

3－ニトロオキシプロパノールの飼料添加物としての指定並びに基準及び規格の設定

飼料添加物については、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（昭和 28 年法律第 35 号）第 2 条第 3 項並びに第 3 条第 1 項及び第 2 項の規定に基づき、農林水産大臣が農業資材審議会の意見を聴いて指定し、その基準又は規格を設定している。

令和 5 年 2 月 6 日付け 4 消安第 5743 号をもって諮問された 3－ニトロオキシプロパノールについて、飼料安全部会の各小委員会において効果安全性や基準及び規格について検討した。その概要は次のとおりである。

1. 飼料の製造の方法の基準を改正する飼料添加物

飼料添加物名：3－ニトロオキシプロパノール

用 途：飼料の栄養成分その他の有効成分の補給

2. 経過

令和 5 年 2 月 6 日 諮問

令和 5 年 2 月 6 日 飼料添加物効果安全性小委員会

令和 6 年 2 月 14 日 飼料添加物規格小委員会

3. 飼料安全部会の審議結果

効果安全性を確認した（資料 P. 2～74 のとおり）。

基準及び規格を作成した（資料 P. 75～82 のとおり）。

飼料添加物の効果安全性について（案）

3—ニトロオキシプロパノール

令和6年3月12日

農林水産省 消費・安全局 畜水産安全管理課

目 次

1	名称等	3
2	起源又は発見の経緯、外国での飼料添加物としての許可状況及び使用状況等	3
3	効果に関する事項	4
3-1	効果を裏付ける基礎試験	4
3-1-1	人工ルーメン発酵再現試験	5
3-1-2	人工ルーメン発酵再現試験	6
3-1-3	人工ルーメン発酵再現試験	7
3-2	野外応用試験	9
3-2-1	乳用牛	9
3-2-2	乳用牛	10
3-2-3	乳用牛	12
3-2-4	肉用牛	14
4	残留性に関する事項	15
4-1	牛	16
4-2	牛	16
5	安全性に関する事項	18
5-1	毒性試験	18
5-1-1	一般毒性試験	18
5-1-1-1	単回投与毒性試験	18
5-1-1-2	反復投与毒性試験（短期）	18
5-1-1-2-1	ラット	18
5-1-1-2-2	ラット	22
5-1-1-2-3	ラット	25
5-1-1-3	反復投与毒性試験（長期）	28
5-1-1-3-1	ラット	28
5-1-1-3-2	ラット	32
5-1-2	特殊毒性試験	35
5-1-2-1	世代繁殖試験	35
5-1-2-2	発生毒性試験	45
5-1-2-2-1	ラット	45
5-1-2-2-2	ラット	45
5-1-2-2-3	ウサギ	48
5-1-2-3	発がん性試験	50
5-1-2-4	変異原性試験	50
5-1-3	その他の毒性試験（精巣毒性）	51
5-1-3-1	ラット	51
5-1-3-2	生物種の比較	53
5-1-4	生体内動態試験	57

5-1-4-1	ラット	59
5-1-4-2	ラット	60
5-1-4-3	反芻動物 (<i>in vitro</i>)	61
5-1-4-4	反芻動物 (<i>in vivo</i>)	62
5-2	対象家畜等を用いた飼養試験	64
5-2-1	牛	64
6	審議結果	68
6	参照 (参考文献及び参考資料)	69

3-ニトロオキシプロパノールに関する効果安全性について

1 名称等

一般名：3-ニトロオキシプロパノール

化学名：3-nitrooxypropanol

CAS 番号：100502-66-7

用途：飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進

対象家畜及び推奨添加量：

乳用牛飼料 3-ニトロオキシプロパノールとして 60～100 mg/kg 乾物飼料（飼料中に 0.006～0.010%相当）

肉用牛飼料 3-ニトロオキシプロパノールとして 100～150 mg/kg 乾物飼料（飼料中に 0.010～0.015%相当）

2 起源又は発見の経緯、外国での飼料添加物としての許可状況及び使用状況等

2-1 起源又は発見の経緯

反芻動物は主食である繊維をルーメン内で発酵させて、エネルギー源として利用する揮発性脂肪酸（VFA：Volatile fatty acids）を生成する。反芻動物の嫌気性消化器系での VFA の生成は、水素の生成につながる。水素は、ルーメン内のメタン産生古細菌の成長に必要なエネルギー源として利用され、非常に効率的な経路を介してメタンを生成し、二酸化炭素と共にげっぷ（あい気）を通じて放出される。

メタン生成経路の最終段階において、メチル補酵素 M ($\text{CH}_3\text{-S-CoM}$) は、補酵素 B (HS-CoB) と反応して、メタンを放出するとともにヘテロジスルフィド (CoB-S-S-CoM) を形成する。この反応はメチル補酵素 M 還元酵素 (MCR: Methyl Coenzyme M reductase.) によって触媒される。3-ニトロオキシプロパノール（以下、3-NOP という）は、1,3-プロパンジオールの硝酸エステルであり、 $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ に構造が類似していることから、MCR に結合する。結合後、亜硝酸塩を放出し MCR の活性を阻害することから、メタンの生成を削減する。

2-2 許可状況及び使用状況等

3-NOP は、欧州食品安全機関（EFSA）において 2021 年 11 月に乳生産用及び繁殖用反芻動物における腸内メタンガス生産の低減に有効である畜産添加物（zootechnical additive）として安全性評価が終了している。[参照 1]

ブラジル・チリにおいても、2021 年 9 月に飼料添加物としての指定を受けている。また、動物用医薬品としては承認されていない。

3 効果に関する事項

3-1 効果を裏付ける基礎試験

3-1-1 人工ルーメン発酵再現試験 (*in vitro*)

(1) 方法

RUSITEC 発酵槽 (39°C、900 mL) を用いて、ルーメン内発酵を人工的に再現した。培養液 (人工唾液 : 20%、ルーメン液 : 80%) と飼料 10 g を試料として、人工唾液を 2.9%/h の割合で供給し、以降各試料が 48 時間発酵される度に試料を交換した。

試験開始 1~7 日目は 3-NOP を無添加、8~15 日目に 3-NOP を 0、5、10、20 mg/槽で添加、16~18 日目は 3-NOP 無添加で発酵した (1 群あたり 2 反復)。

(2) 統計解析

試験結果の解析は、mixed model procedure を用いた。

(3) 結果

乾物・有機物の消化量及び総ガス発出量について、3-NOP 投与の影響は認められなかった。

メタン産生量について、3-NOP 添加群は無添加群と比較して減少し、用量相関的に 75.9~85.6%減少した。

水素産生量について、3-NOP 添加群は無添加群と比較して増加し、用量相関的に 158.8~217.6%上昇した。(表 1 参照)

総原生動物細胞数及び細菌、液相中のメタン生成菌の 16SrRNA 遺伝子の総コピー数について、3-NOP 投与による影響は認められなかった。

固相中のメタン生成菌の 16SrRNA 遺伝子の総コピー数は、3-NOP 添加群は無添加群と比較して有意に減少した。(表 2 参照)。[\[参照 2\]](#)

表 1 人工的にルーメン内発酵を再現したときの 3-NOP の効果

	3-NOP (mg/槽)			
	0	5	10	20
乾物消失量 (g/kg 乾物)	569	560	561	562
有機物消失量 (g/kg 有機物)	569	566	577	568
総ガス排出量 (L/日)	1.12 (100%)	1.07 (-4.5%)	1.14 (+1.8%)	1.14 (+1.8%)
メタン (mL/日)	27.8 ^a (100%)	6.7 ^b (-75.9%)	4.3 ^b (-84.5%)	4.0 ^b (-85.6%)
メタン (mL/g 乾物)	2.82 ^a (100%)	0.70 ^b (-75.2%)	0.44 ^b (-84.4%)	0.39 ^b (-86.2%)
メタン (mL/g 乾物消失量)	4.93 ^a (100%)	1.25 ^b (-74.6%)	0.78 ^b (-84.2%)	0.69 ^b (-86.0%)

各値は平均値である。() 内は陰性対象群に対する割合

各項目内の異文字間に有意差あり ($p < 0.05$)

表 2 人工的にルーメン内発酵を再現したときの 3-NOP の効果

	3-NOP (mg/槽)			
	0	5	10	20
pH	6.96	6.98	7.00	6.99
VFA (総揮発性脂肪酸) (mM)	33.9	33.7	33.6	33.7
VFA 内訳				
酢酸 (A) (%)	36.8 ^a	35.2 ^{ab}	35.3 ^{ab}	33.6 ^b
プロピオン酸 (P) (%)	20.4	20.8	21.4	20.5
酪酸 (B) (%)	21.1	21.5	21.8	22.9
吉草酸 (V) (%)	15.9	15.7	15.1	16
イソ酪酸 (%)	0.45	0.47	0.48	0.47
イソ吉草酸 (%)	1.59 ^b	2.35 ^a	2.07 ^a	2.29 ^a
カプロン酸 (%)	3.7	4.17	4.06	4.23
P+B+V (%)	57.4	57.8	58.1	59.4
A:P 比 (%)	1.84	1.73	1.66	1.68

各値は平均値である

各項目内の異文字間に有意差あり

表 3 人工的にルーメン内発酵を再現したときの 3-NOP の効果

	3-NOP (mg/槽)			
	0	5	10	20
総原生動物 ($\times 10^3$ 細胞/mL)	4.2	5.6	5.7	5.9
液相				
細菌 ($\times 10^9$ コピー/mL)	3.12	3.39	6.08	8.24
メタン生成菌 ($\times 10^6$ コピー/mL)	8.09	3.95	5.08	5.25
固相				
細菌 ($\times 10^{10}$ コピー/mL)	14.5	16.5	9.5	9.4
メタン生成菌 ($\times 10^6$ コピー/mL)	5.25 ^a	0.50 ^b	0.18 ^b	0.17 ^b
細菌 N (mg/日) 注)				
総数	169	136	145	133
液体関連微生物	33.2	34.6	33.6	26.2
固体関連微生物	136	102	111	107
微生物たん白質合成効率 (mg 細菌 N/g 有機物消失量)	32.2	26.7	28.7	25.6
窒素 (mM)	6.59	6.13	6.18	6.31

各値は平均値である

各項目内の異文字間に有意差あり ($p < 0.05$)

注) 試験 9 日目以降、人工唾液用の硫酸アンモニウムを 15N ラベル - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ に置換

3-1-2 人工ルーメン発酵再現試験 (*in vitro*)

(1) 方法

RUSITEC 発酵槽 (39°C、900 mL) を用いて、ルーメン内発酵を人工的に再現した。培養液 (人工唾液 : 20%、ルーメン液 : 80%) と飼料 10 g を試料として、人工唾液を 2.9%/h の割合で供給し、以降各試料が 48 時間発酵される度に試料を交換した。

試験開始 1~7 日目は 3-NOP を無添加、8~15 日目に表 4 のとおり添加し、16~18 日目は 3-NOP 無添加で発酵した (1 群あたり 2 反復)。

表 4 試験用飼料に添加した 3-NOP 等の量

試験群	3-NOP 添加量
無添加群	0 mg/槽
3-NOP 群	2 mg/槽
モネンシン群	0 mg/槽 + モネンシンナトリウム 2 mg
3-NOP + モネンシン群	2 mg/槽 + モネンシンナトリウム 2 mg

(2) 統計解析

試験結果の解析は、mixed model procedure を用いた。

(3) 結果

総ガス発出量及びメタン排出量について、3-NOP 群及び 3-NOP + モネンシン群は無添加群と比較して有意に減少した。なお、モネンシンによる相乗作用はみられなかった。

水素産生量について、3-NOP 群及び 3-NOP + モネンシン群は無添加群と比較して有意に増加した。なお、モネンシンによる相乗作用はみられなかった。

液相中の細菌数、メタン生成菌数及び固相中の細菌数について、影響は認められなかった。

固相中のメタン生成菌数について、3-NOP 群及び 3-NOP + モネンシン群は無添加群と比較して有意に減少した。なお、モネンシンの併用による影響はみられなかった。(表 5 参照)。^[参照 3]

表 5 人工的にルーメン内発酵を再現したときの 3-NOP の効果

	無添加群	3-NOP 群	モネンシン群	3-NOP+ モネンシン群
総ガス排出量 (L/日)	1.27 ^a (100%)	1.10 ^c (-13.4%)	1.24 ^{ab} (-2.4%)	1.14 ^{bc} (-10.2%)
メタン (mL/日)	36.5 ^a (100%)	10.4 ^c (-71.5%)	32.2 ^b (-11.8%)	11.0 ^c (-69.9%)
メタン (mL/g 乾物消失量)	7.79 ^a (100%)	2.32 ^c (-70.2%)	6.88 ^b (-11.7%)	2.37 ^c (-69.6%)
水素 (mL/日)	22.9 ^b (100%)	38.1 ^a (+66.4%)	22.3 ^b (-2.6%)	41.8 ^a (+82.5%)
メタン (%)	2.85 ^a	0.98 ^b	2.65 ^a	0.98 ^b
液相 (log ₁₀ コピー/mL)				
細菌	9.32	9.47	9.50	9.60
メタン生成菌	6.74	6.61	6.78	6.41
固相 (log ₁₀ コピー/mL)				
細菌	11.51	11.51	11.52	11.45
メタン生成菌	7.02 ^a	5.83 ^b	6.88 ^b	5.52 ^b

各値は平均値である

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

3-1-3 人工ルーメン発酵再現試験 (*in vitro*)

(1) 方法

RUSITEC 発酵槽 (39°C、900 mL) を用いて、ルーメン内発酵を人工的に再現した。培養液 (人工唾液 : 20%、ルーメン液 : 80%) と飼料 10 g を試料として、人工唾液を 2.9%/h の割合で供給し、以降各試料が 48 時間発酵される度に試料を交換した。

試験開始 1~7 日目は 3-NOP を無添加とした。8~14 日目に 3-NOP を 0、500 mg/槽、硝酸アンモニウムカルシウム (肥料成分) 又はアントラキノン (農薬成分) を対照群として添加した。15~19 日目は 3-NOP 無添加で発酵した (1 群あたり 2 反復)。

(2) 統計解析

試験結果の解析は、mixed model procedure を用いた。

(3) 結果

乾物・有機物・粗たん白の消化量及び総ガス排出量について、3-NOP による影響はみられなかった。

総温室効果ガス (GHG) 量及びメタン排出量について、3-NOP 添加群は無添加群と比較して有意に減少した。

水素、二酸化炭素及び溶存水素排出量について、3-NOP 添加群は無添加群と比較して有意に増加した。

発酵液の pH 及び総揮発性脂肪酸濃度について、3-NOP による影響を見られなかつ

た。

酢酸、イソ吉草酸について、3-NOP 添加群は無添加群と比較して有意な低下した。

酪酸、吉草酸、カプロン酸、ヘプタン酸、3-プロパノール及びアンモニアについて、3-NOP 添加群は無添加群と比較して有意に増加した（表 6,7 参照）。[参照 4]

表 6 人工的にルーメン内発酵を再現したときの 3-NOP の効果

	無添加群	硝酸カルシウムアンモニウム群	3-NOP 群	アントラキノン群
総ガス排出量 (L/日)	0.74 (100%)	0.54 (-27.0%)	0.63 (-14.9%)	0.76 (+2.7%)
GHG (CO ₂ 当量、L/日) 注)	1.00 ^a (100%)	0.16 ^b (-84.0%)	0.34 ^b (-66.0%)	0.83 ^a (-17.0%)
メタン (%/総 GHG)	17.1 ^a (100%)	3.6 ^c (-78.9%)	5.0 ^c (-70.8%)	12.6 ^b (-26.3%)
水素 (%/総 GHG)	2.0 ^c (100%)	1.0 ^c (-50%)	10.3 ^a (+415%)	6.6 ^b (+230%)
二酸化炭素 (%/総 GHG)	80.9 ^c (100%)	95.4 ^a (+17.9%)	84.7 ^b (+4.7%)	80.9 ^c (±0%)
亜酸化窒素 (%/総 GHG)	0.00 ^b	0.04 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b
溶存水素 (%/総 GHG)	40.8 ^b (100%)	28.7 ^c (-29.7%)	53.7 ^a (+31.6%)	9.7 ^d (-76.2%)
消失量 (%)				
乾物	47.9	43.3	46.6	45.7
有機物	47.9	45.2	48.1	46.6
粗たん白	77.4 ^a	69.5 ^b	78.6 ^a	75.4 ^{ab}

各値は平均値である

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

注) 生成された CH₄、H₂、CO₂、及び N₂O の合計 (100 年の地球温暖化係数を補正。CO₂ : 1、CH₄ : 28、N₂O : 265、H₂ : 5.6; Derwent et al200, 6; IPCC、2014)

表 7 人工的にルーメン内発行を再現した時の 3-NOP の効果

	無添加群	硝酸カルシウムアンモニウム群	3-NOP 群	アントラキノン群
pH	6.92	6.95	6.97	6.96
総揮発性脂肪酸 (mM)	65.5	50.9	59.7	63.8
VFA 内訳 (%)				
ギ酸	5.76	5.52	7.21	5.68
酢酸 (A)	52.1a	68.1a	44.7c	46.5c
プロピオン酸 (P)	12.6	11.3	13.8	11.3
酪酸 (B)	15.3b	13.5c	17.4a	16.3ab
イソ酪酸	0.56a	0.30c	0.53ab	0.47b
吉草酸	5.56b	4.05c	8.26a	5.92b
イソ吉草酸	7.61a	0.84c	6.03b	6.83ab
カプロン酸	4.72c	1.43d	6.96b	9.50a
ヘプタン酸	1.57c	0.48d	2.31b	3.15a
A/P (mol/mol)	4.16b	6.36a	3.28b	4.18b
(A+B)/P (mol/mol)	5.38b	7.57a	4.54b	5.64b
エタノール (mM)	5.89bc	9.92a	7.68b	4.25c
n-プロパノール (mM)	0.19b	0.16b	0.41a	0.16b
アンモニア (mM)	14.1b	11.3c	19.2a	19.6a
硝酸塩 (mM)	0.00b	0.27a	0.00b	0.00b
亜硝酸塩 (mM)	0.00b	0.03a	0.00b	0.00b

各値は平均値である

各項目内の異文字間に有意差あり

3-2 野外応用試験 (*in vivo*)

3-2-1 乳用牛 (GreenFeed System を用いた試験)

(1) 方法

牛 (ホルスタイン、雌、平均体重 645 kg、1 週間順応及び 3 週間予備飼育) を用いて、基礎飼料 (無添加群)、基礎飼料に 3-NOP を 60 mg/kg 乾物飼料 (約 1.8~2.5 mg/kg 体重/日) で添加した飼料 (3-NOP 群) をそれぞれ 15 週間給与した (1 群 32、1 反復)。

牛の呼気の回収には、GreenFeed System を用いた。

(2) 結果

体重について、差はみられなかった。

メタン排出量について、3-NOP 群は、無添加群と比較して低く、試験終了時まで継続していた。

飼料摂取量について、差はみられなかった。

乾物飼料 1 kg 摂取あたりのメタン排出量について、3-NOP 群は、無添加群と比較し

て低かった。

乳産生量について、差はみられなかった。

乳成分のうち、乳たん白、カゼインについて有意な差がみられたが、品質に影響を及ぼす大きな変動はなかった。

(表 8 参照) 。[参照 5]

表 8 牛用飼料における 3-NOP の効果

	無添加群	3-NOP 群
試験開始前体重 (kg)	629	631
試験終了体重 (kg)	664	668
メタン排出量 (g/日) (予備飼育)	464.40	480.43
メタン排出量 (g/日) (投与期間)	423.24	331.62*
飼料摂取量 (kg/日) (予備飼育)	18.93	19.19
飼料摂取量 (kg/日) (投与期間)	19.099	18.840
メタン排出量／乾物飼料 (g/kg) (予備飼育)	25.02	25.54
メタン排出量／乾物飼料 (g/kg) (投与期間)	22.372	17.671*
乳産生量 (kg/日) (予備飼育)	27.86	27.78
乳産生量 (kg/日) (投与期間)	24.03	24.51
乳成分	-	-
乳脂肪 (g/kg 乳) (予備飼育)	37.5	39.3
〃 (g/kg 乳) (投与期間)	43.20	43.41
乳たん白 (g/kg 乳) (予備飼育)	31.8	31.6
〃 (g/kg 乳) (投与期間)	35.70	36.26*
カゼイン (g/kg 乳) (予備飼育)	24.0	23.9
〃 (g/kg 乳) (投与期間)	26.93	27.60*
尿素 (mg/dL 乳) (予備飼育)	15.38	15.0
〃 (mg/dL 乳) (投与期間)	18.4	18.94
乳糖 (%/乳) (予備飼育)	4.44	4.44
〃 (%/乳) (投与期間)	4.37	4.42
体細胞数 (×1,000/乳) (予備飼育)	38.52	60.12
〃 (×1,000/乳) (投与期間)	43.546	39.613

*：無添加群と比較し統計の有意差あり

3-2-2 乳用牛 (GreenFeed System を用いた試験)

(1) 方法

牛 (ホルスタイン、雌、平均体重 698 kg、1 週間順応及び 3 週間予備飼育) を用いて、基礎飼料 (無添加群)、基礎飼料に 3-NOP を 60 mg/kg 乾物飼料 (約 1.8~2.5 mg/kg 体重/日) で添加した飼料 (3-NOP 群) をそれぞれ 15 週間給与した (1 群 21 頭、1 反復)。

牛の呼気の回収には、GreenFeed System を用いた。

（２）結果

体重について、差はみられなかった。

メタン排出量について、3-NOP 群は、無添加群と比較して低く、試験終了時まで継続していた。

飼料摂取量について、差はみられなかった。

乾物飼料 1 kg 摂取あたりのメタン排出量について、3-NOP 群は、無添加群と比較して低かった。

乳産生量について、差はみられなかった。

乳成分のうち、カゼイン、尿素について有意な差がみられたが、品質に影響を及ぼす大きな変動はなかった。

水素排泄量について、3-NOP 群は、無添加群と比較して高くなった。傾向は投与直後よりみられた。（表 9 参照）。[参照 6]

表 9 牛用飼料における 3-NOP の効果

	無添加群	3-NOP 群
試験開始前体重 (kg)	712	694
試験終了体重 (kg)	739	721
メタン排出量 (g/日) (予備飼育)	406.08	400.19
メタン排出量 (g/日) (投与期間)	449.13	292.05*
飼料摂取量 (kg/日) (予備飼育)	25.06	24.65
飼料摂取量 (kg/日) (投与期間)	23.348	22.867
メタン排出量/乾物飼料 (g/kg) (予備飼育)	16.93	16.71
メタン排出量/乾物飼料 (g/kg) (投与期間)	20.275	13.472*
乳産生量 (kg/日) (予備飼育)	43.41	44.69
乳産生量 (kg/日) (投与期間)	37.42	35.98
乳成分		
乳脂肪 (g/kg 乳) (予備飼育)	35.6	34.8
〃 (g/kg 乳) (投与期間)	41.71	39.38
乳たん白 (g/kg 乳) (予備飼育)	30.5	29.8
〃 (g/kg 乳) (投与期間)	32.78	33.35
カゼイン (g/kg 乳) (予備飼育)	23.8	23.1
〃 (g/kg 乳) (投与期間)	25.60	26.24*
尿素 (mg/dL 乳) (予備飼育)	20.09	19.72
〃 (mg/dL 乳) (投与期間)	22.41	22.70
乳糖 (%/乳) (予備飼育)	4.54	4.49
〃 (%/乳) (投与期間)	4.43	4.47*
体細胞数 (×1,000/乳) (予備飼育)	254.14	217.07
〃 (×1,000/乳) (投与期間)	93.563	107.701
水素排出量 (g/日) (予備飼育)	2.71	2.39
水素排出量 (g/日) (投与期間)	2.612	10.638*

* : 無添加群と比較し統計的有意差あり

3-2-3 乳用牛 (GreenFeed System を用いた試験)

(1) 方法

牛 (ホルスタイン、雌、平均体重 596 kg、1 週間順応及び 3 週間予備飼育) を用いて、基礎飼料 (無添加群)、基礎飼料に 3-NOP を 60 mg/kg 乾物飼料 (約 1.8~2.5 mg/kg 体重/日) で添加した飼料 (3-NOP 群) をそれぞれ 15 週間給与した (1 群 24 頭、1 反復)。

牛の呼気の回収には、GreenFeed System を用いた。

(2) 結果

体重について、3-NOP による影響はなかった。

メタン排出量について、3-NOP 群は、無添加群と比較して低下した。

乾物飼料 1 kg 摂取あたりのメタン排出量について、3-NOP 群は、無添加群と比較して低かった。

乳産生量について、差はみられなかった。

乳成分のうち、乳脂肪、尿素について有意な差がみられたが、品質に影響を及ぼす大きな変動はなかった。

水素排泄量について、3-NOP 群は、無添加群と比較して高くなった。傾向は投与直後よりみられた。（表 10 参照）。[参照 7]

表 10 牛用飼料における 3-NOP の効果

	無添加群	3-NOP 群
試験開始前体重 (kg)	596	608
試験終了体重 (kg)	640	648
メタン排出量 (g/日) (予備飼育)	368.94	402.61
メタン排出量 (g/日) (投与期間)	410.35	308.11*
飼料摂取量 (kg/日) (予備飼育)	24.78	26.99
飼料摂取量 (kg/日) (投与期間)	25.267	25.728
メタン排出量／乾物飼料 (g/kg) (予備飼育)	15.04	14.93
メタン排出量／乾物飼料 (g/kg) (投与期間)	16.687	12.080*
乳産生量 (kg/日) (予備飼育)	42.48	45.30
乳産生量 (kg/日) (投与期間)	38.80	38.15
乳成分	-	-
乳脂肪 (g/kg 乳) (予備飼育)	34.9	37.5
〃 (g/kg 乳) (投与期間)	38.3	40.2*
乳たん白 (g/kg 乳) (予備飼育)	27.9	38.2
〃 (g/kg 乳) (投与期間)	31.0	31.5
カゼイン (g/kg 乳) (予備飼育)	21.7	23.1
〃 (g/kg 乳) (投与期間)	26.5	26.2
尿素 (mg/dL 乳) (予備飼育)	11.23	10.89
〃 (mg/dL 乳) (投与期間)	11.620	12.038*
乳糖 (%/乳) (予備飼育)	4.95	4.90
〃 (%/乳) (投与期間)	4.79	4.76
体細胞数 (×1,000/乳) (予備飼育)	34.66	87.81
〃 (×1,000/乳) (投与期間)	39.154	19.331
水素排出量 (g/日) (予備飼育)	0.47	0.35
水素排出量 (g/日) (投与期間)	0.463	2.557*

*：無添加群と比較し統計的有意差あり

3-2-4 肉用牛

各試験において、3-NOP を最大 300 mg 相当/kg 乾物飼料の割合で飼料を通じて 21～238 日間与えた結果、系種・場所・飼料・期間が異なるものの無添加群と比較し、一日あたりのメタン排出量において、平均で 38.4%の削減効果が認められた。

また 3-NOP 投与群において、*in vitro* 試験又は乳用牛への投与試験で確認された水素の増加、ルーメン内の酢酸の減少、プロピオン酸の増加、メタン生成菌類の減少と同様の事象が確認された。また乳用牛同様に、3-NOP 投与による飼育成績への影響等は認められなかった。肉用牛と乳用牛を比較したところ、用量あたりの効果は、乳牛の方が大きいとしている。

系種、配合飼料組成、乾物割合が異なるが、3-NOP を乳牛においては 60～80 mg/kg 乾物飼料添加で、肉用牛においては 150～200 mg/kg 乾物飼料添加でそれぞれ 30%のメタン排出削減効果が期待出来る。[参照 8, 9]

4 残留性に関する事項

4-1 牛

(1) 方法

牛（ホルスタイン、雌、36～72 ヶ月齢、平均体重不明）を用いて、基礎飼料（無添加群）、基礎飼料に 3-NOP をそれぞれ 85、425、850 mg/kg 飼料（それぞれ、1.6、8.0、16.0 g/頭/日）で添加した飼料（3-NOP 群）、をそれぞれ 90 日間給与した（1 群 4 頭、1 反復）。

肝臓、腎臓、筋肉組織、脂肪、乳を試料とし、3-NOP の代謝産物である 3-ニトロオキシプロピオン酸（NOPA）を測定対象とした。

(2) 統計解析

試験結果の解析は、一元配置分散分析及びペアワイズ比較検定を用いた。

(3) 結果

臓器及び筋肉について、全 3-NOP 群において、NOPA 濃度は定量限界値（5 ng/g）以下であった（表 11 参照）。

乳について、3-NOP 群は無添加群と比較して NOPA の残留がみられた。3-NOP 投与により、用量相関的及び経時的に乳中の NOPA 含量が増加する傾向であった。（表 12 参照）。[参照 10]

表 11 臓器、筋肉における NOPA 濃度（ng/g）

組織	NOPA 濃度（ng/g）				
	肝臓	腎臓	筋肉組織	大網脂肪	腎周囲脂肪
無添加群	<5	<5	<5	<5	<5
3-NOP 群（850 mg/kg）	<5	<5	<5	<5	<5

定量限界値：5 ng/g

表 12 乳における NOPA 濃度 (ng/g)

サンプル採取日		7 日前		2 日目		8 日目		30 日目		90 日目	
		午前	午後	午前	午後	午前	午後	午前	午後	午前	午後
無添加	9	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1.73*	<1	<1
	11	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1.75*
	12	<1	<1	<1	<1	<1	3.18*	<1	<1	<1	<1
	20	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
3-NOP 群 (85 mg/kg)	8	<1	<1	<1	1.82	<1	2.4	<1	6.57	<1	3.06
	14	<1	<1	<1	3.5	<1	3.38	<1	10.2	<1	3.59
	16	<1	<1	<1	2.07	<1	3.48	<1	5.78	1.21	8.58
	18	<1	<1	<1	3.31	<1	5.39	<1	3.59	<1	3.41
3-NOP 群 (450 mg/kg)	2	<1	<1	3.53	7.4	1.95	9.06	<1	27.8	<1	32.2
	3	<1	<1	1.45	1.76	<1	14.3	<1	4.26	3.73	15
	6	<1	<1	<1	10.9	1.11	39.2	<1	42.6	<1	52.1
	15	<1	<1	4.43	27	<1	<1	**	**	**	**
3-NOP 群 (850 mg/kg)	1	<1	<1	8.43	<1	7.83	78.7	**	**	**	**
	13	<1	<1	10.8	8.14	3.14	20.1	12.4	6.45	7.2	10.7
	17	<1	<1	6.11	3.15	<1	55	3.94	88.1	4.99	83.8
	19	<1	<1	7.97	108	<1	146	10.7	41	19.7	23.1

定量限界値：1 ng/g, *：再分析値, **：試料採取出来ず

4-2 牛

(1) 方法

牛（ホルスタイン、雌、24～84 ヶ月齢、平均体重不明）を用いて、基礎飼料（無添加群）、基礎飼料に 3-NOP をそれぞれ 80、100、200 mg/kg 飼料（それぞれ、1.28、1.6、3.2 g/頭/日）で添加した飼料（3-NOP 群）、をそれぞれ 56 日間給与した（1 群 20 頭、1 反復）。

肝臓、腎臓、筋肉組織、脂肪、乳を試料とし、3-NOP の代謝産物である NOPA を測定対象とした。

(2) 統計解析

試験結果の解析は、一元配置分散分析及びペアワイズ比較検定を用いた。

(3) 結果

臓器・組織について、全 3-NOP 群において、NOPA 濃度は定量限界値（5 ng/g）以下であった（表 13 参照）。

乳について、3-NOP 群は無添加群と比較して NOPA の残留がみられた。3-NOP 投与により、用量相関的及び経時的に乳中の NOPA 含量が増加する傾向であった。（表 14 参照）。[参照 11]

表 13 組織における NOPA 濃度 (ng/ml)

	肝臓	腎臓	筋肉組織	脂肪
無添加群	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00
3-NOP 群 (80mg/kg)	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00
3-NOP 群 (100mg/kg)	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00
3-NOP 群 (200mg/kg)	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00

定量限界値 : 5.00 ng/ ml

表 14 乳における NOPA 濃度 (ng/ ml)

	サンプル採取日									
	投与 前	2 日 目	8 日 目	15 日 目	22 日 目	29 日 目	36 日 目	43 日 目	50 日 目	56 日 目
無添加群	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
3-NOP 群 (80 mg/kg)	<1.00	1.04	<1.00	<1.00	1.01	1.02	1.12	<1.00	<1.00	1.04
3-NOP 群 (100 mg/kg)	<1.00	1.00	<1.00	1.13	1.17	1.06	1.12	1.06	1.10	1.10
3-NOP 群 (200 mg/kg)	<1.00	1.23	1.05	1.32	1.54	1.27	1.41	1.45	1.54	1.23

定量限界値 : 1 ng/ ml

5 安全性に関する事項

5-1 毒性試験

5-1-1 一般毒性試験

5-1-1-1 単回投与毒性試験

(1) 方法

ラット (Wistar 系統、雌、8~11 週齢、体重 154~189 g) を用いて、3-NOP を 300、2,000 mg/kg 体重/日の量をそれぞれ強制経口投与し、15 日間観察した (1 群雌各 6 匹)。

(2) 結果

2000 mg/kg 体重投与群では、嗜眠、前足と後足の筋肉のけいれん、横臥、腰の曲がった姿勢、異常な歩行、呼吸困難、立毛、青白い外観、眼瞼下垂及び/又は低体温が 1 日目から 5 日目までに認められ、投与 2 日目に 2 匹が死亡し、2 匹をと殺した。と殺した 1 匹では空腸及び回腸の赤変が観察された。

300 mg/kg 体重投与群で、1 日目にすべての動物で鳥肌と立毛が認められた。

試験期間中に生き残った動物の体重増加は、同じ年齢及び系統の未治療の正常な動物に期待されるものと同様であると考えられた。

本試験における LD₅₀ は、300~2000 mg/kg 体重としている。[参照 12]

5-1-1-2 反復投与毒性試験 (短期)

5-1-1-2-1 ラット

(1) 方法

ラット (Han Wistar 系統、雌雄、11 週齢、体重不明) を用いて、無水ケイ酸を混和した 3-NOP を 3-NOP として、0 (水)、0 (プラセボ)、20、100、500 mg/kg 体重/日でそれぞれ強制経口投与にて、雄 29 日間及び雌 42~52 日間給与した。(1 群雌雄各 10 匹)。

雌は、交尾前は 2 週間投与し、交尾中、妊娠期及び哺育期の少なくとも 4 日間投与

(2) 結果

A) へい死

投与に起因する影響は認められなかった。対照群の雄 1 匹が剖検前に死亡したが、これは麻酔/採血手順に関連するものと考えられた。

B) 臨床症状

投与に起因する影響は認められなかった。

交尾前期間に、猫背の姿勢、立毛及び顔面蒼白を示した。出産の前日に、立毛と青白い外観を示したが、これらの所見の発生は本質的に偶発的なものであり、用量に関連した傾向は見られなかった。

他の偶発的な所見には、左目の混濁及び暗い外観、かさぶた及び脱毛症が含まれていたが、試験環境の範囲内で発生したもので、臨床徴候は毒性学的関連性がないと考えられた。

C) 体重及び飼料摂取量

摂取量について、影響はみられなかった。

体重について、500 mg 投与群の雄の平均体重が有意に低かった。また 500 mg 投与群の雌全てが妊娠しなかったため、体重増加が僅かであったが、この変動は妊娠していない同週齢の雌に予想されるものと同様であった。その他の体重は対照群と同様であった。

D) 血液学的検査

20～500 mg 投与群（雄）の活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）の有意な低下について、用量に関連した傾向は見られず、関連臓器毒性の場合には逆の効果が予想され、値はこの週齢及び系統のラットに範囲内に留まっていた。

赤血球の有意な上昇について、妊娠しなかったことが原因であると考えられる。同週齢で同系統の妊娠していない雌ラットで考えると正常な範囲内に留まっていた。好中球、網状赤血球数、赤血球分布幅、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球ヘモグロビン（MCH）の低下も同様と考えられることから毒性学的に関連性はないと見なされた。

E) 生化学的検査

500 mg 投与群（雌）における有意な変化について、同週齢で同系統の妊娠していない雌ラットでは正常と考えられる範囲内に留まっていたため、ラットが妊娠しなかったことが原因であると考えられた。

500mg 投与群（雄）における有意な変化について、総ビリルビン、カリウム、無機リン酸塩、ナトリウム、アルカリフォスファターゼ活性について、関連する形態学的損傷がない、又は正常範囲内に留まっていたことから、毒性学的関連性はないと考えられた。

F) 肉眼的検査

精巣及び精巣上体（両側性）について、500 mg 投与群（雄）において、8 匹でサイズの縮小及び9 匹で精巣（両側性）の弛緩が認められた。

他の肉眼的所見は、この週齢と系統のラットで見られる所見の背景範囲内で発生し、用量に関連した発生傾向を示さなかった。

G) 臓器重量

臓器重量及び体重比について、500 mg 投与群において、精巣、精巣上体、肝臓（雌）、胸腺（雌）、卵巣は有意な変化が見られた。臓器重量及び体重比のその他の有意な変化は、用量に関連した傾向がなく発生し、毒性学的関連性は認められなかった。（表 15 参照）

H) 病理学的検査

精巣及び精巣上体について、500 mg 投与群（雄）で以下の所見が認められた。

精 巣	10/10 匹での精子細胞の巨細胞（中等度：4 匹、高度：5 匹、重度：1 匹） 7/10 匹での生殖細胞の変性（軽度：1 匹、中等度：4 匹、高度：2 匹） 10/10 匹での尿細管萎縮/生殖細胞の枯渇（軽度：2 匹、中等度：2 匹、高度：4 匹、 重度：2 匹）
精巣上体	10/10 匹での精細胞残屑（中等度：5 匹、高度：4 匹、重度：1 匹） 10/10 匹での精子数減少（中程度：2 匹、高度：8 匹）

不妊娠であった 100 mg 投与群の 1 組の生殖器官について、健康な子孫を産めなかった原因となる組織病理学的変化は見られなかった。

その他確認された病理学的所見は背景病理の正常範囲内にあるとみなされた。

I) 繁殖

交尾について、500 mg 投与群（雌）において全て確認されたが、全て妊娠せず、黄体又は着床も確認出来なかった。

20 及び 100 mg 投与群においては、被験物質投与による影響はみられなかった。

（表 16 参照）

J) 発生毒性

同腹児数、生存率、性比、体重及び外部肉眼検査では、被験物質投与に関連する所見は認められなかった。

子動物のへい死について、陰性対象及び低用量群において、授乳中にへい死又は行方不明が確認された。へい死した児動物の肉眼的所見には、頭瘡、胃内のミルクの欠如及び自己融解の初期段階が含まれていた。これらの所見は、この日齢のラットにとって正常であると考えられる範囲内に留まり、被験物質投与に関連した傾向を示さなかったため、毒性学的関連性はないと考えられた。

臨床症状について、鼻面又は耳のかさぶた、青い腹部又は鼻、低体温であったことから毒性学的関連性はないと見なされた。

以上から、本試験における NOAEL は 100 mg/kg 体重/日としている。[参照 13]

表 15 3-NOP におけるラットへの影響（臓器重量）

親ラット（雄）	投与量				
	0（水）	0（プラセボ）	20	100	500
精巣（g）	3.65±0.25	3.47±0.30	3.53±0.46	3.69±0.23	2.01±0.52**
	（%）	1.03±0.06	1.01±0.08	1.04±0.13	1.06±0.09
前立腺（g）	0.642±0.103	0.643±0.088	0.661±0.151	0.584±0.124	0.597±0.052
	（%）	0.189±0.024	0.189±0.027	0.196±0.042	0.169±0.041
精巣上体（g）	1.171±0.115	1.109±0.081	1.176±0.131	1.205±0.068	0.889±0.103**
	（%）	0.330±0.032	0.323±0.031	0.347±0.039	0.344±0.027
精囊（g）	1.635±0.257	1.673±0.220	1.753±0.309	1.485±0.216	1.412±0.223
	（%）	0.485±0.073	0.492±0.064	0.521±0.082	0.430±0.085
親ラット（雌）	投与量				
	0（水）	0（プラセボ）	20	100	500
卵巣（g）	0.122±0.013	0.120±0.021	0.129±0.013	0.118±0.010	0.172±0.014**
	（%）	0.050±0.004	0.050±0.007	0.054±0.005	0.048±0.004
子宮（g）	0.574±0.111	0.454±0.049	0.554±0.087	0.534±0.089	0.543±0.126
	（%）	0.233±0.040	0.188±0.014	0.230±0.033	0.217±0.035

各値は平均値。Dunnett-test * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

表 16 3-NOP におけるラットへの影響

親ラット	投与量（雄雌）				
	0（水）	0（プラセボ）	20	100	500
交尾率（%）	100	100	100	100	100
妊娠率（%）	100	100	100	90	0
出産率（%）	100	100	100	100	0
妊娠期間（日）	21.3±0.5	21.3±0.5	21.2±0.4	21.3±0.5	注）
平均産児数	13.0±1.8	12.2±2.1	13.0±1.3	12.4±1.0	注）
子ラット	投与量（雄雌）				
	0（水）	0（プラセボ）	20	100	500
新生児の生存率（%）	100.00	99.20	100.00	100.00	注）
性比率（%）（雄の割合）	54.00	52.00	48.00	53.00	注）
生後 4 日目の生存率（%）	98.50	92.6#	98.50	100.00	注）

各値は平均値。

注）：全雌で妊娠せず

5-1-1-2-2 ラット

(1) 方法

ラット (Han Wistar 系統、雌雄、6 週齢、体重不明) を用いて、3-NOP として、0 (水)、50、100、300 mg/kg 体重/日でそれぞれ強制経口投与にて、90 日間給与した。0 及び 300 mg/kg 体重/日においては、回復期間として 13 週間飼育した。(1 群雌雄各 15 匹、0 及び 300 mg/kg 体重/日群は、回復試験用の 5 匹を含む雌雄各 20 匹)。

(2) 結果

A) へい死

投与期間において、へい死は認められなかった。

回復期間 (5 週目) において、300 mg 投与群の雄 1 例でへい死が確認された。

へい死した個体について、投与に関連した精巣及び精巣上体を除いた所見は、重度の腎病変及びその後の状態不良に関連すると考えられた。進行性慢性腎症は、自然発生的な所見として老齢ラットで高い発生率で通常観察されるものであるが、試験動物中の 1 個体のみであったことから、本事象は自然発生的なものであり、被験物質に関連したものではないと考えられた。

B) 臨床症状

投与に関連する所見は認められなかった。脱毛症、かさぶた又は傷、過剰な唾液分泌、ラ音、耳の腫れ、及び採血後の眼の変化が確認されたが、ほとんど偶発的なものであり、飼育及び試験中の週齢及び系統のラットで一般的に認められるものであった。

C) 体重及び飼料摂取量

投与に関連する所見は、認められなかった。

D) 尿検査

ケトン濃度について、300 mg 投与群 (雄) でわずかな増加がみられた。値が正常範囲内に留まっていたため、投与に関連していないと見なされた。

E) 血液学的検査

投与に関連する所見は認められなかった。

F) 生化学的検査

投与に関連する所見は認められなかった。投与群と無添加群を比較し、有意な差が見られる項目もあったが、経時的不一致や用量相関性が片性しか見られなかったことから毒性的有意性はないと考えられた。

G) 肉眼的検査

精巣及び精巣上体について、300 mg 投与群 (雄) で以下の所見が認められた。

精 巣	5/15 匹で弛緩 6/15 匹でサイズ縮小
精巣上体	4/15 匹での弛緩 5/15 匹でサイズ縮小

その他の所見はすべて、この種の研究におけるラットの通常の生物学的変動の範囲内又は雌の発情周期に関連しており、病理学的所見と相関がなかった。

H) 臓器重量

精巣及び精巣上体の重量及び体重比について、300 mg 投与群において有意な変化がみられた。投与に関連すると考えられ、回復期間後においてもその傾向は依然として顕著であった。(表 17 参照)

I) 組織学的検査

精巣及び精巣上体について、それぞれ以下のような所見がみられた。(表 18、19 参照)

精 巣	精細管変性/萎縮： 0 及び 100 mg 投与群で各 1/15 匹 300 mg 投与群の 10/15 匹で確認された。
	多核細胞： 100 mg 投与群で 1/15 匹 300 mg 投与群の雄 7/15 匹
	精細管空胞化： 300 mg 投与群の 3/15 匹
精巣上体	精細管腔の細胞残屑： 300 mg 投与群で 9/15 匹。(13 週間の回復後も最大 4/5 匹で同様の事象が確認された。)
	精子減少： 300 mg 投与群で 8/15 匹。(13 週間の回復後も最大 4/5 匹で同様の事象が確認された。)

J) まとめ

精子形成への影響から、本試験における雄の NOAEL は 100 mg/kg 体重/日としている。雌の NOAEL は、300 mg/kg 体重/日まで投与に関連する所見は観察されなかったことから、300 mg/kg 体重/日としている。

これらのことから、本試験全体での、NOAEL は 100 mg/kg 体重/日としている。
[参照 14]

表 17 3-NOP におけるラットへの影響（臓器重量）

ラット（雄）	投与量					
	0		50	100	300	
	投与期間	回復期間	投与期間	投与期間	投与期間	回復期間
精巣 (g)	3.53±0.23	3.82±0.27	3.56±0.22	3.52±0.23	2.58±0.80**	2.46±0.82**
	(%) 0.92±0.09	0.88±0.16	0.94±0.08	0.99±0.10	0.73±0.21**	0.54±0.18*
前立腺 (g)	0.557±0.096	0.877±0.344	0.571±0.120	0.535±0.158	0.516±0.093	0.706±0.234
	(%) 0.144±0.021	0.196±0.054	0.150±0.030	0.148±0.040	0.147±0.025	0.155±0.052
精巣上体 (g)	1.192±0.094	1.201±0.104	1.207±0.076	1.232±0.102	0.922±0.174**	0.881±0.208*
	(%) 0.310±0.025	0.278±0.054	0.318±0.028	0.345±0.041*	0.262±0.042**	0.193±0.044*
精囊 (g)	1.586±0.201	1.461±0.298	1.706±0.227	1.490±0.173	1.350±0.203**	1.607±0.158
	(%) 0.412±0.057	0.335±0.077	0.449±0.057	0.416±0.047	0.385±0.053	0.352±0.038
ラット（雄）	投与量					
	0		50	100	300	
	投与期間	回復期間	投与期間	投与期間	投与期間	回復期間
卵巣 (g)	0.137±0.011	0.133±0.015	0.144±0.018	0.131±0.015	0.143±0.015	0.123±0.015
	(%) 0.062±0.006	0.056±0.007	0.068±0.009	0.060±0.007	0.066±0.007	0.052±0.009

各値は平均値。

Dunnett-test * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

Steel-test + : $p < 0.05$, ++ : $p < 0.01$

表 18 3-NOP におけるラットへの影響（精巣及び精巣上体の所見（匹数））

		投与試験				回復試験	
投与量（mg/kg 体重）		0	50	100	300	0	300
n=		15	15	15	15	5	5
精巣							
・精細管変性/萎縮	軽微	1	-	1	1	1	-
	軽度	-	-	-	2	-	-
	中程度	-	-	-	1	-	-
	高度	-	-	-	4	-	1a
	重度	-	-	-	2	-	-
・精細管萎縮	軽度	-	-	-	-	-	2
	高度	-	-	-	-	-	2
・多核細胞	軽度	-	-	1	-	-	-
	中程度	-	-	-	3	-	1
	高度	-	-	-	2	-	-
	重度	-	-	-	2	-	-
・空胞化	軽微	-	-	-	1	-	-
	軽度	-	-	-	2	-	-
精巣上体							
・精細管腔細胞残屑	軽微	-	-	-	1	-	2
	軽度	-	-	-	3	-	1
	中程度	-	-	-	3	-	1a
	高度	-	-	-	2	-	-
・精子減少	軽度	-	-	-	2	-	-
	中程度	-	-	-	1	-	1
	高度	-	-	-	4	-	-
	重度	-	-	-	1	-	2a

a: へい死、と殺個体も含む

表 19 3-NOP におけるラットへの影響（精巢の運動性、精子数）

投与量（mg/kg 体重/ 日）	0		50	100	300	
	投与期間	回復期間	投与期間	投与期間	投与期間	回復期間
総検査細胞数	272±76	281±38	291±50	358±83	194±158	228±138
運動精子割合（%）	72±15	80±10	78±10	69±11	29±35**	46±46
前進精子割合（%）	34±10	50±5	34±7	30±8	12±16**	26±28
精子数（精巢、10 ⁶ /g）	23±3	22±2	22±3	21±3	10±7**	14±11
精子数（精巢上体、 10 ⁶ /g）	117±42	116±10	78±18**	96±13	48±33**	67±56

Dunnett-test * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

5-1-1-2-3 マウス

（１）方法

マウス（CByB6F1 Hybrid 系統、非トラストジェニック、雌雄、7～8 週齢、体重不明）を用いて、3-NOP として、0（水）、100、300、700 mg/kg 体重/日でそれぞれ強制経口投与にて、28 日間給与した。（1 群雌雄各 10 匹、サテライト群 6～18 匹）。

（２）結果

A) へい死

投与期間において、へい死は認められなかった。

B) 臨床症状

700 mg 投与群において、部分的閉瞼、立毛、不規則な呼吸、活動の減少、猫背の歩行及び冷感が認められた。症状は投与から 1 時間後に徴候が認められたが、一部は投与後 3 時間経過しても認められた。

300 及び 700 mg 投与群において、2 週目から投与直後より唾液分泌亢進が認められたため、20 及び 27 日目に個別の観察を行い、投与直後に 300 及び 700 mg 投与群において、過唾液分泌を伴う異常な採餌が観察された。

C) 体重及び飼料摂取量

体重について、いずれの投与群においても影響は認められなかった。

飼料摂取量について、700 mg 投与群（雄）において、無添加群と比較して減少したが、主に投与 1 週目に顕著な差があったことによるものであった。

D) 血液学的検査

赤血球数及びヘモグロビン量について、700 mg 投与群（雌）は無添加群と比較して有意に高くなった。

平均赤血球ヘモグロビン量について、700 mg 投与群（雄）は無添加群と比較して有意に高くなった。

平均赤血球容積について、300 及び 700 mg 投与群（雄）と 100、300 及び 700 mg 投与群（雌）は、無添加群より有意に低くなった。

いずれの変化も極僅かで被験物質投与の影響とはみなされなかった。

E) 生化学的検査

複数の項目において、投与群は無添加群と比較して有意な差が認められた。

これらの変化は、無添加群の変動と同様に散発的であり、マウスで一般的に観察されるばらつきであるため、生物学的変動に起因すると考えられ、被験物質投与に関連したものではない判断された。

F) 肉眼的所見

被験物質投与に関連する肉眼的所見は認められなかった。

観察された全体的な所見は、このマウスの週齢で一般的に観察される偶発的な事象であるとみなされ、無添加群と投与群で同様の発生率であったため、被験物質投与とは無関係であるとされた。

G) 臓器重量

700 mg 投与群（雄）は無添加群と比較して、腎臓体重比の増加、肝臓体重比の低下、胸腺重量の低下、胸腺体重比の低下が有意な差としてみられ、被験物質投与の影響と考えられた。

また、被験物質投与による精巣上体及び精巣への影響は確認されなかった。（表 20 参照）

H) まとめ

3-NOP を 100 及び 300 mg/kg 体重/日の用量で、1 日 1 回 28 日間経口投与しても、試験項目に関連したへい死、体重への影響、血液学及び生化学的变化、臓器重量変化、肉眼的又は顕微鏡的所見は認められなかった。

700 mg 投与群では部分的閉瞼、立毛、不規則な呼吸、活動の減少、猫背の歩行及び冷感などの顕著な臨床的徴候を誘発し、主に投与後 1 週間摂取量の減少を引き起こした。

これらの結果に基づいて、マウスにおいては 300 mg/kg 体重/日が、この試験での NOAEL としている。[参照 15]

表 20 3-NOP における親マウスへの影響 (臓器重量)

マウス (雄)	投与量 (mg/kg 体重)			
	0	100	300	700
腎臓 (g)	0.42516	0.42445	0.43384	0.45574
体重との比 (%)	1.66004	1.63748	1.68065	1.77838**
肝臓 (g)	1.31113	1.32770	1.30324	1.24229
体重との比 (%)	5.12943	5.12759	5.03572	4.85358*
脳下垂体 (g)	0.00182	0.00195	0.00190	0.00169
体重との比 (%)	0.00712	0.00750	0.00734	0.00661
前立腺 (g)	0.03165	0.03219	0.03746	0.03773
体重との比 (%)	0.12295	0.12480	0.14755	0.14753
精囊 (g)	0.26380	0.26293	0.26250	0.24167
体重との比 (%)	1.02684	1.01132	1.01716	0.94513
精巣 (g)	0.26883	0.26433	0.25427	0.25773
体重との比 (%)	1.05327	1.02030	0.98769	1.00694
胸腺 (g)	0.04689	0.04304	0.04605	0.03664**
体重との比 (%)	0.18264	0.16659	0.17846	0.14341**
甲状腺+副甲状腺 (g)	0.00328	0.00364	0.00338	0.00398
体重との比 (%)	0.01288	0.01404	0.01303	0.01557
マウス (雌)	投与量 (mg/kg 体重)			
	0	100	300	700
腎臓 (g)	0.26229	0.27046	0.28074	0.26338
体重との比 (%)	1.34275	1.41639	1.43227	1.30064
肝臓 (g)	0.98020	0.98327	1.02165	0.94896
体重との比 (%)	5.02092	5.11440	5.16920	4.67757
卵巣 (g)	0.02281	0.02248	0.01994	0.01918
体重との比 (%)	0.11655	0.11839	0.10048	0.09470
脳下垂体 (g)	0.00179	0.00179	0.00177	0.00177
体重との比 (%)	0.00922	0.00934	0.00905	0.00876
胸腺 (g)	0.06325	0.05669	0.06842	0.05600
体重との比 (%)	0.32500	0.29417	0.35262	0.27701
甲状腺+副甲状腺 (g)	0.00326	0.00315	0.00351	0.00305
体重との比 (%)	0.01679	0.01639	0.01795	0.01509

Dunnett-test * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

5-1-1-3 反復投与毒性試験（長期）

5-1-1-3-1 ラット

（１）方法

ラット（Han Wistar 系統、雌雄、5 週齢、体重不明）を用いて、3-NOP を強制経口投与にて、52 週間給与した。（1 群各 20 匹）。

雄には 0、25、50、100、300 mg/kg 体重/日で、雌には 0、50、100、600 mg/kg 体重/日の投与量とした。

雌は、交尾前は 2 週間投与し、交尾中、妊娠期及び哺育期の少なくとも 4 日間投与した。

（２）結果

A) へい死

投与期間中のへい死はなかったが、瀕死又は喉の腫れにより 3 匹と殺した。

いずれも要因は強制経口投与時の事故又は自発的事象とみなされ、3-NOP 投与とは関連は認められなかった。

B) 臨床症状

試験期間を通じて、雌雄各群 3-NOP 投与による関連する所見は示されなかった。

C) 体重及び飼料摂取量

体重について、300 mg 投与群（雄）は、無添加群に比較して低下の傾向を示したが、統計学的有意差はなく、毒性学的関連性はないと見なされた。雌においては、3-NOP 投与による体重・日間増重量の影響はなかった。

飼料摂取量について、600 mg 投与群（雌）は、無添加群と比較して有意な減少を示したことから、被験物質投与の影響と考えられた。

D) 血液学的検査、生化学的検査

一部の検査項目で有意差が認められたが、用量相関性がなく、無添加群との差が僅かでその値も正常範囲内に留まり、後期の時点では同様の変動は示さなかったことから、3-NOP 投与による影響は受けなかったとみなされた。

E) 尿検査

pH について、300mg 投与群（雄）と 100 及び 600 mg 投与群（雌）は、無添加群と比較して有意に低かった。値は正常範囲内に留まり、相関する所見がないため、毒性学的に有意ではないとみなされた。その他いずれの変化も極僅かで被験物質投与の影響とはみなされなかった。

F) 肉眼的所見

精巣の弛緩について、300 mg 投与群（雄）の 20 匹中 18 匹で認められた。

精巣の萎縮について、300 mg 投与群（雄）の 20 匹中 17 匹で認められた。

精巣上体の萎縮について、300 mg 投与群（雄）の 20 匹中 14 匹で認められた。

それ以外の肉眼的所見は、用量に関連した発生傾向を示さず、同じ週齢及び系統の正常な動物で確認される範囲内であったため、被験物質投与とは無関係と判断された。

G) 臓器重量

肝臓重量割合について、300 mg 投与群（雄）が他群に比べ有意に低くかったが、肝臓重量自体に差はなかった。また、600 mg 投与群（雌）が両項目とも他群に比べ有意に高かった。

精巣と精巣上体の重量及び重量割合について、300 mg 投与群（雄）が他群に比べ有意に低かった。

他の臓器について、差は認められなかった。（表 21 参照）

H) 組織学的検査

精巣の生殖細胞の変性/萎縮及び精巣上体の内腔の精子/細胞破片の減少について、300 mg 投与群のすべてのラットで認められた。

変性/萎縮は、中等度から重度の変性（巨細胞の形成を含む）及び一部セルトリ細胞を含むほぼすべての尿細管におけるすべての生殖細胞タイプの枯渇の特徴があった。この変性と枯渇は、細胞破片に反映され、精巣上体の内腔の精子含有量が大幅に減少し、ほぼ半数のラットで精巣上体の二次的な篩状変性が見られた。

剖検により、運動精子の割合と前進運動精子率について、300 mg 投与群は著しく減少していた。25 及び 50 mg 投与群は、前進運動精子率が有意に低くなったが、運動精子の割合に相関する影響がなく、差は極わずかであり、用量に関連する反応が見られなかったため、これらの差は 3-NOP 投与とは無関係であると考えられた。（表 22 参照）

精子の運動性について、25、50、100 mg 投与群は影響が認められなかった。

精巣及び精巣上体の総精子数について、300mg 投与群は著しく減少し、100 mg 投与群以下では差がみられなかった（表 23 参照）。

好酸性細胞質封入体について、600 mg 投与群（雌）の約半数と 100 mg 投与群（雌）の 1 匹でわずかに認められた。変性及び/又は炎症性的変化がなく、程度が微小であることに基づいて、有害事象ではないと見なされました。（表 24 参照）

I) まとめ

雄は 300 mg/kg 体重/日、雌は 600 mg/kg 体重/日の用量までは、死亡率、毒性学的に関連する臨床症状、体重の有害な変化、飼料摂取量又は臨床病理学的パラメーター（血液学、臨床生化学、尿検査）に関連していなかった。

300 mg/kg 体重/日では、精巣と精巣上体に投与による重度の形態変化がみられ、相関する所見は精子の運動性と総精子数の減少、精巣の弛緩、精巣と精巣上体のサイズ及び重量の著しい低下であった。

精子形成への影響に基づいて、雄での NOAEL は 100 mg /kg 体重/日とみなされた。毒性学的に関連する変化は認められなかったため、雌の NOAEL は 600 mg/kg 体重/日としている。[参照 16]

表 21 3-NOP におけるラットへの影響（臓器重量）

ラット（雄）	投与量（mg/kg 体重）				
	0	25	50	100	300
肝臓（g）	9.74±1.19	10.01±1.24	10.21±1.46	10.14±1.00	9.65±1.64
体重との比（%）	1.99±0.14	2.11±0.12*	2.10±0.16*	2.10±0.11	2.13±0.18**
精巣（g）	3.70±0.38	3.80±0.38	3.70±0.32	3.96±0.38	1.98±0.51**
体重との比（%）	0.76±0.08	0.81±0.12	0.77±0.08	0.82±0.09	0.44±0.12**
精巣上部（g）	1.192±0.113	1.202±0.112	1.193±0.115	1.247±0.100	0.743±0.083**
体重との比（%）	0.245±0.029	0.259±0.04	0.248±0.030	0.258±0.020	0.167±0.025**

*:p<0.05, **:p<0.01（Dunnett test）

表 22 3-NOP におけるラットへの影響（精巣の所見）

ラット（雄）	投与量（mg/kg 体重）				
	0	25	50	100	300
精巣					
変性/萎縮、管状					
中程度	-	-	-	-	1
高度	-	-	-	-	15
重度	-	-	-	-	4
精巣上部					
細胞残屑、管腔					
微小	-	-	-	-	1
軽度	-	-	-	-	8
中程度	-	-	-	-	11
精子の減少、管腔					
微小	-	1	-	-	1
高度	-	-	-	-	6
重度	-	-	-	-	13
篩状変性					
微小	-	-	-	-	4
軽度	-	-	-	-	4

表 23 3-NOP におけるラットへの影響（精巣の所見）

ラット（雄）	投与量（mg/kg 体重）				
	0	25	50	100	300
総検査細胞数	277±56	290±111	256±92	259±70	27±26**
運動精子割合（%）	79±12	70±13	74±12	79±12	4±15**
前進精子率（%）	31±8	22±6**	24±4**	29±5	0±0**
精子数（精巣、10%/g）	80.6±11.6	78.4±18.1	76.2±19.0	76.8±24.2	4.6±13.6**
精子数 （精巣上体、10%/g）	348.9±139.9	372.6±147.6	358.7±120.7	343.0±113.2	29.8±74.5**

*:p<0.05, **:p<0.01（Dunnett test）

表 24 3-NOP 投与後のラットの肝臓の所見（匹数）

ラット（雌）	投与量（mg/kg 体重）			
	0	50	100	600
検査動物数（n）	20	20	20	20
肝臓 ・好酸性細胞質封入体 微小	-	-	1	9

5-1-1-3-2 ラット

（１）方法

ラット（Han Wistar 系統、雌雄、7 週齢、体重不明）を用いて、3-NOP を強制経口投与にて、104 週間給与した。（1 群各 50 匹、暴露管理及びトキシコキネティクスのため 1 群各 5 匹）。

雄には 0、25、50、100 mg/kg 体重/日で、雌には 0、50、100、300 mg/kg 体重/日を投与量とした。

（２）結果

A) へい死

へい死がみられたが、3-NOP 投与による有意性はなかった。また、顕微鏡検査によって特定された死因又は瀕死の原因は、3-NOP 投与の関連性を示さなかった。

B) 臨床症状

雌雄各群 3-NOP 投与に関連する所見は示されなかった。

唾液分泌の亢進について、300 mg 投与群（雌）において、約半数で観察された。強制経口投与後のラットで一般的に観察されたことから、製剤の物理化学的特性に関連している可能性があるため、毒性学的重要性はないと考えられた。

円背位、立毛、嗜眠、脱毛症、皮膚又はかさぶた及び創傷の紅斑、耳又は腹部又は生殖器又は腋窩領域の腫脹、眼の変化、常同行動がみられた。これらの所見は、この週齢における生物学的変動の正常範囲内にあるとみなされ、投与との関係を示唆していないと判断した。

C) 結節と腫瘍

結節と腫瘍の発生率と分布について、3-NOP 投与に関連した影響は見られなかった。

腫瘍について、主に脇腹と頸部又は腋窩領域、又は鼠径部、生殖器及び腹部領域、あるいは背中、肩又は耳に位置していた。結節と腫瘍の発生率と分布について、通常の変動の範囲内であった。

D) 体重及び飼料摂取量

体重増加について、100 mg 投与群（雄）は、無添加群に比べ、やや停滞する期間があったが有意な差ではなく、毒性学的関連性はないと見なされた。雌においては、3-NOP 投与による増体への影響はなかった。

E) 臟器重量

臓器重量及びその割合への影響は認められなかった。

F) 肉眼的所見

十二指腸/空腸の肥厚/肥大もしくは小腸の結節について、100 mg 投与群（雌）及び 300 mg 投与群（雌）でみられた。

消化管間葉系増殖性変化について、25 mg 投与群（雄）及び 100 mg 投与群（雄）でみられた。

残りの肉眼的所見はすべて、生物学的変動の範囲内に留まったため、毒性学的に重要ではないと見なされた。確認された所見は、肺、胃及び副腎の病巣、下垂体の病巣又は変色、肝臓の病巣又は変色、肝内胆管の拡張、精巣の弛緩、精嚢の縮小、肥大した脾臓、下垂体、子宮又は皮膚の結節、肥厚及び/又は硬化した子宮頸部、肥厚した子宮、皮膚のかさぶた及び卵巣の嚢胞であった。

G) 組織学的検査

<腫瘍性所見>

消化管について、300 mg 投与群（雌）で間葉系腫瘍と間葉系細胞過形成が有意と判断された。ただし間葉系腫瘍はすべて本質的に良性で、試験中の 2 年間生存したラットも存在していた。（表 25 参照）

[REDACTED]

<非腫瘍性所見>

肝臓における軽微から軽度な好酸性細胞質封入体について、300 mg 投与群（雌）4 匹で観察された。この所見は 3-NOP 投与に関連していると考えられ、前項の反復毒性試験（5-1-1-3-1）の 600 mg 投与群（雌）の 50%でも見られた。その試験では重症度は最小限であり、肝臓に変性、炎症、又は増殖性の追加の所見がないことに基づいて、有害所見ではないと結論付けられた。

本試験では、反復毒性試験の結果を確認し、3-NOP の 2 年間の投与後でも、好酸性封入体が肝臓の変性又は増殖性変化を誘発又は誘導しないとした。（表 27 参照）

H) まとめ

雄では 100 mg/kg 体重/日まで、雌では 300 mg/kg 体重/日までの用量で生存に影響はなかった。さらに臨床的に特筆すべき症状はなく、被験物質投与群のラットは正常な体重増加及び飼料摂取を示した。

一方、小腸における間葉系細胞腫瘍の発生率について、300 mg 投与群（雌）は有意な増加であった。増殖挙動に基づいて、この腫瘍性所見は有害であると考えられた。しかし腫瘍は本質的に良性であり、2 年間の投与期間を生き延びた雌でのみ観察され、全般的に体調に影響を与えていなかった。本研究で観察された他のすべての腫瘍性所見は、本質的に偶発的であるか、又は試験施設の過去の管理データ内に留まっていた。

非腫瘍性所見については、300 mg 投与群の雌数匹の肝細胞における微小また僅

かな細胞質封入体に限定され、3-NOP 投与に関連しているが有害事象ではないと考えられた。

結論として、雄及び雌で 100 mg/kg 体重/日の用量まで 2 年間の投与で発がん性を示さなかった。NOAEL について、雄では高用量で投与に関連する所見が認められなかったため、100 mg/kg 体重/日とし、雌では高用量（300 mg/kg 体重/日）群での腸の腫瘍性変化を考慮して、NOAEL を 100 mg/kg 体重/日としている。[参照 17]

表 25 3-NOP 投与による雌ラットにおける消化管間葉系腫瘍及び過形成の発生状況（匹）

	0 mg	50 mg	100 mg	300 mg
検査動物数 (十二指腸/空腸)	48/48	50/49	47/47	49/49
(1) 消化管間葉系腫瘍	0	0	1	4 ^{#, @}
(2) 間葉系細胞過形成	0	1	0	2
(1)、(2)合算	0	1	1	6 ^{#, @}

#：まれな腫瘍（ペアワイズ比較、 $p < 0.10$ ），@：まれな腫瘍（傾向分析、 $p < 0.05$ ）

表 27 3-NOP 投与後の雌ラットの肝臓の所見（匹数）

	① 0 mg	③ 50 mg	④ 100 mg	⑤ 300 mg
検査動物数 (n)	50	37	50	49
好酸性細胞質封入体				
軽微	-	-	-	3
軽度	-	-	-	1

5－1－2 特殊毒性試験

5－1－2－1 世代繁殖試験

（1）方法

ラット（Han Wistar 系統、雌雄、5 週齢、体重不明）を用いて、3-NOP を強制経口投与にて、表 28 のとおり給与した。（1 群雄雌各 24 匹、子世代の 600 mg/kg 体重群のみ雌を 10 匹）。

表 28 世代繁殖試験の試験条件

		投与量 (mg/kg 体重)	
		0、25、50、100	600
子 (F1、2)	雄	生育期 71 日、交配期最長 21 日	—
	雌	生育期 71 日、交配期最長 21 日、妊娠期 21 日、哺育期 21 日	生育期 14 日、交配期最長 21 日、妊娠期 21 日、哺育期 21 日
親 (F0、1)	雄雌	離乳後準備期間 21 日及びその後は、子世代の試験設定に準ずる。	

(2) 結果

A) 一般症状

F1 世代の 600 mg 投与群の雌 3 匹で、投与開始 1～2 日目に無気力、平らな姿勢、非規則な動き及び/又は立毛が見られた。授乳中に立毛と青白い外観を示した 1 匹を除いてその後回復した。

F0 及び F1 世代において、100 mg/kg 体重/日投与群まで毒性学的に関連する臨床症状は認められず、他の臨床的兆候は、明らかな用量関連の傾向を示さず、この日齢及び系統のラットに予想される背景所見の範囲内で発生した。観察された発生率では、これらは投与とは無関係であると見なされた。

B) へい死

F0 及び F1 世代において、投与期間中被験物質投与の影響に関連するへい死はなかった。

C) 体重

F0 及び F1 世代において、100 mg/kg 体重/日投与までの雌雄の体重及び体重増加に対する被験物質投与の影響はなく、同様な成長を示した。F1 世代の 600 mg/kg 体重/日投与群では、投与開始の週に 10 匹中 5 匹で投与に関連していると考えられるわずかな体重減少（最大 3%）が認められた。

また 600 mg/kg 体重/日投与群の哺育 14 日目において無添加群と比べ有意に低い体重増加率は 600 mg/kg 体重/日投与群の平均母体重自体が大きく、また正常範囲内であったため、毒性学的に関連があるとは見なされなかった。

D) 飼料摂取量

F0 及び F1 世代において、雌雄とも被験物質投与期間中の飼料摂取量の影響はなかった。600 mg/kg 体重/日投与群において哺育期間中の平均摂取量が他の群より低い値を示したが有意な差ではなかった。

E) 肉眼的所見

すべての肉眼的所見は本質的に自然発生的であると考えられ、投与に関連する所見はなかった。

F) 臓器重量

F0 及び F1 世代において、最高用量レベル（雄 100 mg/kg 体重/日、雌 600 mg/kg

体重/日) までで、毒性学的に関連する所見は認められなかった。

無添加群と比較し、統計的に有意性を示した臓器重量の違いは偶発的であると見なされ、用量相関に関連する傾向がない場合に発生した。従ってこれらの変動は、毒性学的に関連性がないと見なされた。(表 31 参照)

G) 組織学的検査

F1 世代において、雌の脾臓重量に有意な違いが認められた。0、100、600 mg/kg 体重/日投与群より選抜した 10 匹を検査した結果、被験物質投与に関連する病理組織学的変化は認められなかった。その他組織においても無添加群と投与群の間で特質すべき違いは認められなかった。

F0 世代において、100 mg/kg 体重/日投与群まで被験物質投与に関連した病理組織学的変化は認められなかった。

H) 繁殖能力

F1 世代において、無添加群の 3/24 組、25 mg/kg 体重/日投与群の 2/24 組、50 mg/kg 体重/日投与群の 7/24 組、100 mg/kg 体重/日投与群の 4/24 組、600 mg/kg 体重/日投与群の 2/10 組のペアが発情又は妊娠しなかった。

F0 世代において、無添加群の 3/24 組、25mg/kg 体重/日投与群の 1/24 組、50 mg/kg 体重/日投与群の 2/24 組のペアが発情又は妊娠しなかった。

以上は、被験物質投与に起因すると考えられる雌雄の生殖器の形態学的所見は認められなかった。

I) 精子の運動性、濃度及び形態

F0 世代において、精子の運動性、濃度、及び形態は正常範囲内であり、最大投与量である 100 mg/kg 体重/日まで無添加群と同等であった。

F1 世代において、100 mg/kg 体重/日投与群でみられた有意な精巣精子数の減少は、精子数の値が低かった 3 匹に起因するものであった。この精子数は、無添加群の 3 匹の値と同程度であった。従って精子の運動性、濃度、及び形態は、100 mg/kg 体重/日までの投与による影響はないとみなされた。(表 33,38 参照)

J) 生殖

F1 世代において、1～5 匹が妊娠しなかったが 600 mg/kg 体重/日の投与までは、交尾率、妊娠率、出産率、妊娠期間及び平均産児数に投与による影響はないとみなされた。(表 34 参照)

F0 世代において、無添加群の 3 匹、50 mg/kg 体重/日投与群の 1 匹が妊娠せず、25 mg/kg 体重/日投与群の 1 匹が交尾しなかったが、100 mg/kg 体重/日の投与までは、交尾率、妊娠率、出産率、妊娠期間及び平均産児数に投与による影響はないとみなされた。(表 29 参照)

K) 児動物の発達

<生存率>

F0 世代の児動物 (F1) 及び F1 世代の児動物 (F2) において、出生 4 日及び 21 日後の生存率に投与に関連する影響はなかった。

主な死亡の原因は共食いであり、それ以外の死亡動物の肉眼的検査では、いず

れも、このタイプの研究で使用されたラットで見られた範囲内にとどまり、用量相関性は見られなかったため、毒性学的に関連があるとは見なされなかった。(表 30、35 参照)

<性比>

被験物質投与の影響はみられなかった。(表 30、35 参照)

<肛門性器間距離>

F0 世代の児動物(F1)の 50 mg/kg 体重/日投与群の雌雄及び F1 の児動物(F2)の 100 mg/kg 体重/日投与群の雄において、距離が僅かに大きく、有意に高い値を示した。また、児動物(F2)の 50 mg/kg 体重/日投与群の雌において、距離が有意に減少した。

これら変化は極僅かであり、用量反応がないこと、値は正常範囲内であることから毒性学的に関連があるとはみなされなかった。(表 30、35 参照)

<臨床症状>

青色又は黒色の斑点/変色、かさぶた、鱗屑、脱毛症、冷たい又は痩せた外観、傷、目からの赤い分泌物、尾の先端の欠如、呼吸困難及びあえぎが散見された。これらの臨床徴候の性質と発生率は、この日齢のラットにおいて正常であると考えられる範囲内にとどまり、したがって、毒性学的に関連があるとは見なされなかった。

<肉眼的所見>

共食い、自己消化、胃内乳の欠如、尾の先端の青色化、腎臓の腎盂拡張又は無形成、脾臓の縮小、肝臓の横隔膜ヘルニアが散見された。ただしこれらの所見の性質と発生率は、考慮された範囲内にとどまり、したがって、毒性学的に関連があるとはみなされなかった。

<臓器重量>

F0 世代の児動物(F1)において、臓器重量(脳、胸腺、脾臓)への影響はなかった。一方で、F1 世代の児動物(F2)の脾臓において、25 mg/kg 体重/日投与群の雄の重量及び体重比、50 mg/kg 体重/日投与群の雌雄の重量、10 mg/kg 体重/日投与群の雌雄の重量及び体重比が無添加群に比べ有意に低かった。ただし、形態学的所見は観察されなかったため、投与に起因する有害事象ではないと考えられた。(表 31、36)

L) 総合結果

<生育>

F0 世代(雌)の 600 mg/kg 体重/日投与群において、臨床的兆候及び投与初期の体重減少が認められた。2 世代の親動物のパラメーターのいずれにおいても、100 mg/kg 体重/日の投与まで毒性学的に関連する変化は認められなかった。

<生殖>

試験した最高用量レベルまで、両世代で生殖毒性は観察されなかった。調査された生殖パラメーターのいずれにも投与に関連する変化は認められなかった。

<発生>

最高用量レベルまで、両世代で発生毒性は観察されなかった。F2 の児動物の脾臓重量の減少が認められたが、病理組織学的所見は観察されなかったことから有害ではないとみなされた。調査された他の発達パラメーターのいずれにも投与に関連する変化は認められなかった。

これらの結果に基づき、親の無毒性量 (NOAEL) は 100 mg/kg 体重/日であると確立された。生殖及び発生の NOAEL は、2 世代にわたって少なくとも 100 mg/kg 体重/日、F0 世代の雌では少なくとも 600 mg/kg 体重/日であると確立された。[参照 18]

表 29 親ラット (F0) における 3-NOP の影響 (一般状態)

F0 世代					
	投与量 (mg/kg 体重/日)				
	0	25	50	100	600
交尾率 (%)	23/24(95.8)	24/24(100)	24/24(100)	24/24(100)	10/10(100)
妊娠率 (%)	23/23(100)	22/24(91.7)	19/24(79.2)	23/24(95.8)	9/10(90.0)
出産率 (%)	22/23(95.7)	22/22(100)	18/19(94.7)	23/23(100)	8/9(88.9)
妊娠期間 (日)	21.5±0.5	21.3±0.6	21.4±0.6	21.6±0.6	21.3±0.5
平均産児数	10.2±2.5	10.5±2.6	10.1±2.9	11.0±3.1	10.3±3.3

表 30 子ラット (F1) における 3-NOP の影響 (一般状態)

F1 世代							
			投与量（mg/kg 体重/日）				
			0	25	50	100	600
新生児生存率			99.10	98.70	99.50	97.20	97.60
性比率（雄の％）			52.40	54.30	50.50	47.20	50.00
生 存 率 （％）	生後 4 日 目	雄雌	98.20	99.10	98.30	95.50	98.80
	生後 21 日 目	雄雌	97.60	99.40	100.00	100.00	98.30
肛 門 性 器 間距離	（平均値）	雄	2.67	2.68	2.68	2.89	2.66
	（中央値）		2.67	2.65	2.65	2.80++	2.62
	（平均値）	雌	0.83	0.85	0.82	0.92	0.86
	（中央値）		0.81	0.81	0.83	0.92++	0.86

検定 1. Dunnett-test *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ 検定 2. Steel-test +: $p < 0.05$, ++: $p < 0.01$

注 1) : 生育期間 2 週間

表 31 親ラット (F0) における 3-NOP の影響 (臓器重量)

性別 : 雄		投与量 (mg/kg 体重/日)				
		0	25	50	100	—
脳	(g)	2.03	2.03	2.00	2.03	—
	(%)	0.51	0.53	0.51	0.52	—
下垂体	(g)	0.011	0.011	0.01	0.011	—
	(%)	0.003	0.003	0.003	0.003	—
肝臓	(g)	11.39	11.03	10.94	11.30	—
	(%)	2.88	2.83	2.78	2.88	—
甲状腺	(g)	0.017	0.016	0.017	0.016	—
	(%)	0.004	0.004	0.004	0.004	—
腎臓	(g)	2.56	2.55	2.51	2.55	—

	(%)	0.65	0.66	0.64	0.65	—
副腎	(g)	0.047	0.047	0.049	0.048	—
	(%)	0.012	0.012	0.012	0.012	—
脾臓	(g)	0.608	0.578	0.595	0.582	—
	(%)	0.154	0.149	0.151	0.149	—
精巢	(g)	3.43	3.67	3.58	3.53	—
	(%)	0.87	0.95*	0.91	0.9	—
前立腺	(g)	0.568	0.574	0.576	0.573	—
	(%)	0.144	0.148	0.147	0.146	—
精巢上体	(g)	1.145	1.208	1.157	1.147	—
	(%)	0.289	0.312*	0.295	0.293	—
精囊	(g)	1.715	1.704	1.582	1.71	—
	(%)	0.434	0.44	0.402	0.438	—
性別：雌		投与量 (mg/kg 体重/日)				
		0	25	50	100	600
脳	(g)	1.84	1.84	1.87	1.84	1.89
	(%)	0.72	0.73	0.74	0.71	0.66
下垂体	(g)	0.014	0.013	0.013	0.014	0.012
	(%)	0.005	0.005	0.005	0.005	0.004
肝臓	(g)	10.40	10.35	9.94	10.86	11.36
	(%)	4.08	4.07	3.90	4.15	3.93
甲状腺	(g)	0.014	0.013	0.014	0.014	0.014
	(%)	0.006	0.005	0.005	0.005	0.005
腎臓	(g)	1.92	1.92	1.87	1.92	2.06
	(%)	0.76	0.76	0.74	0.74	0.72
副腎	(g)	0.065	0.066	0.068	0.069	0.07
	(%)	0.026	0.026	0.027	0.027	0.024
脾臓	(g)	0.484	0.481	0.505	0.528*	0.563
	(%)	0.19	0.19	0.2	0.205	0.196
卵巢	(g)	0.132	0.123	0.131	0.136	0.139
	(%)	0.052	0.049	0.052	0.052	0.048
子宮	(g)	0.484	0.565	0.651*	0.499	0.511
	(%)	0.192	0.225	0.264*	0.192	0.178

表 32 子ラット (F1) における 3-NOP の影響 (臓器重量)

性別：雄		投与量 (mg/kg 体重/日)				
		0	25	50	100	600
脳	(g)	1.47	1.46	1.48	1.46	1.52
	(%)	2.87	2.95	2.91	2.82	2.63
胸腺	(g)	0.227	0.218	0.232	0.216	0.245
	(%)	0.44	0.437	0.451	0.416	0.422
脾臓	(g)	0.275	0.256	0.266	0.271	0.311
	(%)	0.53	0.513	0.518	0.514	0.533
性別：雌		投与量 (mg/kg 体重/日)				
		0	25	50	100	600
脳	(g)	1.42	1.45	1.44	1.43	1.47
	(%)	2.85	2.95	2.95	2.81	2.7
胸腺	(g)	0.239	0.233	0.236	0.235	0.243
	(%)	0.476	0.473	0.481	0.46	0.446
脾臓	(g)	0.277	0.245	0.262	0.266	0.28
	(%)	0.552	0.497	0.533	0.517	0.51

表 33 親ラット (F0、雄) における 3-NOP の影響 (精巣)

性別：雄	投与量 (mg/kg 体重/日)			
	0	25	50	100
総検査細胞数	265±99	292±99	314±141	282±107
運動精子 (%)	69±21	69±19	69±15	71±13
前進運動精子 (%)	34±12	37±11	35±10	39±9
精子数 (精巣) (10 ⁵ /g)	19.6±2.9	—	—	19.4±2.4
精子数 (精巣上体) (10 ⁵ /g)	130.4±46.5	—	—	128.2±27.9
正常体 (個)	160±12	—	—	163±15
頭部欠損 (個)	4±3	—	—	3±2
頭部異常 (個)	5±3	—	—	4±4
尾部 (渦巻き状) (個)	28±12	—	—	28±15
尾部 (それ以外) (個)	2±2	—	—	2±2
中片部異常 (個)	1±1	—	—	1±1
結合 (個)	0±1	—	—	0±0

表 34 親ラット (F1) における 3-NOP の影響 (一般状態)

投与量 (mg/kg 体重)	雄	0	25	50	100
	雌	0	25	50	100
動物数	雄	24	24	24	24
	雌	24	24	24	24
交尾率 (%)		24/24	23/24	24/24	24/24
妊娠率 (%)		21/24	23/23	23/24	24/24
出産率 (%)		21/21	23/23	22/23	24/24
妊娠期間 (日)		21.6±0.5	21.6±0.6	21.3±0.5	21.4±0.5
平均産児数		10.2±2.10	10.2±2.11	10.2±2.12	10.2±2.13

表 35 子ラット (F2) における 3-NOP の影響 (一般状態)

F2 世代						
投与量 (mg/kg 体重/日)						
			0	25	50	100
新生児生存率			98.00	99.20	99.60	100.00
性比率 (雄の%)			51.2	50.80	50.20	50.40
生存率 (%)	生後 4 日目	雄雌	99.60	99.60	99.60	100.00
	生後 21 日目	雄雌	96.50	98.90	100.00	100.00
肛門性器間 距離	(平均値)	雄	2.56	2.55	2.58	2.66
	(中央値)		2.58	2.58	2.61	2.67++
	(平均値)	雌	0.97	0.96	0.87	0.96
	(中央値)		0.91	0.92	0.85++	0.87
臨床症状			結果を参照 (毒性学的に投与に関連する特筆すべき徴候なし)			
肉眼的病理検査			結果を参照 (毒性学的に投与に関連する特筆すべき徴候なし)			

表 36 親ラット (F1) における 3-NOP の影響 (臓器重量)

性別: 雄		投与量 (mg/kg 体重/日)			
		0	25	50	100
脳	(g)	2.01	2.03	2.04	2.02
	(%)	0.54	0.53	0.51*	0.52
下垂体	(g)	0.01	0.011	0.011	0.01
	(%)	0.003	0.003	0.003	0.003
肝臓	(g)	10.66	11.25	11.90**	11.1
	(%)	2.81	2.92	2.96*	2.86
甲状腺	(g)	0.017	0.017	0.018	0.017
	(%)	0.005	0.004	0.005	0.004
腎臓	(g)	2.5	2.6	2.67	2.55

	(%)	0.07	0.67	0.66	0.66
副腎	(g)	0.05	0.049	0.051	0.048
	(%)	0.013	0.013	0.013	0.012
脾臓	(g)	0.578	0.61	0.62	0.586
	(%)	0.153	0.158	0.154	0.151
精巢	(g)	3.71	3.82	3.8	3.61
	(%)	0.99	0.99	0.95	0.93
前立腺	(g)	0.631	0.63	0.658	0.641
	(%)	0.167	0.164	0.164	0.165
精巢上体	(g)	1.195	1.235	1.202	1.179
	(%)	0.318	0.321	0.3	0.305
精囊	(g)	1.559	1.651	1.673	1.592
	(%)	0.414	0.429	0.417	0.413
性別：雌		投与量 (mg/kg 体重/日)			
		0	25	50	100
脳	(g)	1.88	1.89	1.9	1.89
	(%)	0.73	0.72	0.73	0.73
下垂体	(g)	0.015	0.015	0.014	0.014
	(%)	0.006	0.006	0.005	0.006
肝臓	(g)	10.97	11.75	11.18	11.79
	(%)	4.19	4.47	4.31	4.55*
甲状腺	(g)	0.016	0.013*	0.015	0.015
	(%)	0.006	0.005**	0.006*	0.006
腎臓	(g)	1.98	2.01	1.94	1.98
	(%)	0.76	0.77	0.75	0.77
副腎	(g)	0.065	0.069	0.069	0.067
	(%)	0.025	0.026	0.027	0.026
脾臓	(g)	0.518	0.545	0.547	0.515
	(%)	0.199	0.208	0.212	0.199
卵巢	(g)	0.122	0.124	0.135	0.116
	(%)	0.047	0.047	0.052	0.045
子宮	(g)	0.581	0.577	0.538	0.538
	(%)	0.229	0.221	0.21	0.207

表 37 子ラット (F2) における 3-NOP の影響 (臓器重量)

性別：雄		投与量 (mg/kg 体重/日)			
		0	25	50	100
脳	(g)	1.47	1.47	1.47	1.47
	(%)	2.79	3	3.03	3
下垂体	(g)	0.231	0.239	0.214	0.222
	(%)	0.433	0.471	0.437	0.45
肝臓	(g)	0.294	0.245**	0.245**	0.230**
	(%)	0.554	0.475**	0.502	0.466**
性別：雄		投与量 (mg/kg 体重/日)			
		0	25	50	100
脳	(g)	1.46	1.43	1.46	1.42
	(%)	2.88	2.96	3.14	3.04
下垂体	(g)	0.223	0.237	0.219	0.218
	(%)	0.443	0.483	0.481	0.46
肝臓	(g)	0.278	0.255	0.238*	0.228*
	(%)	0.552	0.522	0.507	0.478*

表 38 親ラット (F1、雄) における 3-NOP の影響 (精巣)

性別：雄	投与量 (mg/kg 体重/日)			
	0	25	50	100
総検査細胞数	228±76	221±90	227±85	208±91
運動精子 (%)	74±16	70±19	64±23	73±16
前進運動精子 (%)	54±16	51±19	45±18	54±16
精子数 (精巣) (10 ⁵ /g)	21.8±2.8	—	—	19.4±2.9**
精子数 (精巣上体) (10 ⁵ /g)	102.5±21.9	—	—	93.2±22.4
正常体 (個)	170±16	—	—	168±17
頭部欠損 (個)	3±2	—	—	2±2
頭部異常 (個)	0±0	—	—	0±1
尾部 (渦巻き状) (個)	24±14	—	—	27±16
尾部 (それ以外) (個)	2±2	—	—	2±2
中片部異常 (個)	1±1	—	—	1±1
結合 (個)	0±1	—	—	0±0

検定 1. Dunnett-test * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

5-1-2-2 発生毒性試験

5-1-2-2-1 マウス

反復毒性試験（5-1-1-2-1）の項で結果を記載。

5-1-2-2-2 ラット

（1）方法

ラット（Han Wistar 系統、雌雄、5～10 週齢、体重不明）を用いて、3-NOP を 0、100、300、1000 mg/kg 体重/日で強制経口投与により、交配後 6～20 日間給与した。

（1 群雌各 22 匹）

（2）結果

A) 暴露評価

交配後 20 日目に 11 匹の親動物及びその胎児から 3-NOP 投与 1 時間後の血液を採取し、血漿中のニトロオキシプロピオン酸（NOPA）を測定した。

無添加群から極僅かの NOPA が検出されたが、原因については不明であった。

一方 3-NOP 投与群においては用量相関的に母体及び胎児の血漿中 NOPA の増加が認められた。（表 39 参照）

B) へい死

試験期間中のへい死はなかった。

C) 臨床症状

1000 mg 投与群において 1 回以上の無気力、平らな姿勢、円背位、協調性のない動き及び/又は立毛の臨床症状を示した。これらの症状のいくつかは経口投与直後に認められ、ほとんどの場合投与 1 時間後に観察されたが、一部投与 1.5～5 時間後まで観察された。

D) 体重

交尾後の 1000 mg 投与群の平均体重について、無添加群に比べ有意に低かった。

また体重増加量も交尾後以降に 1000 mg 投与群が無添加群に比べ有意に低かった。

E) 飼料摂取量

1000 mg 投与群において、交尾後で無添加群に比べ有意に低かったが、交尾後 15 日目以降に回復を示した。

F) 肉眼的検査

剖検では、各群で肉眼的異常は認められなかった。

G) 親動物の検証

各群交尾した全ての雌が妊娠していた。流産や早産の兆候は見られなかった。黄体の数、着床数、生存又は死亡した胎児、早期又は後期の吸収、又は着床前又は着床後の喪失、平均胎児重量には、3-NOP 投与に関連した変化はなかった。（表 40 参照）

H) 胎児の検証

100 mg 投与群（雌）及び 1000 mg 投与群（雄）の胎児で四肢の回転異常が認められ、1000 mg 投与群の雄は臍帯ヘルニアを伴っていた。1000 mg 投与群（雌）は頭の頭蓋領域がなく、無脳症であった。これらの奇形は個々の胎児に限定されていた。

たため、偶然の発見と見なされ、3-NOP 投与とは関係ないとされた。

各群の胎児で軟部組織異常は認められなかった。

3-NOP 投与群の胎児で観察された骨格異常は、肋骨異常 (100 mg 投与群の雄)、肋骨異常を伴う又は伴わない脊椎異常 (1000 mg 投与群の雌)、胸骨破損 (1000 mg 投与群の雄) 及び脊椎異常 (1000 mg 投与群の雄) であった。単一の発生であったため、これらの奇形は偶然の発見と見なされ、3-NOP 投与とは関係ないとされた。

骨格の変化に毒性学的に関連する影響はなかったが、痕跡状過剰肋骨頸部の発生率は、無添加群の胎児と比較した場合、1000 mg 投与群で増加したが、関連するパラメーターは影響を受けなかったため、毒性学的に関連するとは見なさなかった。

3-NOP 投与群で見られた残りの骨格変化はまれで且つ用量相関を示さず、無添加群と同頻度又は利用可能な過去の管理データの範囲内であった。

I) まとめ

母体毒性は 1000 mg/kg 体重/日投与で観察された。半数で 1 回以上無気力、平らな姿勢、円背位、協調性のない動き、及び/又は立毛を示した。さらに投与を通じて体重及び増加量の減少が観察され、投与の前半で飼料摂取量が減少した。100 及び 300 mg/kg 体重/日投与群では母体毒性は観察されなかった。

胎児では 100、300、1000 mg 投与群で発生毒性は観察されなかった。

結論として、この出生前発生毒性試験の結果に基づいて、3-NOP の母体の NOAEL は 300 mg/kg 体重/日であり、発生毒性の NOAEL は少なくとも 1000 mg/kg 体重/日としている。[参照 19]

表 39 発生毒性試験における 3-NOP の影響 (血漿)

		投与量 (mg/kg 体重/日)			
		0	100	300	1000
NOPA 含量 (nmol/mL)	親 (F0)	0.0483±0.0373	14.908±16.880	339.67±250.12	1930.7±674.57
	児 (F1)	0.0801±0.1211	41.565±34.958	450.17±239.88	1958.4±567.39

表 40 発生毒性試験における 3-NOP の親動物 (F0) への影響 (母体部検)

	投与量 (mg/kg 体重/日)			
	0	100	300	1000
n 数	22	22	22	22
胎児総数 (平均/一腹)	261 (11.9±2.19)	279 (12.7±1.43)	273 (12.4±2.06)	258 (11.7±2.39)
雌：雄の比 (%)	125 : 136 (47.9 : 52.1)	147 : 132 (52.7 : 47.3)	120 : 153 (44.0 : 56.0)	131 : 127 (50.8 : 49.2)
死亡胎児	0	1	0	0
吸収 早期	10	8	14	11
後期	1	0	0	0
着床後死亡	11	9	14	11
着床数	272	288	287	269
黄体	289	299	296	284
着床前喪失	17	11	9	15
胎児体重	3.6±0.29	3.5±0.23	3.6±0.23	3.5±0.37

5-1-2-2-3 ウサギ

(1) 方法

ウサギ (ニュージーランドホワイト系統、雌、15~17 週齢、体重不明) を用いて、3-NOP を 0、50、150、450 mg/kg 体重/日で強制経口投与により、交配後 6~29 日間給与した。(1 群雌各 22 匹)

(2) 結果

A) 暴露評価

交配後 29 日目に 11 匹の母体及びその胎児から 3-NOP 投与 1 時間後の血液を採取し、血漿中の NOPA を測定した。

3-NOP 投与群においては用量相関的に母体及び胎児の血漿中の NOPA の増加が認められた。(表 41 参照)

B) へい死

試験期間中のへい死はなかった。

一方で、衰弱、強制経口投与時の事故、流産が原因でと殺した。これらの事象はこの種の試験で使用された動物で見られた範囲内に留まり、用量相関性が見られなかったため、いずれも毒性学的に関連があるとは見なされなかった。

C) 臨床症状

毒性学的に関連する臨床的症状は観察されなかった。投与期間中に認められたすべての臨床症状は、この週齢及び系統のウサギの背景所見の範囲内で発生し、明らかな用量相関性が示されなかった。症状の発生率では、3-NOP 投与とは無関係であると見なされた。

D) 体重

3-NOP 投与による影響を受けなかった。

E) 飼料摂取量

450 mg 投与群の交尾後において、無添加群と比較し有意な減少した。また、50 及び 150 mg 投与群の交尾後において、無添加群と比較し有意な増加がみられた。これは、一時的で且つ用量相関を示さなかったため、毒性学的に関連があるとは見なされなかった。

F) 肉眼的検査

試験項目に関連する肉眼的所見はなかった。

G) 母体の検証

0、50、150、450 mg 投与各群で妊娠していない個体が各 1、2、1、1 匹いた。

着床数と生存可能な胎児の数は 150 mg 投与群で僅かに少なく、また母体あたりの平均着床数が無添加群と比較し有意に低かったが、値は正常範囲内であり、用量相関性が認められなかったため、3-NOP 投与に関連したとは見なされなかった。

(表 42 参照)

H) 胎児の検証

各群 1 匹ずつ外部異常が確認されたが、これらの奇形は個々の胎児に限定されており、小さな上顎を除くすべてケースが過去の対照胎児で見られたため、それらは偶然の発見と見なされ、投与に関連していないとされた。

軟部組織異常について、150 mg 群の同腹児の 7 匹において正中肝葉が変形していた。同じ異常は、50 mg 群の胎児でも認められたが、偶然の発症であり、投与に関連していないとされた。

胸骨片癒着として、450 mg 群において、重度の配列異常及び尾側椎骨異常がみられた。同様の癒着は過去の対照胎児でも発生したため、投与に関連していないとされた。

骨格の変化のうち、450 mg 群での胸骨の配列異常の軽度から中程度の一腹あたりの発生割合が無添加群に比べ有意に高い値を示したが、過去の管理上限を下回っていたため、投与に関連していたとは見なされなかった。

I) まとめ

ウサギに対する 50、150、450 mg /kg 体重/日の投与で、母体及び胎児に毒性学的に関連する毒性は観察されなかった。結論として、本試験における 3-NOP の母体及び発生の NOAEL は少なくとも 450 mg/kg 体重/日としている。[参照 20]

表 41 発生毒性試験における 3-NOP の影響（暴露評価）

		投与量 (mg/kg 体重/日)			
		0	50	150	450
NOPA 含量 (nmol/mL)	親 (F0)	<0.04	0.8±0.3	7.5±3.2	235.6±122.8
	児 (F1)	<0.04	1.1±0.6	21.3±7.7	279.5±116.8

検出限界値：0.04 nmol/mL

表 42 発生毒性試験における 3-NOP の親動物 (F0) への影響 (母体部検)

	投与量 (mg/kg 体重/日)			
	0	50	150	450
n 数	21	19	19	19
胎児総数 (平均/母体)	207 (9.9±2.10)	174 (9.2±2.41)	153 (8.1±2.91)	171 (9.0±2.43)
雌 : 雄 (%)	100 : 107 (48.3 : 51.7)	86 : 88 (49.4 : 50.6)	81 : 72 (52.9 : 47.1)	74 : 97 (43.3 : 46.7)
死亡胎児	1	0	0	0
吸収 早期	8	6	10	14
後期	9	2	0	1
着床後喪失	18	8	10	15
着床数 (平均/母体)	225 (10.7±2.17)	182 (9.6±2.09)	163 (8.6±2.71*)	186 (9.8±2.30)
黄体	234	188	176	199
着床前喪失	9	6	13	13
胎児体重	38.1±5.52	39.7±5.03	37.9±5.90	36.8±4.75

0 mg/kg 投与群に対し統計的有意差あり (* : p<0.05, Dunnett test)

5-1-2-3 発がん性試験

反復毒性試験 (長期) (5-1-1-3) の項で結果を記載。

5-1-2-4 変異原性試験

表 43 変異原性試験結果

分類	試験	対象	用量	結果	参照
<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験 ①	<i>Salmonella</i> Typhimurium TA98、TA100、 TA1535、TA1537 <i>E. coli</i> WP2 <u>uvrA</u>	52～5000 µg/ml (+/-S9)	陰性	21
	復帰突然変異試験 ②	<i>Salmonella</i> Typhimurium TA98、TA100、 TA1535、TA1537 <i>E. coli</i> WP2 <u>uvrA</u>	52～5000 µg/ml (+/-S9)	陰性	22
	遺伝子突然変異試験	マウスリンパ腫細胞	0.55～1211 µg/mL (+/-S9) 3 又は 24 時間処理	陰性	23

	小核試験	ヒト末梢血リンパ球	0～1211 µg/ml (+/-S9) 3 時間処理後 27 時間培養 及び 24 時間処理後 24 時 間培養	陰性	24
<i>in vivo</i>	小核試験	ラット骨髓細胞（骨髓 液）	ラット雌雄各 5 匹 0、375、750、1500 mg/kg 体重投与 24 又は 48 時間後	陰性	25

変異原性試験では、*in vitro* 系で細菌を用いた復帰突然変異試験、げっ歯類の細胞を用いた遺伝子変異試験とヒトの組織を用いた小核試験が実施された。結果はいずれの試験も代謝活性系の有無にかかわらず陰性であった。また、*in vivo* 系において、ラットを用いた小核試験が実施され、陰性であった。（表 43 参照）。

したがって、3-NOP には生体に影響する変異原性は認められないと判断された。

5-1-3 その他の毒性試験（精巣毒性の補足）

5-1-3-1 ラット

（1）方法

ラット（Wister Han 系統、雄、12～13 週齢、体重不明）を用いて、3-NOP、NOPA 及び 3-ヒドロキシプロピオン酸（HPA）を表 44 のとおり、10 日間給与した。（1 群雌各 5 匹）

表 44 世代繁殖試験の試験条件

対照群	生理食塩水 投与方法：静脈内注射
3-NOP 投与群	物質：3-NOP 投与方法：経口投与 投与量： ・ 1 日目 1000 mg/kg 体重/日 ・ 2 日目以降 800 mg/kg 体重/
NOPA 投与群	物質：NOPA 投与方法：静脈内注射 投与量： ・ 425 mg/体重 kg/日
HPA 静脈投与群	物質：3-ヒドロキシプロピオン酸（HPA） 投与方法：静脈内注射 投与量： ・ 1～2 日目 350 mg/kg 体重/日 ・ 3 日目 250 mg/kg 体重/日

HPA 皮下投与群	投与物質：3-ヒドロキシプロピオン酸（HPA） 投与方法：皮下注射 投与量： ・ 350 mg/kg 体重/日
-----------	--

（２）結果

A) へい死

HPA 静脈投与群の 1 匹が試験 3 日目に死亡した。同群内の他のラットも重篤な臨床症状に基づいて試験 3 日目の投与前後で 4 匹と殺した。

B) 臨床症状

対照群において、症状は見られなかった。

3-NOP 投与群において、1 日目に活動低下、衰弱、立毛が見られた。重篤な臨床症状に基づいて、2 日目以降から 800 mg/kg 体重/日に投与量を減らした。2～5 日目の間に、すべての個体が立毛、衰弱、活動の低下又は亢進などの兆候を示し続け、剖検の日には過敏症が記録された。液状便と円背姿勢も見られた。

NOPA 投与群において、臨床症状は 1～4 日目に最も顕著であり、症状には活動低下、立毛、衰弱、その後の回復が含まれていた。9 日目から、皮膚の腫れや変色（紫や赤）などの尾における局所的な影響が 5 匹中 3 匹で記録された。

HPA 静脈投与群において、2、3 日目にすべての個体で活動亢進、毛の逆立ち、円背姿勢、皮膚蒼白がみられた。3 日目に見られた所見は閉眼、眼からの分泌物、眼の乾燥した赤い物質、衰弱、呼吸数の減少又は不規則性、鼻孔の赤い皮膚、オレンジ色の尿があった。本投与群は試験 3 日目に試験を終えた。

HPA 皮下投与群において、9 日目から立毛 5 匹中 2 匹でみられた。すべての個体で試験後半から注射部位の局所刺激による皮膚の肥厚が明らかに見られた。

C) 体重、増体重

3-NOP 投与群は、対照群と比較して、試験最終日の増体重が有意に減少していた。いくつかの個体では体重の減少が試験を通じてみられた。

NOPA 投与群は、対照群と比較して、試験を通じて増体重が 2/5 匹で減少していた。

HPA 静脈投与群は、試験開始時と比較して、体重が 3 日目のと殺前にやや減少していた。

HPA 皮下投与群は、体重減少が試験期間を通じて最小であった。

D) 飼料摂取量

3-NOP 投与群、NOPA 投与群及び HPA 皮下投与群は、対照群と比較して、1～5 日目の飼料摂取量の差は見られなかった。

HPA 皮下投与群は、5～10 日目の飼料摂取量は減少していた。

HPA 静脈投与群は、通常と比較して飼料摂取量は顕著に減少していた。

E) トキシコキネティクス評価

10 日目において、投与後の血清中 3-NOP、NOPA 及び HPA 濃度を測定し、最

高血中濃度 ($C_{\max}$)、最高血中濃度に達するまでの時間 ($t_{\max}$)、血中濃度－時間曲線下面積 (AUCs) 及び消失半減期 ($t_{1/2}$) を算出した。

＜対照群＞

3-NOP 濃度について、検出限界以下であった。

NOPA 濃度について、一つのサンプルにおいて低濃度で検出されたが、偶発的な事象であるとみなされた。HPA 濃度は平均で $0.17 \mu\text{g/mL}$ であった。

＜3-NOP 投与群＞

3-NOP 濃度について、投与後すぐに血中濃度が上昇した。 $C_{\max}$ は、投与後 0.25 時間 (5-15 分) で到達した。

最終測定時点 (T_{last1}) について、投与 1 時間後であり、3-NOP は吸収後速やかに除去された。

$t_{1/2}$ について、1 匹で正確に測定でき、0.318 時間 (約 19 分) であった。いくつかの $t_{1/2}$ は相関係数 r^2 が 0.8 以下であったが、 $t_{1/2}$ 算出に用いたタイムスパンが算出された半減期の 2 倍以下であったので採用しなかった。加えていくつかの $t_{1/2}$ は対数線形回帰ができなかったため算出できなかった。

3-NOP の経口投後、代謝物 NOPA が速やかに形成され、投与 1 時間後に最高濃度達した。これに続いて、投与 2 時間後に代謝物 HPA が最高濃度に達した。 AUC_{last} (投与前から最終測定時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積) に関して、NOPA 及び HPA の全身曝露は 3-NOP と比較して高く、NOPA は 4 倍、HPA は 9 倍であった。NOPA 及び HPA の半減期はそれぞれ平均で 3.9 時間及び 3.6 時間であった。

＜NOPA 投与群＞

NOPA 投与群では 1 匹で静脈投与が困難であったため皮下投与を行った。NOPA 曝露に関しては、静脈投与では 0 時間 (C_0)での外挿された平均血中濃度は $7430 \mu\text{mol/L}$ で、 AUC_{last} として表される平均全身曝露は $5950 \text{ h} \cdot \mu\text{mol/mL}$ であった。NOPA の半減期は 0.213 時間 (約 13 分間) で速やかに血中から取り除かれた。全身のクリアランスは平均で $0.0723 \text{ mg/h} \cdot \mu\text{mol/L/kg}$ ($\sim 535 \text{ mL/h/kg}$) で、 V_{ss} として表される定常状態での分布量は、平均で $0.0437 \text{ mg}/(\mu\text{mol/L})/\text{kg}$ ($\sim 324 \text{ mL/kg}$) であった。これは NOPA がゆっくり除去され、高度に体内に分布する物質であることを示す。HPA 曝露に関しては、NOPA 静脈及び皮下投与後、最高血中濃度は投与後 1～2 時間で記録された。静脈及び皮下投与後の $C_{\max}$ 及び AUC_{last} については同等であった。投与 6～24 時間後の HPA 濃度は内在性 HPA 濃度 (対照群では $0.124 \sim 0.214 \mu\text{g/mL}$) に向かって減少した。[参照 26]

5-1-3-2 生物種比較

(1) 方法

ラット (Wister Han 系統、雄、22 日齢、体重不明)、イヌ (ビーグル系統、雄、7.5 ヶ月齢、体重不明)、サル (カニクイザル系統、雄、3.5 才齢、体重不明) の組織を用いて、表 45 のとおり FACS 解析及び遺伝子発現解析にて実施した。

表 45 精巣毒性の試験条件

	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]	[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED] [REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]	[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]
 [REDACTED]
 [REDACTED]
 [REDACTED]

(2) 結果

[illegible]

[REDACTED]

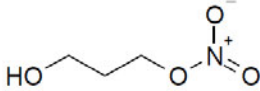
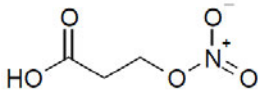
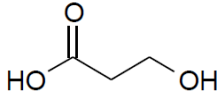
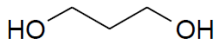
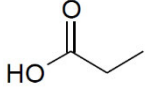
E) まとめ

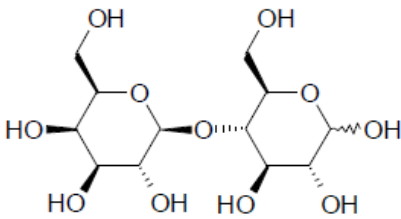
本試験によりラット、イヌ及びサルの精巣精細管の初代培養細胞はセルトリ細胞数および遺伝子発現に関して、NOPA に対して異なる反応を示すことが確認された。[参照 27]

5-1-4 生体内動態に関する試験

以下、ラット（5-1-4-1 及び 5-1-4-2）及び反芻動物（5-1-4-3 及び 5-1-4-4）の生体内動態試験で同定された 3-NOP の代謝物について、表 46 に示す。

表 46 3-NOP の生体内代謝物一覧

代謝物 No.	構造式	物質名
M1		3-ニトロオキシプロパノール (3-NOP)
M2		3-ニトロオキシプロピオン酸 (NOPA)
M3		
M4		
M5		
M6		
M7		3-ヒドロキシプロピオン酸 (HPA)
M8		1,3-プロパンジオール
M9		プロピオン酸

M10		
M11		
M12		
M13		Lactose (乳糖)
M14		オキセタン (トリメチレンオキシド)

5-1-4-1 ラット

(1) 方法

ラットを用いて、3-NOP を添加した以下の 3 試験を表 47 のとおり実施した。

表 47 生体内動態に関する試験条件（ラット）

	動物種	投与物質	用量	測定項目	参照
試験①	ラット（Wister Han 系統、雄、8 週齢、301g） 1 群各 4 匹	3-NOP (^{14}C を指標)	505 mg/kg 体重	血液、糞尿、臓器/細胞/内容物、-	28
試験②	ラット（Wistar Han 系統、雄・7 週齢（233g）、雄・8 週齢（265g）） 1 群雄各 4 匹	3-NOP (^{14}C を指標)	506 mg/kg 体重	-、糞尿、臓器/細胞/内容物、呼吸	29
試験③	ラット（Wister Han 系統、雄、6 週齢、302g） 1 群各 3 匹	3-NOP (^{14}C を指標)	505 mg/kg 体重	血液、糞尿、臓器/細胞/内容物、-	30

(2) 結果

(A) 血漿

^{14}C の回収率について、投与 1 時間後に最大値を示した後は急速な減少を示し、血漿中の残留性が低いことが示された。

代謝物について、3-NOP は投与 1 時間後に 1.0% と極僅か検出されたがその後消失した。NOPA (M2) 及びその代謝物である HPA (M7) が多く検出されたが、両物質とも量的には時間経過と共に大幅に減少していった。

(B) 糞尿

^{14}C の回収率について、糞中では尿に比べ低い値に留まった。また糞尿からの回収率は 24 時間以降大幅に減少した。

尿中の代謝物について、HPA (M7) が高い割合で検出された。また時間と共に未同定の代謝物の割合が増加していく傾向が見られた。

(C) 臓器

^{14}C の回収率について、投与 1 時間後より検出されたが、時間経過と共に大幅に減少していった。

代謝物について、HPA (M7) の割合が高かったが時間と共に減少していった。未同定物質の割合が高く、一部時間と共に増加していく物質も認められたが、総量としては時間と共に減少していった。

胃腸の内容物中について、胃では投与 3 時間以内は 3-NOP が高い割合で検出されたが、小腸、盲腸及び大腸では極僅か又は検出されず、代わりに HPA (M7) の増加が認められた。さらに、盲腸及び大腸ではプロピオン酸 (M9) が多く検出され、消化管内に

においても投与直後から 3-NOP は代謝の影響を受けていることが示された。

(D) 呼吸

^{14}C の回収率について、投与 24 時間以内に大部分回収され、ほとんどが CO_2 であることが確認された。また、 CO_2 への代謝は非常に速く、回収された約 73% が投与後 8 時間で放出された。

(E) まとめ

糞尿、組織、内容物及び呼吸の結果について、3-NOP は、投与直後から速やかに吸収され、全身に行き渡ることが示された。3-NOP は代謝を受け、投与 24 時間後にはほぼ痕跡していなかった。また投与された 3-NOP の 77.5% が 24 時間以内に呼吸より CO_2 として排出され、各組織中の代謝物も時間経過と共に大幅に減少していくことから、非常に残留性に低い物質であることが確認された。[参照 28,29,30]

5-1-4-2 ラット

(1) 方法

ラットを用いて、3-NOP を投与した以下の 3 試験を表 48 のとおり実施した。

表 48 生体内動態に関する試験条件 (ラット)

	動物種	投与物質	用量	測定項目	参照
試験①	ラット (Wister Han 系統、雄雌、11~12 週齢、176~398g) 雄雌各 4 匹	3-NOP (^{14}C を指標)	50 mg/kg 体重 単回経口強制投与	血液、糞尿、臓器/細胞/内容物、呼吸	31
試験②	試験④と同ラット 雄雌各 4 匹		500 mg/kg 体重 単回経口強制投与	血液、糞尿、臓器/細胞/内容物、呼吸	
試験③	試験④と同ラット 雄雌各 2 匹		500 mg/kg 体重 単回経口強制投与	血液、-、臓器/細胞/内容物、-	
試験④	試験④と同ラット 雄雌各 4 匹		50 mg/kg 体重 一日 1 回 5 日間連続経口強制投与	-、糞尿、臓器/細胞/内容物、呼吸	

(2) 結果

試験④の雄 1 匹が、4 日目に低体温、硬直、飼料摂取量の低下が見られたため、と殺し、細胞を採取した。

放射性物質質量について、低用量・高用量の単回投与試験を比較すると、用量相関的な

傾向を示した。また、投与からと刹までの時間が異なる試験を比較すると、値は大幅に減少していた。そのうち排泄物は、3-NOP 相当量に換算すると、24 時間ごとにほぼ排出が完了し、投与後 8 時間以内に大部分が排泄されたことが示された。

回収率について、投与後 1 時間で回収された放射性物質のうち大部分が臓器・細胞及び胃腸内内容物より回収されたが、投与後 48 時間では、大部分が呼気及び糞尿から排出されており、体内残留が非常に僅かであることが示された。また雌雄において吸収・排泄・残留に特異的な差がないことが確認された。

(3) まとめ

^{14}C を指標とした 3-NOP の経口投与後、各用量又は複数回の投与で、放射性標識の大部分が呼気を通じて排出されていることが確認された。残りの放射能の大部分は尿を介して排泄され、糞便からは少量回収された。

回収された放射能の大部分は、投与後最初の 8 時間以内に消失していた。試験終了時の放射性物質は各実験動物の体内に代謝物の形で保持されていた。[参照 31]

5-1-4-3 反芻動物 (*in vitro*)

(1) 方法

3 種の家畜のいずれかのルーメン液を用いた試料（ルーメン液：2.5 mL、試験飼料：100 mg、バッファー：7.5 mL、水：2.8～3.4 μL ）に、3-NOP (^{14}C を指標) を 1 試料あたり 1 mg 添加し、39°C で 16 時間培養した。各試験は、表 49 のとおり実施した。

表 49 生体内動態に関する試験条件（ラット）

	動物種	前処理	反復数
試験①	羊：セグレナ、雌、4 頭、52±3.1 kg、4 才 ヤギ：Murciano-Granadine、雌、4 頭、45±2.9 kg、4 才 牛：ホルスタイン、雌、4 頭、422±29.1、3 才	嫌気性 条件（密閉）	2 回実施。 各畜種 3 反復
試験②		非生物系条件 （オートクレーブ 処理）	2 回実施。 各畜種 1 反復
試験③		好気性 条件（解放）	2 回実施。 各畜種 1 反復

(2) 結果

オートクレーブ処理によって細菌の影響を取り除いた場合、3-NOP は代謝を受けることはなかった。一方、嫌気性条件（ルーメン環境下）では、3-NOP の残留はわずかで、1,3-プロパンジオール (M8) 又はオキセタン (M14) として検出された。また、好気性条件下では、3-NOP 自体は 28～39% 存在するものの残りは 1,3-プロパンジオール (M8) として検出され、硝酸エステル基を加水分解する酵素活性が嫌気性条件より低

いことが示された。

以上より、3-NOP は反芻動物のルーメン内の嫌気性条件では 16 時間以内に硝酸エステル基が完全に加水分解されることが示された。一方、オキセタンは、サンプルの処理又は保管によって生成された可能性が排除出来ず、オキセタンの生物学的意義と、中間体と思われる代謝物画分との相関関係は解明できないとされた。[参照 32]

5-1-4-4 反芻動物 (*in vivo*)

(1) 方法

ヤギ及びウシを用いて、3-NOP (^{13}C 又は ^{14}C を指標) を投与し、生体内動態について確認した。各試験は、表 50 の条件で実施した。

表 50 生体内動態に関する試験条件 (ラット)

	動物種	投与量	投与期間	測定項目	参照
試験①	ヤギ (Saanen、雌、3.5 才、49.5kg), 1 頭	4.34 mg/kg 体重 (111.7 mg/kg 乾物飼料相当)	7 日間	血液、乳/ 尿、糞、臓器	34
試験②	ヤギ (Saanen、雌、3.75 才、61kg), 1 頭	3.28 mg/kg 体重 (101.8 mg/kg 乾物飼料相当)	5 日間：非標識 3-NOP 2 日間：標識 3-NOP	血液、乳/ 尿、糞、臓器	35
試験③	乳牛 4 頭 1) フリーシアン (2 才 3 か月、530kg) 2) エアシャー (2 才 11 か月、548kg) 3) フリーシアン (2 才 1 か月、524kg) 4) エアシャー (2 才 0 か月、428kg)	1.8 g/kg 頭/日 (135~195 mg/kg 乾物飼料相当)	8 日間	血液、乳/ 尿、糞、臓器、呼気	36

(2) 結果

血漿中の放射性物質の推移について、放射性物質は投与直後より上昇し、ヤギでは 0.5 時間後に、乳牛では 1 時間後最大値を示した後、減少に転じ、それぞれ 24 時間後に 1/4 以下及び 8 時間後に約 1/2 に減少したが、再投与でそれぞれ上昇した。ヤギでは、日毎に上昇する傾向が見られ、前日からのキャリーオーバー分の影響と思われた。

乳牛の血漿中の代謝物は、3-NOP は検出されなかった。NOPA (M2) が検出されたが、時間経過と共に検出されなくなった。同様にヤギにおいて、血漿からタンパク質を分画した水相を分析した結果、0.5 時間後には大幅に減少していた。一方、血漿タンパ

ク質画分では、投与後 24 時間後に大幅に増加した。このことから、血漿タンパク質への取り込みによる影響が示唆された。水相の代謝物として、3-NOP 又は NOPA は、検出されなかった。

糞/尿について、ヤギ及び乳牛において、回収率は低い値で推移した。

尿中の代謝物について、ヤギにおいて 3-NOP (M1) や NOPA (M2) の検出はなく、また、乳牛において、1 頭から若干の 3-NOP が検出されたが、ヤギ同様に他の物質に代謝され排出されていた。

乳について、ヤギにおいて投与 8 時間以内に乳からの回収が認められ、乳からの回収率はヤギより乳牛の方が高い値を示したが、放射線量では近似していた。

乳を乳脂肪・乳たん白質及び水相に分離し測定したところ、ヤギ及びウシとも水相より大部分の放射性物質が回収された。また、4. 1. 対象家畜等を用いた残留試験において、乳中に NOPA が検出されたが、今回各試験の乳汁中からは 3-NOP 及び NOPA は定量限界又は検出限界値以下であった。

水相の代謝物について、各試験とも乳糖（ラクトース、M13）が含まれていた。ウシにおける乳中の乳糖割合及びラクターゼによりこの代謝産物を切断した結果、放射性標識がガラクトース及びグルコース部分に取り込まれていた。

ヤギの乳脂肪について、初回採取で平均 19.8%の放射性指標が取り込まれていた。残りの放射性物質（水溶性及び脂肪画分を差し引いた後）は、乳たん白質画分より抽出されないままであった。このことから、非水溶性放射物質は既にたん白質に組み込まれていると考えられた。

臓器/細胞について、各試料について抽出を行い、水相も測定試料とした。

肝臓及び腎臓の液相について、回収された放射性物質はほぼグルコースであり、3-NOP 又は NOPA は検出されなかった。また、肝臓及び腎臓の固相をプロテアーゼで処理した画分を測定したところ、各臓器中の半分程度の占める放射性物質が回収され、3-NOP 又は NOPA は検出されなかった。このことから、3-NOP が代謝を受け、既に部分的にたん白質に取り込まれていると想定された。

筋肉及び脂肪の液相について、総じて微量であり、3-NOP 及び NOPA も定量限界値以下であった。筋肉の固相について、プロテアーゼ処理して測定したところ、たん白質への取り込みが想定された。

呼気について、ウシにおいて、3 及び 15 回目投与後に 10 分間呼気を回収し分析した結果、 88.7 ± 47.4 及び $74.2 \pm 48.4 \mu\text{g/kg}$ 相当が CO_2 として回収された。

以上より、3-NOP はマウス同様に速やかに体内に取り込まれ、体内移行することが確認された。乳からの放射性物質の検出が確認され、主要な代謝物はグルコースと同定され、3-NOP の残留は認められなかった。体内組織への蓄積率は低く、主な残留物はグルコースであり、3-NOP の残留は認められなかった。実験動物同様に 70～80%が CO_2 に代謝され、排出されていると想定された。

（3）まとめ

3-NOP は、主に CO_2 だけでなく、炭水化物、アミノ酸、脂肪酸などの天然物質に効率的に代謝される。生体内代謝では、アルコールの酸化と NO_3 エステルの加水分解

を介して、内因性生体化合物 HPA と無機 NO_3 を生成する。あるいは、ルーメン内嫌気条件下で加水分解され、1,3 - プロパンジオール (M8) と無機 NO_3 になる。1,3 - プロパンジオールは、さらに HPA に酸化されます。HPA は、プロパノイル - CoA 又はアセチル - CoA の合成のための基質として哺乳動物細胞によって使用され、結果 CO_2 として排出される。[参照 33、34、35]

5-1-5 毒性の考察

神経毒性が疑われる症状について、

ラット・マウス・ウサギ・イヌの投与試験において、特異的な臨床症状を示さなかったウサギを除き、各試験の高用量で観察された臨床徴候は、神経筋機能（無気力、協調運動の乱れ、異常な歩行など）及び自律神経機能（立毛、低体温、呼吸困難、流涎、嘔吐等）に関連していた。

神経学的徴候が高用量レベルで観察され、体重の大幅な減少や体温の低下などの毒性の明らかな徴候と関連している場合、それらが直接的な神経毒性作用である可能性は低くなる。

ラット・マウスで観察された唾液分泌は、物質の味や刺激性によると判断した。また、各試験で脳の絶対重量は対照群と違いがなかった。

ラット、マウス及びイヌでは、脳、目（視神経を含む）、坐骨神経及び脊髄をヘマトキシリン・エオジン染色して光学顕微鏡検査した結果、異常は観察されなかった。

さらに、精巢毒性のメカニズム調査のため実施したメタボローム解析の際に、血漿メタボロームプロファイル/パターンをデータベース上の神経系に影響を与える物質のメタボロームパターンと照らし合わせた結果、いずれのパターンにも該当しなかった。

これらの評価に基づいて、「神経毒性の可能性について 3-NOP でのさらに試験する必要はないとする。」と報告されている。[参照 33]

5-2 対象家畜等を用いた飼養試験

5-2-1 牛

(1) 方法

牛（ホルスタイン、雌、齢不明、体重不明）を用いて、3-NOP をそれぞれ 85、450、850 mg/kg 飼料（それぞれ 1.6、8.0、16.0 g/頭/日）で添加した飼料を 90 日間給与した（1 群 4 頭、4 反復）。

(2) 結果

(A) へい死

450 mg/kg 飼料投与群において、試験開始時より著しい飼料摂取の低下等の理由により 1 匹をと殺した。また 850 mg/kg 飼料投与群においても、著しい飼料摂取の低下、健康悪化が見られ、獣医師の診断により低カルシウム血症が疑われたため、獣医師の診断により 1 匹をと殺した。

(B) 臨床症状

へい死個体以外で投与に起因する症状は認められなかった。

飼料摂取量について、850 mg/kg 飼料投与群でばらつきがみられ、特に急激な減少は試験開始直後であったため、3-NOP 添加によるルーメン内の水素増大による影響と考えられたが、その後摂取量は徐々に回復した。

(C) 体重

と殺体を除いた 3-NOP 投与群において、維持又は若干の体重増加傾向が見られ、3-NOP による影響がないことが示された。

(D) 乳産生量

すべての個体の乳量はいずれも一般的なパターンに従い、試験開始時から 92 日目にかけて減少していった。これは分娩日から離れるにつれて予想されることであった。450 mg/kg 飼料投与群の平均乳量が 7 日目と 8 日目にそれぞれ 17.0 kg と 16.7 kg と低い値を示したが、これは健康状態の悪化により早期に安楽死させられた個体の影響によるもので、これを除くと平均 19.5 kg 及び 20.9 kg となった。

(E) 便の性状

便の性状に群間差はなかった。

(F) 尿検査

健康上の問題を示唆するような異常は認められなかった。化学検査と顕微鏡検査の両方において、8 日目の 85 及び 450 mg/kg 飼料投与群のそれぞれ 1 個体の比重の項目を除いて、投与期間中の全ての尿検査パラメーターにおいて対照又は投与前の範囲内にあった。比重はそれぞれ 1.039 と 1.040 とわずかな増加で、一過性のものであり、その他の変化とは関連していなかったため、試験項目の投与又は臨床的に関連しているとは見なされなかった。

(G) 血液学的検査・生化学的検査

以下のパラメーターで、無添加群と投与群の間、又は投与×時間の相互作用で有意な値が観察されたため、個々に臨床的関連性評価を行った。

- ・平均赤血球容積

個々の値は、ほとんど基準範囲内のあり、用量レベルとの明確な相関関係が欠如していたので、投与に関連した又は臨床的に関連しているとは見なされなかった。

- ・平均ヘモグロビン量

個々の値は、ほとんど基準範囲内のあり、用量レベルとの明確な相関関係が欠如していたので、投与に関連した又は臨床的に関連しているとは見なされなかった。

- ・単球数

基準値外について、2 個体では 1 日だけ認められたが、軽度の感染に起因すると判断された。また、別の 1 個体は繰り返し低い値を示したが、この動物の乳房炎の顕著な再発による可能性がある。平均値には、用量レベルとの明確な相関関係がなかったため、投与に関連しているとは見なされなかった。

- ・好塩基性球数

個々の値は、ほとんど基準範囲内のあり、用量レベルとの明確な相関関係が欠如していたので、投与に関連した、又は臨床的に関連しているとは見なされなかった。

- ・プロトロンビン時間

基準値外について、8.0 g 群の 2 個体では 8 日目で認められた。そのうち、1 個体の異常値は僅かの差であり有害とは見なされなかった。もう 1 個体は 9 日目に福祉上の理由により安楽死させられたため、この外れ値は、動物の健康状態に関連しているとは見なされた。

- ・活性化部分トロンボプラスチン時間

基準値外について、1.6 g 投与群の 1 個体では、8 日目に認められた。その他の個々の値は、ほとんど基準範囲内のあり、用量レベルとの明確な相関関係が欠如していたので、投与に関連した又は臨床的に関連しているとは見なされなかった。

- ・フィブリノゲン

基準値外について、基準値を超える値が 4 例と、下回る値が 1 例確認された。基準範囲外のすべての値は、本質的に散発的であり、投与に関連しているとは見なされませんでした。

- ・アラニンアミノトランスフェラーゼ

試験前及び終了後を通して比較的一定のままであった。30 日目または 90 日目の検査では、無添加群と投与群との間で統計的に有意な差は確認されなかったため、平均値の差は、投与に関連した又は臨床的に関連しているとは見なされなかった。

- ・乳酸脱水素酵素

基準値外について、8.0 g 投与群の 2 個体が基準値を下回った。個々の値は、ほとんど基準範囲内のあり、用量レベルとの明確な相関関係が欠如していたので、投与に関連した又は臨床的に関連しているとは見なされなかった。

- ・総たん白

基準値外について、16 g 投与群の 1 個体が 30 日目に基準値を下回った。その他の個々の値は、ほとんど基準範囲内のあり、用量レベルとの明確な相関関係が欠如していたので、投与に関連した又は臨床的に関連しているとは見なされなかった。

- ・塩化物

個々の値について、基準範囲内にあり、投与群と無添加群の間で統計的に有意な差は確認されなかった。従って、投与に関連しているとは見なされず、臨床的に関連しているとは見なされなかった。

- ・アルブミン

基準値外について、8.0 g 投与群の 1 個体では 8 日目に基準値を下回った。これは乳房炎と診断され、健康な牛と比較して乳房炎の牛はアルブミン濃度が低いと考えられている。個々の値はほとんど基準範囲内のあり、用量レベルとの明確な相関関係が欠如していたので、投与に関係なく、健康上の問題によるものと見なされた。

- ・トリグリセリド

個々の値はほとんど基準範囲内のあり、用量レベルとの明確な相関関係が欠如していたので、投与に関連した、又は臨床的に関連しているとは見なされなかった。

- ・ハプトグロビン

基準値外について、1.6 g 群の 4 個体で基準値を下回り、そのうちの 1 個体では軽度の貧血を示唆するがこの動物には他の臨床徴候は存在しなかった。8.0 g 群の 1 頭は基準値を上回り、乳房炎による炎症と関連している可能性があるため、健康状態によるものと考えられた。個々の値はほとんど基準範囲内のあり、用量レベルとの明確な相関関係が欠如していたので、投与に関連した、又は臨床的に関連しているとは見なされなかった。

(H) 肉眼的検査

肝臓で 3 例、腎臓で 2 例所見が確認された。8.0 g 投与群の唯一の異常所見は個体 No.15 に関連したもので、試験 9 日目の安楽死処分後の剖検では、左腎盂の顕著な拡張、中等度の間質性腎線維症及び顕微鏡で見られる腎リンパ球浸潤と相関していた。巨視的には脾臓に単一の 70×45×30 mm の嚢胞が観察され、癒着した脾臓の腸間膜脂肪の膿瘍と一致する化膿性炎症性病巣と微視的に相関していた。組織学的検査では、肝実質に微細の混合炎症細胞浸潤が見られた。これらの病理所見を総合すると、全身性細菌感染症が疑われ、この動物の臨床所見を説明できるとされた。

試験 24 日目に安楽死処分された 16 g 投与群の個体 No.1 では、首の皮下組織はゼラチン状で、肝臓の硬化、暗赤色した腸間膜リンパ節及び第四胃と粘膜と漿膜網の暗赤化が確認された。肉眼的所見から、この動物の臨床症状の原因を特定することは出来なかった。

試験項目に実質関連する所見は認められなかった。観察された全体的な所見は、この年齢の乳牛で一般的に観察される性質の偶発的なものであり、無添加群と投与群で同様の発生率であったため、3-NOP 投与 とは無関係であると見なされました。

(I) 臓器重量

と体に対する臓器重量のわずかな違いには統計的有意性がなく、用量レベルとの明確な関係がなかった。従って臓器重量の違いは偶発的であり、被験物質投与とは無関係であると考えられた。

(J) 病理学的検査

ほとんどの組織病理学的所見は、この年齢と系統の乳牛では一般的とされた。最も多

かった所見 (n = 9) はリンパ系の細胞分布密度の低下であったが、対象が成体動物であり、さまざまな程度の腸間膜や胸腺のリンパ系細胞分布密度の低下は予想され、重要ではないとされた。

5 頭の動物で筋線維に住肉胞子虫を有し、ルーメン内に混合炎症細胞浸潤を有していた。組織病理学的評価を行った獣医病理学者の意見では、被験物質投与に関連する顕微鏡所見は考えられないとされた。

(K) まとめ

n 数が少ない点に考慮が必要とされたが、試験を終了した個体では被験物質投与に関連する臓器重量の違い、肉眼的所見又は顕微鏡的所見は観察されなかったことからプロピレングリコール及び無水ケイ酸で希釈された 3-NOP 10% 含有製剤を飼料に添加推奨量 (85 mg/kg 飼料) の 5 倍及び 10 倍を混餌し、90 日間投与された場合十分に許容されると結論付けられた。

この試験で解析された動物、血液、乳汁、組織のパラメーターに長期的な影響がないことから、申請者は少なくとも添加推奨量 (85 mg/kg 飼料) の 5 倍の安全マージンがあると判断した。[参照 10]

6 審議結果

3-NOP の効果安全性について審議した。

「飼料の栄養成分その他の有効成分の補給」を本剤の効果とし、飼料に添加することは適当であると判断された。

①本剤の効果：飼料の栄養成分その他の有効成分の補給

②給 与 対 象：牛

③添加上限値：3-NOP として 0.015%

6 参照（参考文献及び参考資料）

1. SCIENTIFIC OPINION: Safety and efficacy of a feed additive consisting of 3-nitrooxypropanol (Bovaer® 10) for ruminants for milk production and reproduction (EFSA Journal(2021) 19(11):6905)
2. A. Romero-Pérez, E.K. Okine, L.L. Guan, S.M. Duval, M. Kindermann, K.A. Beauchemin: Effects of 3-nitrooxypropanol on methane production using the rumen simulation technique (Rusitec), Animal Feed Science and Technology 209 (2015) 98–109
3. A. Romero-Pérez, E.K. Okine, L.L. Guan, S.M. Duval, M. Kindermann, K.A. Beauchemin: Effects of 3-nitrooxypropanol and monensin on methane production using a forage-based diet in Rusitec fermenters, Animal Feed Science and Technology 220 (2016) 67–72
4. J. Guyader, E.M. Ungerfeld, K.A. Beauchemin: Redirection of Metabolic Hydrogen by Inhibiting Methanogenesis in the Rumen Simulation Technique (RUSITEC), Frontiers in Microbiology, March 2017 Volume 8, 393
5. DSM 社社内資料：PIVOTAL EFFICACY STUDY IN DAIRY CATTLE FED WITH 3-NITROOXYPROPANOL (3-NOP)（オランダ）
6. DSM 社社内資料：PIVOTAL EFFICACY STUDY IN DAIRY CATTLE ADMINISTERED WITH 3-NITROOXYPROPANOL (3-NOP) IN FEED（英国）
7. DSM 社社内資料：PIVOTAL EFFICACY STUDY IN DAIRY CATTLE ADMINISTERED WITH 3-NITROOXYPROPANOL (3-NOP) IN FEED（米国）
8. G. Yu, K.A. Beauchemin, R. Dong: A Review of 3-Nitrooxypropanol for Enteric Methane Mitigation from Ruminant Livestock, Animals 2021, 11, 3540
9. H. Kim, H.G. Lee, Y-C. Baek, S. Lee, J. Seo: The effects of dietary supplementation with 3-nitrooxypropanol on enteric methane emissions, rumen fermentation, and production performance in ruminants: a meta-analysis, J Anim Sci Technol 2020;62(1):31-42
10. DSM 社社内資料：A Pilot Target Animal Safety Study in Dairy Cattle Administered with PDMN Orally in Feed
11. DSM 社社内資料：A Pivotal Tolerance Study in Dairy Cattle Administered with 3-Nitrooxypropanol (3-NOP) Orally in Feed
12. DSM 社社内資料：ASSESSMENT OF ACUTE ORAL TOXICITY WITH DSM073738 IN THE RAT (ACUTE TOXIC CLASS METHOD)
13. DSM 社社内資料：COMBINED 28-DAY REPEATED DOSE TOXICITY STUDY WITH THE REPRODUCTION/DEVELOPMENTAL TOXICITY SCREENING TEST OF DSM073738-2 IN RATS BY ORAL GAVAGE
14. DSM 社社内資料：90 DAY ORAL GAVAGE TOXICITY STUDY WITH DSM073738 FOLLOWED BY AN 13-WEEK RECOVERY PERIOD IN WISTAR RATS
15. DSM 社社内資料：A 28-Day Range-Finding Study of DSM073738 by the oral

- (gavage) route in Wild Type CByB6F1-Tg (HRAS)^{2Jic} Mice
- 16.DSM 社社内資料 : 52-Week Oral Gavage Toxicity Study with DSM073738 in Wistar Rats
 - 17.DSM 社社内資料 : 2-Year Carcinogenicity Study with DSM073738 in Wistar Rats by Daily Oral Gavage
 - 18.DSM 社社内資料 : TWO-GENERATION REPRODUCTION TOXICITY STUDY OF DSM073738 IN RATS BY ORAL GAVAGE
 - 19.DSM 社社内資料 : PRENATAL DEVELOPMENTAL TOXICITY STUDY OF DSM073738 IN RATS BY ORAL GAVAGE
 - 20.DSM 社社内資料 : PRENATAL DEVELOPMENTAL TOXICITY STUDY OF DSM073738 IN RABBITS BY ORAL GAVAGE
 - 21.DSM 社社内資料 : EVALUATION OF THE MUTAGENIC ACTIVITY OF DSM073738 IN THE SALMONELLA TYPHIMURIUM REVERSE MUTATION ASSAY AND THE ESCHERICHIA COLI REVERSE MUTATION ASSAY (Project 505028)
 - 22.DSM 社社内資料 : EVALUATION OF THE MUTAGENIC ACTIVITY OF DSM073738 IN THE SALMONELLA TYPHIMURIUM REVERSE MUTATION ASSAY AND THE ESCHERICHIA COLI REVERSE MUTATION ASSAY (Project 509240)
 - 23.DSM 社社内資料 : EVALUATION OF THE MUTAGENIC ACTIVITY OF DSM073738 IN AN IN VITRO MAMMALIAN CELL GENE MUTATION TEST WITH L5178Y MOUSE LYMPHOMA CELLS
 - 24.
 - 25.DSM 社社内資料 : AN IN VITRO MICRONUCLEUS ASSAY WITH DSM073738 IN CULTURED PERIPHERAL HUMAN LYMPHOCYTES (WITH INDEPENDENT REPEAT)
 - 26.DSM 社社内資料 : MICRONUCLEUS TEST IN BONE MARROW CELLS OF THE RAT WITH DSM073738
 - 27.DSM 社社内資料 : A 10-Day Mechanistic Study of DSM073738 and its Metabolites after Oral, Intravenous or Subcutaneous dosing in Male Wistar Rats
 - 28.DSM 社社内資料 : NOPA: In vitro comparison of testicular toxicity in rats, Beagle dogs, and non-human primate tissue
 - 29.DSM 社社内資料 : Plasma Kinetics, Mass Balance and Tissue Distribution after Single Oral Administration of 500 mg/kg bw ¹⁴C-DSM073738 (1-Nitrate-1,3-propanediol) to Male Rats
 - 30.DSM 社社内資料 : Mass Balance with Volatile Trapping and Tissue Distribution after Single Oral Administration of 500 mg/kg bw ¹⁴C-DSM073738 (1-Nitrate-1,3-propanediol) to Male Rats
 - 31.DSM 社社内資料 : Metabolite Profiles in Plasma and the Gastrointestinal Tract

- after Single Oral Administration of 500 mg/kg bw 14C-DSM073738 (1-Nitrate-1,3-propanediol) to Male Rats
- 32.DSM 社社内資料 : [14C]-DSM073738: The Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion of [14C]-DSM073738 in the Rat Following Single and Multiple Oral Administration
- 33.DSM 社社内資料 : Metabolite Profiles of 14C-DSM073738 (1-Nitrate-1,3-propanediol) after In-vitro Incubation in Sheep, Goat and Cow Rumen Fluid
- 34.DSM 社社内資料 : The Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion after 7 Daily Oral Administrations of 4 mg/kg bw 14C-DSM073738 (1-Nitrate-1,3-propanediol) to a Lactating Goat
- 35.DSM 社社内資料 : The Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion after 2 Daily Oral Administrations of 4 mg/kg bw 14C-DSM073738 (1-Nitrate-1,3-propanediol) to a Lactating Goat Predosed with Non-labelled Compound
- 36.DSM 社社内資料 : [14C]-DSM073738: The Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion of [14C]-DSM073738 in Dairy Cattle Following Multiple Oral Administration
- 37.DSM 社社内資料 : D5M073738: Neurotoxicity Screening

3-ニトロオキシプロパノールの成分規格等（案）

1. 飼料一般の成分規格並びに製造、使用及び保存の方法及び表示の基準

（1）飼料一般の成分規格

- (ア) 牛を対象とする飼料(飼料を製造するための原料又は材料を含む。)以外の飼料は、飼料添加物である3-ニトロオキシプロパノールを含んではならない。
- (イ) 3-ニトロオキシプロパノールの飼料(飼料を製造するための原料又は材料を除く。)中の含有量は、3-ニトロオキシプロパノールとして0.015%以下でなければならない。

2. 各飼料添加物の成分規格及び製造の方法等の基準

ア 製造用原体

(ア) 成分規格

含量 本品は、定量するとき、3-ニトロオキシプロパノール ($C_3H_7NO_4$) 98.0%以上を含む。

物理的・化学的性質

- ① 本品は、無色～淡黄色の透明な液体である。
- ② 本品は、エタノール又はアセトニトリルに溶けやすく、水にやや溶けにくい。

確認試験

- ① 本品及び3-ニトロオキシプロパノール標準品につき、それぞれ同一の条件で赤外吸収スペクトル測定法のATR法により測定し、スペクトルを比較するとき、両者の吸収は、同一波数のところに認められ、これらの吸収の相対強度は等しい。
- ② 本品のエタノール溶液(1→50,000)につき、吸収スペクトルを測定するとき、波長200～205 nmに吸収の極大を示す。

純度試験

- ① 鉛 本品25mg (24.5～25.4 mg)を量り、高温高压下での分解に適した石英又はテフロンのバイアルに入れ、誘導結合プラズマ分析用硝酸3 mL及び誘導結合プラズマ分析用塩酸2 mLを静かに加える。バイアルに蓋をして、60℃の水浴中で30分間超音波処理する。その後、マイクロ波を照射して試料を分解する装置を用い、70℃で10分間保持し、さらに180℃で15分間、250℃で8分間、最後に260℃で30分間保持する。反応中の圧力は13,000 kPa未満にする。放冷後、分解された溶液を25 mLの全量フラスコに入れ、バイアルを誘導結合プラズマ分析用水で洗い、洗液を先の溶液と合わせ、誘導結合プラズマ分析用水を標線まで加え、試料原液とする。

別に誘導結合プラズマ分析用鉛標準液適量を正確に量り、誘導結合プラズマ分析用硝酸・塩酸試液を加えて、1 mL 中に鉛を 2 ng 含む濃度の液を調製し、標準原液とする。

各原液それぞれ 1 mL 当たり、内標準溶液を 20 μ L の割合 で正確に加え、試料溶液及び標準溶液とする。

ビスマスを入標準とした 誘導結合プラズマ質量分析法の内標準法により試験を行うとき、試料溶液におけるビスマスの強度に対する鉛の強度の比は標準溶液における強度の比以下でなければならない (2 μ g/g 以下) 。

操作条件

装置：コリジョン・リアクションセルが配置されたものを用いる。

設定質量数： m/z 208 (内標準： m/z 209)

内標準溶液：誘導結合プラズマ分析用ビスマス標準液 に誘導結合プラズマ分析用硝酸・塩酸試液を加えて 1 mL 中にビスマスが 400ng になるよう調製し、内標準溶液とする。

② ヒ素 3—ニトロオキシプロパノール製造用原体の純度試験①を準用する。この場合において、「鉛」とあるのは「ヒ素」と、「ビスマス」とあるのは「ゲルマニウム」と、「1 mL 中に鉛を 2 ng 含む」とあるのは「1 mL 中にヒ素 (As_2O_3 として) を 2.6 ng 含む」と、「設定質量数: m/z 208 (内標準： m/z 209)」とあるのは「設定質量数: m/z 75 (内標準： m/z 72)」と読み替えるものとする (2.6 μ g/g 以下) 。

③ 類縁物質 定量法で得たクロマトグラムより、保持時間 2.5～25 分の間に確認された 3—ニトロオキシプロパノール及び内部標準物質ノナン酸メチルを除く全てのピークの合計面積の割合は、総ピーク面積の 2.0%以下でなければならない。

水分 1.5%以下 (直接滴定)

定量法 本品約 100 mg を有効数字 3 桁まで量り、10 mL の褐色全量フラスコに入れ、内標準溶液 5 mL を全量ピペットを用いて量り、加え、よく振り混ぜ、バイアルに移し、試料溶液とする。別に 3—ニトロオキシプロパノール標準品約 100mg を有効数字 3 桁まで量り、試料溶液の調製と同様に操作し標準液とする。試料溶液及び標準液につき、次の条件でガスクロマトグラフ法により試験を行う。得られたクロマトグラムから 3—ニトロオキシプロパノールのピーク面積を測定し、次式により含量を算出する。

操作条件

検出器 : 水素炎イオン化検出器

カラム : 内径 0.32 mm、長さ 30 m のフューズドシリカ管の内面に、非極性固定相を 5.0 μm の厚さで被覆したもの
 カラム温度 : 80℃で 2 分間保持した後、毎分 5℃で 120℃まで昇温し、10 分間保持する。さらに毎分 10℃で 180℃まで昇温し、6 分間保持し、最後に毎分 30℃で 250℃まで昇温し、2 分間保持する。
 注入口温度 : 200℃
 検出器温度 : 265℃
 キャリヤーガス : ヘリウム
 流量 : 毎分 3.5 mL
 注入方式 : スプリット
 スプリット比 : 1 : 50
 注入量 : 1.0 μL
 面積測定範囲 : 3—ニトロオキシプロパノールの保持時間の 2.5 倍
 内標準液の調製 : 正確に 4570 μL のノナン酸メチルを量り、200 mL の褐色全量フラスコに入れ、140 mL のエタノール (99.5) と混合し、さらにエタノール (99.5) を正確に標線まで加え、内標準液とする。

$$3\text{—ニトロオキシプロパノール}(\%) = \frac{P \times A_{\text{NOPSp}} \times A_{\text{NMSd}} \times W_{\text{NOPSd}}}{A_{\text{NMSp}} \times A_{\text{NOPSd}} \times W_{\text{Sp}}}$$

P : 3—ニトロオキシプロパノール標準品の純度 (%)
 A_{NOPSp} : 試料溶液中の 3—ニトロオキシプロパノール面積
 A_{NMSd} : 標準液中のノナン酸メチル面積
 W_{NOPSd} : 3—ニトロオキシプロパノール標準品の採取量 (mg)
 A_{NMSp} : 試料溶液中のノナン酸メチル面積
 A_{NOPSd} : 標準液中の 3—ニトロオキシプロパノール面積
 W_{Sp} : 試料採取量 (mg)

(4) 保存の方法の基準

密閉し、火気を避けて冷所に保存する。

イ 製剤 (その 1)

(7) 成分規格

本品は、3—ニトロオキシプロパノール製造用原体をプロピレングリコールに混合し、賦形物質を混和した小片又は粉末である。

含量 本品は、定量するとき、表示量の 90～110%に相当する 3—ニトロオキシプロパノールを含む。

確認試験 定量法により調製した試料溶液及び標準液 1 μLにつき、定量法の操作条件でガスクロマトグラフ法により試験を行うとき、試料溶液及び標準液から得た 3—ニトロオキシプロパノールのピークに係る保持時間は一致する。

定量法 本品約 200 mg を 2 mL のプラスチック製遠沈管に入れ、1.0 mL の内標準液を加え、蓋をし、よく振る。その後室温の水浴中で 5 分間超音処理を行う。次に遠沈管を振り混ぜた後、2,000×g で 2 分間遠心分離し、上澄み液を試料溶液とする。別に約 350mg のプロピレングリコールと約 105 mg の 3—ニトロオキシプロパノール標準品を量り、10 mL の褐色全量フラスコに入れ、内標準液 5 mL を全量ピペットを用いて量り、加え、よく振り混ぜ、バイアルに移し、標準液とする。試料溶液及び標準液につき、製造用原体の定量法の操作条件でガスクロマトグラフ法により試験を行う。得られたクロマトグラムから 3—ニトロオキシプロパノールのピーク面積を測定し、次式により含量を算出する。

$$\text{3—ニトロオキシプロパノール (\%)} = \frac{P \times A_{\text{NOPS}_p} \times W_{\text{NOPS}_d} \times A_{\text{NMS}_d}}{5 \times W_{\text{Sp}} \times A_{\text{NMS}_p} \times A_{\text{NMS}_d}}$$

P : 3—ニトロオキシプロパノール標準品の純度 (%)

A_{NOPS_p} : 試料溶液中の 3—ニトロオキシプロパノール面積

W_{NOPS_d} : 3—ニトロオキシプロパノール標準品の採取量 (mg)

A_{NMS_d} : 標準液中のノナン酸メチル面積

W_{Sp} : 試料採取量 (mg)

A_{NMS_p} : 試料溶液中のノナン酸メチル面積

A_{NMS_d} : 標準液中の 3—ニトロオキシプロパノール面積

5 : 内標準液と標準液中のノナン酸メチルの希釈倍率

(4) 保存の方法の基準

遮光した密閉容器に保存すること。

〔上記修正案に規定する一般の試験法で、成分規格等省令別表第 2 の 6 に新たに追加する必要があるものの規定案〕

6 飼料添加物一般の試験法

(39) 誘導結合プラズマ発光分光分析法及び誘導結合プラズマ質量分析法

誘導結合プラズマ発光分光分析法及び誘導結合プラズマ質量分析法は、誘導結合プラズマ (Inductively Coupled Plasma) (以下「ICP」という。) を励起源又はイオン源として利用する元素分析法である。

ICP 発光分光分析法は、ICP により励起された原子の原子発光スペクトル線

の波長及び強度を測定する。ICP質量分析法は、検出器として質量分析計を用い、ICPによりイオン化された元素を m/z 値ごとに分離してイオンのピーク強度を測定する。

装置

① ICP発光分光分析計の装置構成

ICP発光分光分析計は、励起源部、試料導入部、発光部、分光部、測光部及びデータ処理部で構成される。

励起源部は、発光部に電気エネルギーを供給・制御するための高周波電源、制御回路及びガス供給部からなる。試料導入部は、試料溶液を発光部に導入する部分で、試料溶液を霧化するネブライザー及び噴霧室(スプレーチャンバー)などから構成される。

発光部は、試料溶液中の元素を原子化・励起・発光させるための部分で、トーチ及び高周波誘導コイルなどからなる。トーチは、三重管構造をしており、中心の管から試料溶液が導入される。プラズマの生成及び試料溶液を搬送するためのガスとしてアルゴンガスを用いる。発光部から放射される光の観測方式には、プラズマの側面の光を観測する横方向観測方式及びプラズマの中心の光を観測する軸方向観測方式がある。

分光部は、発光部から放射された光をスペクトル線に分離するための部分で、集光系及び回折格子などの光学素子からなる。分光器には、波長走査形分光器(モノクロメーター)と波長固定型の同時測定形分光器(ポリクロメーター)がある。なお、190 nm以下の真空紫外領域のスペクトル線を測定する場合、分光器内は、真空排気を行うか、アルゴンガス又は窒素ガスにより、空気を置換する必要がある。

測光部は、入射した光をその強度に応じた電気信号に変換する部分で、検出器及び信号処理系からなる。検出器としては、光電子増倍管又は半導体検出器が用いられる。

データ処理部は、データ処理を行い、検量線及び測定結果などを表示する。

② ICP質量分析計の装置構成

ICP質量分析計は、励起源部、試料導入部、イオン化部、インターフェース部、イオンレンズ部、質量分離部、イオン検出部及びデータ処理部で構成される。

励起源部、試料導入部及びイオン化部は、それぞれICP発光分光分析計における励起源部、試料導入部及び発光部と同一の構造である。

インターフェース部は、大気圧下でプラズマにより生成されたイオンを高真空の質量分離部に導入するための境界部分でサンプリングコーン及びスキマーコーンより構成される。

イオンレンズ部は、インターフェース部を介して導入されたイオンを収束させ、効率良く質量分離部に導くための部分である。

質量分離部は、多くの装置で四重極型の質量分析計が採用されている。なお、コリジョン・リアクションセルと呼ばれる室(セル)を真空内の質量分離部の前に配置し、水素、ヘリウム、アンモニア又はメタンなどのガスを導入することにより、後述の多原子イオン類による干渉を抑制できる。

イオン検出部は、検出器内に到達したイオンを、増倍管により増幅した後、

電気信号に変換し、データ処理部で、得られた電気信号をデータとして処理し、検量線及び測定結果などを表示する。

操作法

アルゴン又は窒素を所定の流量に設定し、高周波電源を入れ、プラズマを生成する。装置に指示された方法を用いて機器の校正を行う。

別に規定する方法で調製した試料溶液、標準液又は比較液を導入し、ICP発光分光分析計の場合は適当な発光スペクトル線の発光強度を、ICP質量分析計の場合は定められた m/z 値における信号強度を測定する。

なお、定量に際しては、次の干渉及びバックグラウンドを考慮する必要がある。

① 操作条件の最適化

純度試験又は定量法を行うときは、あらかじめ次に規定する感度、バックグラウンド、並びに酸化物イオン及び二価イオンの生成比の最適化を行い、装置の稼働性能が適切であることを確認しておく。操作条件の最適化の実施に際しては、通常、適切な濃度に調整した、 ^7Li 、 ^9Be 、 ^{59}Co 、 ^{89}Y 、 ^{115}In 、 ^{140}Ce 、 ^{205}Tl 、 ^{209}Bi 等の環境中から汚染し難い、低質量数、中質量数及び高質量数を代表する元素の標準液を用いる。

感度は、積分時間 1 秒当たりのイオンカウント数（以下「cps」という。）で判定する。純度試験又は定量法を行うときは、低質量数、中質量数及び高質量数において、各元素濃度 1 $\mu\text{g/L}$ (ppb) 当たり数万 cps 程度あることが望ましい。

バックグラウンドは、天然には存在しない元素の m/z 値、例えば m/z が 4、8 又は 220 等で測定した場合、10 cps 以下であることが望ましい。

酸化物イオン及び二価イオンの生成比は、 ^{140}Ce 等の溶液を用い、それぞれの酸化物イオン (^{140}Ce の場合 $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+$ 、 m/z 156)、二価イオン ($^{140}\text{Ce}^{2+}$ 、 m/z 70) 及び一価イオン ($^{140}\text{Ce}^+$ 、 m/z 140) のカウント数を測定し、酸化物イオン及び二価イオンのカウント数を一価イオンのカウント数で除して求める。酸化イオン生成比、すなわち $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+ / ^{140}\text{Ce}^+$ が 0.03 以下、及び二価イオン生成比、すなわち $^{140}\text{Ce}^{2+} / ^{140}\text{Ce}^+$ が 0.05 以下となることが望ましい。

② 干渉とその抑制又は補正

スペクトル干渉には、同重体干渉並びに多原子イオン及び二価イオンのマスマスペクトルの重なりによる干渉がある。同重体干渉とは、測定対象元素と原子量が近接している同重体イオンによる干渉をいう。例として、 ^{40}Ca に対する ^{40}Ar 、 ^{204}Pb に対する ^{204}Hg の重なりがある。多原子イオンは、イオン化源としてアルゴンガスを使用しているため、例えば、Ar に起因する $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ 、 $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+{}^1\text{H}$ 、 $^{40}\text{Ar}_2$ 等の多原子イオンが形成され、それぞれ ^{56}Fe 、 ^{57}Fe 、 ^{80}Se の測定に干渉を生じる。コリジョン・リアクションセルが付属している装置では、セル内でこれらの多原子イオンを減少させることができる。

二価イオンとは、当該の一価イオンの $1/2$ の m/z 値にピークを持つイオンのことで、検液中に測定対象元素の 2 倍の質量数の同位体を持つ元素が共存する場合に干渉を生じる。

非スペクトル干渉には、物理干渉及びイオン化干渉のほか、ICP質量分析法特有のものとしてマトリックス干渉がある。マトリックス干渉は多量の共存元素が存在すると測定対象元素のイオンカウント数が一般的に減少する現象で

ある。この傾向は、共存元素の質量数が大きく、その濃度が高いほど、また、測定元素の質量数が小さいほど顕著に表れる。非スペクトル干渉は、未知試料に対して既知量の測定対象元素を添加することで、その回収率から干渉の程度を確認できる。回収率が低く、分析の信頼性が確保されないと判断される場合には、内標準法又は標準添加法によって補正を行う。

③ システムの再現性

各装置により最適化された試験条件の下、最低濃度の検量線用標準液を用いて、試験を6回繰り返すとき、別に規定するもののほか、分析対象元素のスペクトル強度の相対標準偏差は一定値以下（10%以下）であることを確認する。定量は、通例、次のいずれかの方法による。

① 検量線法

3種以上の濃度の異なる標準液を調製し、それぞれの標準液につき、その強度を測定し、得られた値から検量線を作成する。次に測定可能な濃度範囲に調製した試料溶液の強度を測定した後、検量線から被検元素量（濃度）を求める。

② 標準添加法

同量の検液3個以上をとり、それぞれに被検元素が段階的に含まれるように標準液を添加し、更に溶媒を加えて一定容量とする。それぞれの溶液につき、強度を測定し、横軸に添加した標準被検元素量（濃度）、縦軸に強度をとり、グラフにそれぞれの値をプロットする。プロットから得られた回帰線を延長し、横軸との交点と原点との距離から被検元素量（濃度）を求める。ただし、この方法は、①による検量線が原点を通る直線の場合のみに適用できる。

③ 内標準法

内標準元素の一定量に対して標準被検元素を段階的に加えた標準液を数種類調製する。それぞれの液につき、各元素の分析線波長で標準被検元素による強度及び内標準元素による強度を同一条件で測定し、標準被検元素による強度と内標準元素による強度の比を求める。横軸に標準被検元素量（濃度）、縦軸に強度の比をとり、検量線を作成する。次に、標準液の場合と同量の内標準元素を加えた検液を調製し、検量線を作成したときと同一条件で得た被検元素による強度と内標準元素による強度の比を求め、検量線から被検元素量（濃度）を求める。

なお、本法の適用に当たっては、添加する内標準元素が検液中に含まれないこと、又は含まれていたとしても添加濃度に対して無視できる程度であることを確認しておく必要がある。

また、内標準元素としては、測定対象元素と、スペクトル干渉を起こさず、同程度のイオン化効率及び質量数を有する元素が望ましい。

注意

- ① アルゴンガスは、液化アルゴン又は圧縮アルゴンのいずれを用いても良いが、純度 99.99 vol%以上のものを用いる。
- ② 標準液の液性は検液と合わせることが望ましい。
- ③ 複数元素を含む標準液を調製する場合は、沈殿及び互いに干渉を生じないような試液及び元素の組合せを選択する。

〔上記修正案に規定する標準品及び試薬・試液で、成分規格等省令別表第2の7に新たに追加又は既存の内容を改正する必要があるものの規定案〕

(2) 試薬・試液

エタノール(95) (略)

エタノール(99.5) $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ [日局]

塩酸、誘導結合プラズマ分析用 HCl [微量金属分析用、35.0～37.0%]

硝酸、誘導結合プラズマ分析用 HNO_3 [微量金属測定用、69～70%]

硝酸・塩酸試液 誘導結合プラズマ分析用 誘導結合プラズマ分析用硝酸 18 mL 及び誘導結合プラズマ分析用塩酸 2 mL を量り、500 mL の全量フラスコに入れ、純誘導結合プラズマ分析用水を標線まで加え、蓋をし、よく振り混ぜて試液とする。

3-ニトロオキシプロパノール

含量 98.0%以上

定量法 本品約 100 mg を有効数字 3 桁まで量り、10 mL の褐色全量フラスコに入れ、内標準溶液 5 mL を全量ピペットを用いて量り、加え、良く振り混ぜ、バイアルに移し、試料溶液とする。この溶液につき、3-ニトロオキシプロパノール製造用原体の定量法に定める測定条件でガスクロマトグラフ法により試験を行う。試料溶液注入後、測定時間に現れる、エタノール由来のピーク及びノナン酸メチルのピークを除いた、全ての成分のピーク面積の総和を 100 とし、それに対する 3-ニトロオキシプロパノールのピーク面積百分率を求める。

ノナン酸メチル $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{COOCH}_3$ 99.8%以上

プロピレングリコール $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ [特級]

水、誘導結合プラズマ分析用 H_2O [日局]

(4) 標準液

誘導結合プラズマ質量分析用 鉛標準液

計量法で規定される標準液。この液 1 mL は鉛 (Pb) 1 mg を含む。

誘導結合プラズマ質量分析用 ヒ素標準液

計量法で規定される標準液。この液 1 mL はヒ素 (As_2O_3) 1.3 mg を含む。

誘導結合プラズマ質量分析用 ゲルマニウム標準液

計量法で規定される標準液。この液 1 mL はゲルマニウム (Ge) 1 mg を含む。

誘導結合プラズマ質量分析用 ビスマス標準液

計量法で規定される標準液。この液 1 mL はビスマス (Bi) 1 mg を含む。