0.02、0.18、1.2、8.8 mg/kg 体重/日相当	8.8 mg/kg 群：雄で体重増加量の減少、腎に石灰化円柱の増加。雌雄で肝細胞の空胞化。 0.18 mg/kg 群：影響なし。
150 日短期毒性試験（皮下埋め込み）	ラット	12 mg	成長、卵巣嚢胞、乳腺低下、卵巣及び子宮重量の減少、黄体欠如、子宮粘膜の顕著な扁平上皮化生
6 週間短期毒性試験（強制経口投与）	ラット	25、50、100（→800）、200（→1,600）、400 mg/kg 体重/日（5 日/週の投与）、4 週目に増量	≥ 25 mg/kg 群：外性器変化（精巣サイズ縮小及び雌の外陰部腫大）、脱毛症、弛緩、過剰排尿、成長率減少、精子形成停止、前立腺、精嚢腺及び凝固腺の萎縮、グラーフ卵胞欠損、子宮内膜の肥厚、精嚢腺の扁平上皮化生、腎臓の石灰化円柱
14 日間短期毒性試験（皮下）	ラット	0、2.25、9.0 mg/kg 体重/日	成長率減少。雄で生殖腺、前立腺及び胸腺の相対重量減少、精嚢及び副腎の相対重量増加。雌で生殖腺及び胸腺の相対重量減少、子宮及び副腎の相対重量増加、黄体数減少。
13 週間短期毒性試験（混餌投与）	ラット	0.25、1.25、6.25 mg/kg 体重/日	≥ 1.25 mg/kg：軽度の成長抑制
26 週間短期試験（投与経路不明）	ラット	0.1、0.8、6.4 mg/kg 体重/日	6.4 mg/kg 群：摂餌量及び体重増加量減少。雄でヘモグロビン値の低下傾向。雌で肝細胞サイズの不規則性を含む軽度の変化。
6 週間短期毒性試験（カプセル経口投与）	イヌ	25、50、100（→800）、200（→1,600）、400 mg/kg 体重/日（5 日/週の投与）、4 週目に増量	≥ 25 mg/kg 群：雌で外陰部腫大。雄で精巣サイズ減少。 ≥ 100 mg/kg 群：雌雄で白血球増加及びリンパ球減少、乳管増殖。雌で膈上皮角化を伴う外陰部腫大及び卵巣萎縮。雄で精上皮及び前立腺の萎縮、前立腺部尿道の過形成又は扁平上皮化生、 200/1,600 mg/kg 群：ヘモグロビン及びヘマトクリット値の減少並びに赤血球沈降率の低下。 ≥ 400 mg/kg 群：骨髓細胞実質及び骨髓球/赤血球比の増加。
14 週間短期毒性試験（カプセル経口投与）	イヌ	0.25（→12.5）、1.25、6.25 mg/kg 体重/日、31 日以降に増量	雄で生殖器サイズ縮小、精子形成停止。雌で子宮重量増傾向。 12.5 mg/kg 群：雄（1 頭）の前立腺上皮萎縮
29 週間短期毒性試験（混餌投与）	イヌ	10、100、1,000 ppm	1,000 ppm 群：体重減少（雄 1 匹）、急速沈降速度、ヘモグロビン値減少、白血球数増加、リンパ球数減少（以上、雄 3 匹）、精巣萎縮、前立腺扁平上皮化生、子宮内膜肥厚、卵巣萎縮、骨髓細胞過形成、膀胱扁平上皮化生。

試験の種類	供試動物等	投与量	結果
1年間長期試験(混餌投与)	ラット	0、0.1(→20)、0.8、6.4 mg/kg 体重/日、36週目以降に増量	全投与群：体重増加量の減少。 0.1/20 mg/kg 群：ヘモグロビン減少、血小板増加、プロトロンビン時間延長、前立腺、卵巣及び精嚢腺の絶対及び相対重量減少、子宮及び脳下垂体の絶対及び相対重量増加、雄で肝グリコーゲン枯渇、肝細胞サイズの不規則性、骨髓細胞実質不全、ネフロンの変性変化。
104-105週間長期試験(混餌投与)	ラット	0、0.1(→20)、0.8、6.4 mg/kg 体重/日、28週目以降に増量	6.4、0.1/20 mg/kg 群：体重増加抑制、試験後半に白内障。 ≥0.8 mg/kg 群：脱毛症。 0.1/20 mg/kg 群：ヘモグロビン、ヘマクリット値の減少(雌>雄)、精嚢腺、精巣、卵巣及び前立腺の絶対重量低値。 全投与群：肝臓(肝細胞の枯渇化、サイズの不規則性、実質細胞空胞化、慢性炎症細胞浸潤、結節性過形成)、卵巣(萎縮)、子宮(子宮内膜炎、扁平上皮化生及び子宮内膜の嚢胞性増殖)、精巣、前立腺及び精嚢腺(萎縮)に変化。
1年間長期毒性試験(混餌投与)	イヌ	0.025、2.5、25 mg/kg 体重/日	2.5 mg/kg 群：精巣萎縮、前立腺の萎縮及び扁平上皮化生。 25 mg/kg 群：血小板増加、リンパ球減少、沈降速度増加、白血球数増加、膣上皮細胞の角質化、生殖腺萎縮、前立腺及び子宮の扁平上皮化生及び炎症的变化、膀胱皮膜組織の扁平上皮化生、骨髓の脊髄性要素増加及び子宮内膜過形成
104週間長期毒性試験(混餌投与)	イヌ	0.1、100、1,000 ppm	1,000 ppm 群：沈降速度増加、白血球数増加、リンパ球減少。雄で前立腺及び下垂体の相対重量増加、生殖腺の相対重量減少。雌で子宮の相対重量増加。雌雄で肝臓、腎臓、副腎及び甲状腺の相対重量増加、乳腺腫大、精巣小型化、包皮浮腫、外陰部、前立腺及び子宮の腫大化、卵巣萎縮、子宮及び前立腺の扁平上皮化生及び炎症性変化、膀胱の慢性炎症変化。 100 ppm 群：多様化した骨髓球系過形成、骨髓萎縮。
7年間長期毒性試験(カプセル経口投与)	イヌ	0、15、38 mg/kg 体重/日(循環法：21日間連続投与、7日間無投与)(91サイクル)	38 mg/kg 群：平均体重低下、相対的に強い子宮走性作用、膣、頸部及び外陰部粘膜の増殖及び角化、嚢胞性子宮内膜過形成、内性子宮内膜症及び化膿性子宮炎の増加。 ≥15 mg/kg 群：卵巣の平均及び相対重量の増加。
10年間長期毒性試験(強制経口投与)	サル	0、15、75 mg/kg 体重/日(循環法：21日間連続投与、7日間無投与)(131サイクル)	投与群：何点かの眼科学的変化有 75 mg/kg 群：触知可能な子宮腫瘍の高発生、無月経の長期化、体重増加量の減少(対照群の75%)、高い安定的SGPT活性、肝臓及び子宮の絶対及び相対重量の増加、卵巣の絶対及び相対重量の減少、下垂体の相対重量増加、副腎の絶対及び相対重量増加、子宮腫大、子宮内膜と子宮筋層肥厚、卵管腫大、外性子宮内膜症。膣上皮下結合組織の硝子化、子宮頸管腺基底部の扁平上皮化生、卵巣萎縮、黄体欠如、乳腺乳管及び腺房の過形成、嚢胞性子宮内膜増殖症、子宮筋層肥大、外性子宮内膜症。
104週間発がん性試験(混餌投与)	マウス	0、0.15、1.5、15 ppm 陽性対照：エストラジオール 17β 2.5 ppm	15 ppm 群：雄で下垂体腫大、精嚢腺拡張、下顎唾液腺の雌型への転換、胸骨小柱形成、副腎の皮膜下過形成増加。雌で脱毛症、頸部粘液及び膣上皮増。雌雄で副腎褐色変性。 腫瘍発生作用については、原文、p.2、Table 1. 参照

試験の種類	供試動物等	投与量	結果
104 週間発がん性試験 (混餌投与)	ラット	0、0.25、2.5、25 ppm 陽性対照: エストラジオール 17β 2.5 ppm エストラジオール 17β 15 mg 皮下埋め込み群	0.25 ppm 群: 赤血球パラメーター及び白血球数の増加、 25 ppm 群: 雌で子宮拡張。 新生物の増加はなし。
変異原性試験			原文 p.6、Table 2. 参照のこと
2 世代繁殖試験 (混餌投与)	ラット	0、0.25、1.77、12.5、25 ppm	F0 全投与群: で体重及び摂食量減少、肝重量減少、精囊腺重量の減少、雌で卵巣重量の減少 ≥ 12.5 ppm: 雄で体重減少 F1 高用量群: 体重増加量の減少
催奇形性試験 (皮下投与)	マウス	10~10,000 µg/kg 体重/日 (対数用量)	≥ 1,000 µg 群: 同腹児数の減少 (対照群: 投与群=81:35%) 児動物平均体重の減少、死産胎児数の増加、骨中髄質小柱の増加
催奇形性試験 (経口投与)	ラット	妊娠 1~5 日に 4 mg (単回)、妊娠 1~4 日に 1 mg/日、妊娠 6 日に 8 mg (単回)	妊娠 4 日までの投与で着床阻害傾向 (不明確) 着床した事例では妊娠 9 日まで胚吸収
発生毒性試験 (3 世代試験) (混餌投与)	ラット	0、0.01、0.1、0.2 ppm	特段の変化なし
60 日間生殖毒性試験 (経口投与)	ラット雄 (雌は無投与)	0.32、1.25、5 mg/kg 体重/日	雄に受精遅延、雌に受胎開始遅延
60 日間生殖毒性試験 (経口投与)	ラット雌 (雄は無投与)	0.32、1.25、5 mg/kg 体重/日	雌に産児数減少、死産増加、生存率減少
催奇形性試験 (経口投与)	ラット	2、6 mg/kg 体重/日	生存胎児数減少、吸収数増加
催奇形性試験 (経口投与)	ウサギ	1、5 mg/kg 体重/日	異常なし
その他			
ホルモン作用を起こさないレベル	サル		0.05 mg/kg 体重/日
ADI(推定)			0 - 0.5 µg/kg 体重

略称

略称	正式名称(英語)	日本語訳
FAO	Food and Agriculture Organization	国連食糧農業機関
WHO	World Health Organization	世界保健機関
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives	FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会
LD ₅₀	50% Lethal Dose	半数致死量
ADI	Acceptable daily intake	一日の許容摂取量
s.c.	Subcutaneous	皮下
i.p.	intraperitoneal	腹腔内
SGPT	serum glutamate pyruvate transaminase	血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ