

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

(3) マウスを用いた 78 週間混餌投与発がん性試験

(資料 22)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:

検体純度:

供試動物: ICR(CD-1)系マウス、開始時 5~6 週齢、体重: 雄 23~32g、雌 18~28g

1 群当り動物数: 主群: 雌雄各 52 匹、中間屠殺群: 雌雄各 20 匹

試験期間: 主群: 78 週 (10 月 16 日 ~ 5 月 5 日)

中間屠殺群: 53 週 (10 月 16 日 ~ 10 月 30 日)

投与方法: 検体を 0、0.1、0.5、10、30 及び 60ppm の濃度で飼料に直接混入し、随時摂取させた。

検体を混入した飼料は毎週調製した。

なお、60ppm 群は投与後数週間で高い死亡率を示したため、投与 10 週に生存動物を全て屠殺した。

用量設定根拠: 同研究所で同系統の動物を用いて、混餌濃度 15、40、110、300 及び 800ppm で実施した 6 週間投与予備試験の結果に基づき選択した。110ppm 以上の群では死亡率、過剰活動/興奮及び痙攣の発現率の上昇、摂餌量減少、体重増加抑制、食餌効率の低下及び肝重量の増加が観察された。40ppm では 24 匹中 2 匹が死亡し、15ppm と 40ppm では摂餌量減少及び体重増加抑制、食餌効率低下及び肝重量増加が認められた。この結果から 0.1、0.5、10、30 及び 60ppm を選択した。

観察・検査項目及び結果:

一般状態及び死亡率: 一般状態及び生死を毎日観察した。

一般状態: 検体投与に起因する変化は、60ppm 群の雄 3 匹で 2 週後に認められた痙攣のみであった。これら動物のうち 1 匹は痙攣により死亡した。その他に投与の影響はみられなかった。

死亡率: 投与開始後 9 週間に、60ppm 群の雄 14 匹と雌 7 匹が死亡した。雄 1 匹は痙攣を発現したが、それ以外の動物は死亡前に特異的な所見が認められなかった。死因は特定できなかったが、検体に起因する死亡と判断し、この群の全生存動物を投与 10 週に屠殺した。その他の群の試験終了時の死亡率は次表のとおりである。

主群において、雄は死亡率に投与の影響は認められなかったが、雌では用量の増加につれて死亡率が低下する傾向にあった。

試験終了時の死亡数(死亡率)

()内の数値は死亡率%

群	雄					雌				
	0	0.1	0.5	10	30	0	0.1	0.5	10	30
中間屠殺群 (各群 20 例中)	6 (30)	5 (25)	1 (5)	4 (20)	2 (10)	2 (10)	1 (5)	5 (25)	3 (15)	7 (35)
主群 (各群 52 例中)	28 (54)	21 (40)	26 (50)	26 (50)	26 (50)	20 (39)	20 (39)	26 (59)	15 (29)	14 (27)

体重変化：投与開始から 14 週間までは週 1 回、その後は 2 週間に 1 回全ての生存動物の体重を測定した。

試験に供した全生存動物の体重の変動率を次表に示す。

投与後週	雄					雌				
	0	0.1	0.5	10	30	0	0.1	0.5	10	30
0~1 週	(3)	(3)	(2)↓	(2)↓	(1)↓	(2)	(1)	(2)	(2)	(1)↓
0~13 週	-	92	95	88↓	74↓	-	96	98	83↓	83↓
13~26 週	-	102	108	120	90	-	96	110	87	88
26~52 週	-	140	115	105	165↑	-	78	102	113	87
52~78 週	増加が負となったため算出せず									
0~26 週	-	94	97	95	76↓	-	96	103	85	84↓
0~52 週	-	98	98	94	84↓	-	95	107	95	86
0~78 週	-	95	103	92	86	-	85	102	87	81↓

統計学的手法：Behrens-Fisher 検定 ↑↓：p<0.05 ↓：p<0.01

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示したものである。

投与 0~1 週の数値は報告書に記載がないため、申請者が体重から個体別の体重増加量（有効数字 1 桁）を算出し、群平均値を求めるとともに統計処理を実施した。変化量が極めて小さかったため、対照群を 100 とした場合の相対値ではなく、参考として()内に実際の変化量(g)を示した。

0~78 週間の総体重増加についてみると、30ppm 群の体重増加は対照群に比べて低値を示し、全体の値は雄で 14%、雌で 19%対照値よりも低かった。10ppm 群では体重増加は、雄が 0~52 週間、雌が 0~26 週間、対照群に比べて低値を示した。

0.1ppm 群と 0.5ppm 群の体重には投与による影響は認められなかった。

申請者注) 投与 1 週間の体重増加量の抑制は、雄では 0.5 ppm 以上、雌では 30 ppm で統計学的有意差を伴って認められたが、いずれの投与群においても極めて軽微な変化であり、体重では対照群と何ら変わりがないことから、生物学的に有意な変化ではないものと考えられた。

摂餌量及び食餌効率：全動物の摂餌量を週 1 回測定し、食餌効率は投与開始後 14 週間にわたり算出した（有意差検定は実施されていない）。

摂餌量は対照群に比べて全群共統計学的に有意差は認められなかったが、30ppm 群は軽度ながら一貫して低い傾向を示した。10ppm 以下の群の摂餌量は、対照群とほぼ同等であった(次表参照)。

投与後週	用量 (ppm) / 性別							
	雄				雌			
	0.1	0.5	10	30	0.1	0.5	10	30
1~13 週	97	97	95	93	95	97	94	89
14~26 週	98	96	96	92	94	98	91	86
27~52 週	96	96	98	93	91	97	91	86
53~58 週	94	97	100	93	91	100	88	85
1~78 週	96	97	98	93	92	98	91	86

統計学的解析は実施していない

食餌効率を次表に示す。

投与後週	用量 (ppm) / 性別									
	雄					雌				
	0	0.1	0.5	10	30	0	0.1	0.5	10	30
0~14 週	3.3	3.1	3.1	2.9	2.3	2.4	2.3	2.5	2.0	2.0

投与後 14 週間の食餌効率も対照群に比べて全群共統計学的に有意差は認められなかったが、10 及び 30ppm 群は低い傾向を示した。0.5ppm 以下の群は対照群とほぼ同等であった。

検体摂餌量：投与期間中の 1 日当たり平均検体摂取量は以下のとおりである。

検体摂餌量	用量 (ppm) / 性別							
	雄				雌			
	0.1	0.5	10	30	0.1	0.5	10	30
mg/kg/日	0.011	0.055	1.181	3.430	0.012	0.063	1.230	3.616

(1~78 週迄の生存全例の平均値)

血液学的検査：投与 51 及び 77 週に、主群の対照群及び 30ppm 群の全動物の尾静脈から採血し、血液塗抹標本を作製し、白血球型別百分率[好中球、リンパ球、好酸球、好塩基球及び単球、正赤芽球、血液膜の異常]について検査した。

対照群と比べ統計学的に有意差の認められた項目を下表に示す。

検査時期	項目	用量 (ppm) / 性別							
		雄				雌			
		0.1	0.5	10	30	0.1	0.5	10	30
77 週	好中球	-	-	-	-	-	-	-	83↓
	リンパ球	-	-	-	-	-	-	-	110↑

-：検査せず。

統計学的手法：Mann-Whitney 検定 ↑↓：p<0.05

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示したものである。

投与 77 週でのみ、30ppm 群雌で、対照群に比べて好中球比率が軽度低下、リンパ球比率の軽度上昇が認められた。投与 51 週で雌雄ともこの傾向が認められず、また、77 週の雄でも認められなかったため、投与関連性はないと考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

切迫殺動物の塗抹標本では、個体差が大きく、投与関連性の変化はみられなかった。

臓器重量：試験終了時(中間屠殺群:投与 54 週、主群:79 週) の全群の全生存動物を対象として、以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

副腎、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺(主気管支を含む)、脾臓、精巣、子宮(頸部を含む)

対照群と比べ統計学的に有意差の認められた項目を次表に示す。

群	屠殺時期	臓器重量		雄				雌			
				0.1	0.5	10	30	0.1	0.5	10	30
中間屠殺群	54 週	最終体重					86↓D				
		脳	対体重比		111↑D		117↑D				
		心臓	対体重比	114↑D							
		腎臓	重量				87↓D				
		肝臓	重量		103	116	129↑D			110↑	120↑
			対体重比		113↑	121↑	151↑			107	124↑D
		肺	重量				85↓D	115↑			
脾臓	重量			71↓						81↓	
	対体重比			74↓							
主群	79 週	最終体重					95			95	90
		心臓	重量				88↓				
		腎臓	重量				87D				
		肝臓	重量			119	138↑			102	107
対体重比				124↑	147↑			106	117↑D		

統計学的手法: Dunnett 検定 (D) 又は Behrens-Fisher 検定 (無印) ↑↓: p<0.05 ↑↓: p<0.01.

矢印のない数値は有意差なし。

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示したものである。

投与 54 週と 79 週に、10ppm 群雄及び 30ppm 群雌雄で肝臓の重量又は対体重比が対照群に比べて有意に増加又は増加傾向を示した。54 週に 0.5ppm 群雄で肝臓の対体重比が軽度増加したが、重量に増加はなく、同様の所見が 79 週には認められなかったため、投与の影響とは考えられなかった。

その他の有意な変化は重量と対体重比の変化が同じでなく、また用量関連性もないので投与の影響とは考えられなかった。

肉眼的病理検査：途中死亡、切迫屠殺及び投与終了時の全生存動物について剖検を行った。

中間屠殺群: 検体投与によると考えられる肉眼的異常所見はなかった。

主群: 主要な肉眼的所見を全動物(途中死亡+最終屠殺)について次表にまとめる。

30ppm 群において、雄では対照群に比べて肝臓の肥大の増加傾向及び表面変化の発現率の増加、脱毛の発現率の低下がみられた。また、雌では脾臓の白脾髄隆起、浮腫様皮下組織、会陰部汚染及び肥満の発現率が低下した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

その他に統計学的に有意な用量依存性のない発現率の増加又は減少が認められたが、投与に起因する所見ではなかった。

主群における主要な肉眼的所見

臓器	所見	性別/用量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	0.1	0.5	10	30	0	0.1	0.5	10	30
検査動物数		52	52	52	52	52	52	52	52	52	52
腎臓	肥大	10	11	10	13	9		1			1
腸間膜リンパ節	暗調化	13	4↓	6	9	7	3	6	5	2	3
肝臓	表面変化		1	3	3	8↑			1		1
	肥大	2	2	1	4	7	1		1		1
	腫大	1	1	3	3	3	1	1	1		
	腫瘤	21	13	14	11	22				3	1
胆嚢	膨張	2	2	1		2	2	10↑	7	5	7
脾臓	浮腫	4	3	1	3	5	6	0↓	6	3	1
皮膚	浮腫様皮下組織	5	6	4	1	5	9	6	8	5	1↓
	中度脱毛	34	26	29	27	23↓	12	11	14	11	10
	会陰部汚染	28	31	30	18	25	16	10	10	8	3↓
脾臓	白脾髄隆起	5	6	4	3	7	7	11	6	3	0↓
	腫大	24	17	19	18	21	17	15	20	21	20
	肥大	13	8	13	9	12	11	9	7	9	7
精嚢	肥大	29	32	30	32	31	-	-	-	-	-
卵巣	嚢胞様変化	-	-	-	-	-	26	33	32	28	32
子宮	嚢胞様変化	-	-	-	-	-	23	27	25	30	28
	肥厚	-	-	-	-	-	11	7	2↓	2↓	4
ハタゲ腺	暗調化	9	7	8	4	2	13	22	26↑	22	14
その他	肥満	1	1		1	2	10	4	7	5	2↓

統計学的方法: Fisher 直接確率検定 ↑↓: p<0.05 ↑↓: p<0.01
空欄は所見なし

病理組織学的検査: 肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、以下の組織について、ヘマトキシリン・エオジン染色、骨髄塗抹はメイグリュンワルド-ギムザ染色して病理標本を作成し、以下のとおり検鏡した。

- 1) 53 週間投与の中間屠殺群は対照群及び 30ppm 群の全生存動物を対象として、下記の+印の臓器を検査した。
- 2) 78 週間投与の主群は対照群及び 30ppm 群の全生存動物を対象として、下記の臓器を検査した。
- 3) さらに、中間屠殺及び主群における 0.1、0.5 及び 10ppm 群の全生存動物の腎臓、肝臓及び肺、並びに
- 4) 途中死亡した全動物の下記組織を検査した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

皮膚、乳腺(尾側)、リンパ節(下顎、腸間膜)、大動脈(胸部)、唾液腺(左顎下腺)、
大腿骨及び骨髄、胸骨、胸腺、気管、肺及び主気管支+、心臓、甲状腺及び上皮小体、
食道、胃(前胃、腺胃)、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、直腸、結腸、肝臓、膵臓、
脾臓、腎臓、副腎、膀胱、前立腺、精囊、精巣、精巣上体、卵巣、子宮及び頸部、
膣、脳、下垂体、坐骨神経、脊髄、骨格筋(大腿)、眼球及び視神経、及び肉眼的病
変部

非腫瘍性病変

中間屠殺群：投与 53 週後に屠殺した中間屠殺群における非腫瘍性病変を次表に示す。

	性別	雄					雌				
	投与量 (ppm)	0	0.1	0.5	10	30	0	0.1	0.5	10	30

途中死亡例

検査例数		6	5	1	4	2	2	1	5	3	7
腎臓	皮質リンパ球浸潤 進行性加齢性腎症	2	2	1				1	1	1	1
									3	3	3
肝臓	細葉周囲性微小空胞				1						
卵巣	包性嚢胞	-	-	-	-	-	1	0	1	1	2
子宮	嚢胞性子宮内膜過形成	-	-	-	-	-		-	2	1	1
精囊	拡張	2	1		3		-	-	-	-	-

最終屠殺例

検査例数		14	15	19	16	18	18	19	15	17	13
腎臓	皮質リンパ球浸潤 進行性加齢性腎症	1	3	6	4	5	4	7	6	4	5
						1	1	3	2		
肝臓	細葉周囲性微小空胞	0	2	2	7↑	12↑	1	1	4	1	4
卵巣	検査動物数	-	-	-	-	-	7	5	3	6	4
	包性嚢胞	-	-	-	-	-	7	4	3	5	3
子宮	検査動物数	-	-	-	-	-	10	12	9	11	8
	嚢胞性子宮内膜過形成	-	-	-	-	-	8	9	9	10	3
精囊	検査動物数	8	8	3	10	7	-	-	-	-	-
	拡張	8	8	3	10	7	-	-	-	-	-

全動物

検査例数		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
腎臓	皮質リンパ球浸潤 進行性加齢性腎症	1	3	6	4	5	4	7	7	5	6
		2	2	1		1	1	4	5	3	3
肝臓	細葉周囲性微小空胞	0	2	2	8↑	12↑	1	1	4	1	4
卵巣	検査動物数	-	-	-	-	-	9	6	8	9	11
	包性嚢胞	-	-	-	-	-	8	4	4	6	5
子宮	検査動物数	-	-	-	-	-	10	12	14	14	15
	嚢胞性子宮内膜過形成	-	-	-	-	-	8	9	11	11	4
精囊	検査動物数	14	13	4	14	9	-	-	-	-	-
	拡張	10	9	3	13	7	-	-	-	-	-

検査動物数：個別臓器に検査動物数の記載がないときは検査例数と同じ。

空欄は発生なし。

統計学的方法：Fisher の直接確率検定：↑： p<0.05 ↑↑： p<0.01 ↑↑↑： p<0.001

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

10 及び 30ppm 群の雄で、肝臓の細葉周囲性微小空胞の発現率が対照群に比べて統計学的に有意に増加した。この変化は 0.5ppm 群及び 30ppm 群の一部の雌でも観察されたが、明確な用量関連性もなく、有意差もなかった。

これ以外の所見は、マウスに高頻度に認められる種類のもので、投与に起因する所見ではなかった。

主群における非腫瘍性病変：主群における非腫瘍性病変を次表に示す。

主群の非腫瘍性病理所見表(1)

性別		雄					雌				
		0	0.1	0.5	10	30	0	0.1	0.5	10	30
投与量 (ppm)		0	0.1	0.5	10	30	0	0.1	0.5	10	30
途中死亡例											
検査例数		28	21	26	26	26	20	20	26	15	14
胆嚢	検査動物数	25	20	22	25	24	18	19	24	14	10
	過形成	2	1	1			3	2		2	
下顎リンパ節	検査動物数	27	21	25	25	25	18	17	25	15	14
	反応性過形成	7	5	3	0↓	7	1	1	1		
心臓	慢性心筋炎		1	4↑				1	3		1
腎臓	進行性加齢性腎症	10	6	10	7	3	13	11	15	10	4
肝臓	肝細胞過形成		2	1		4↑					
	慢性変性変化	3	5	3	5	11↑	6	4	5	4	2
	細葉周囲性肝細胞脂肪性空胞化	2	1	1		1		2		1	
	細葉周囲性微小空胞		1	2	4	3	1	1	3	1	1
	浸潤性炎症を伴う局所壊死	1	2	1	1		1	2	1		1
肺	局所肺胞壁上皮形成					1					
脾臓	髓外造血	13	10	10	4↓	7	2	3	7	4	4
	赤脾髄の細胞過多/鬱血	11	5	4	2↓	5	3	1	7	1	1
	白脾髄過形成		1	1	1	2	1	1	1	1	
胸腺	検査動物数	28	19	24	26	25	20	20	25	15	14
	リンパ球過形成			1	2	1	5	4	13	2	2
卵巣	検査動物数	-	-	-	-	-	20	20	26	15	13
	包性嚢胞	-	-	-	-	-	6	10	13	7	6
子宮	嚢胞性子宮内膜過形成	-	-	-	-	-	7	10	10	10	6
精嚢	拡張	14	8	11	11	17	-	-	-	-	-

検査動物数：個別臓器に検査動物数の記載がないときは検査例数と同じ。

空欄は発生なし。

統計学的方法：Fisher の直接確率検定：↑： p<0.05 ↓： p<0.01

主群の非腫瘍性病理所見表(2)

性別		雄					雌				
		0	0.1	0.5	10	30	0	0.1	0.5	10	30
投与量 (ppm)		0	0.1	0.5	10	30	0	0.1	0.5	10	30
最終屠殺例											
検査例数		24	31	26	26	26	32	32	26	37	38
胆嚢	検査動物数	24	3	0	0	26	30	0	0	0	34
	過形成	2	2				5				1
下顎リンパ節	検査動物数	24	3	0	1	26	31	0	1	0	37
	反応性過形成	6	3		1	2			1		
心臓	検査動物数	24	0	0	0	26	32	0	0	0	38
	慢性心筋炎					1					
腎臓	進行性加齢性腎症		1	1	3	1	1	2			3
肝臓	肝細胞過形成	8	9	8	6	8				2	
	慢性変性変化	11	11	9	16	14	6	3	5	6	6
	細葉周囲性肝細胞脂肪性空胞化	3	9	5	2		7	1	1	1↓	6
	細葉周囲性微小空胞	5	7	7	13↑	13↑			4↑	3	7↑
	浸潤性炎症を伴う局所壊死	4	2	2	1	0↓	8	13	3	8	8
肺	血管周囲性リンパ球局所肺胞壁上皮形成		1		1		4			0↓	1
			4	4		1	1	1	2	1	2
脾臓	検査動物数	24	13	11	10	26	32	16	10	16	38
	髓外造血	6	7	7	9	10	6	7	4	4	5
	赤脾髄の細胞過多/鬱血	8	6	2	4	9	8	7	6	9	8
	白脾髄過形成	3	3	2		3	12	5	2	3	4↓
胸腺	検査動物数	24	1	1	0	25	32	2	1	5	38
	リンパ球過形成		1	1	-	2	12	1	1	5	20
卵巣	検査動物数	-	-	-	-	-	32	26	21	24	37
	包性嚢胞	-	-	-	-	-	17	23	20	21	25
子宮	検査動物数	-	-	-	-	-	32	25	19	26	38
	嚢胞性子宮内膜過形成	-	-	-	-	-	26	25	19	25	26
精囊	検査動物数	24	24	19	21	26	-	-	-	-	-
	拡張	18	24	19	21	16	-	-	-	-	-

検査動物数：個別臓器に検査動物数の記載がないときは検査例数と同じ。

空欄は発生なし。

統計学的方法：Fisher の直接確率検定：↑↓： p<0.05

主群の非腫瘍性病理所見表 (3)

性別		雄					雌				
		0	0.1	0.5	10	30	0	0.1	0.5	10	30
投与量 (ppm)		0	0.1	0.5	10	30	0	0.1	0.5	10	30
全動物											
検査例数		52	52	52	52	52	52	52	52	52	52
胆嚢	検査動物数	49	23	22	25	50	48	19	24	14	24
	過形成	4	3	1			8	2		2	1↓
下顎リンパ節	検査動物数	51	24	25	26	51	49	17	26	15	51
	反応性過形成	13	8	3	1	9	1	1	2		
心臓	検査動物数	52	21	26	26	51	52	20	26	15	52
	慢性心筋炎		1	4		1		1	3		1
腎臓	進行性加齢性腎症	10	7	11	10	4	14	13	15	10	7
肝臓	肝細胞過形成	8	11	9	6	12				2	
	慢性変性変化*	14	16	12	21	25↑	12	7	10	10	8
	細葉周囲性肝細胞脂肪性空胞化	5	10	6	2	1	7	3	1	2	6
	細葉周囲性微小空胞	6	8	9	17↑	16↑	1	1	7	4	8↑
	浸潤性炎症を伴う局所壊死	5	4	3	2		9	15	4	8	9
肺	局所肺胞壁上皮形成		4	6↑		2	1	1	2	1	2
脾臓	検査動物数	52	34	36	36	52	52	36	36	31	52
	髄外造血	19	17	17	13	17	11	8	13	1	9
	赤脾髄の細胞過多/鬱血	19	11	6	6	14	11	8	13	10	9
	白脾髄過形成	3	4	3	1	5	13	6	3	4	4↓
胸腺	検査動物数	52	20	25	26	50	52	22	26	20	52
	リンパ球過形成		1	2	2	3	17	5	14	7	52
卵巣	検査動物数	-	-	-	-	-	52	46	47	39	50
	包性嚢胞	-	-	-	-	-	23	46	47	39	50
子宮	検査動物数	-	-	-	-	-	52	45	45	41	52
	嚢胞性子宮内膜過形成	-	-	-	-	-	33	35	29	35	32
精嚢	検査動物数	52	45	45	47	52	-	-	-	-	-
	拡張	32	32	30	32	33	-	-	-	-	-

検査動物数：個別臓器に検査動物数の記載がないときは検査例数と同じ。

空欄は発生なし。

統計学的方法：Fisher の直接確率検定：↑：p<0.05

*：散発性の細胞壊死とアポトーシス、倍数性増加、細葉周囲性肝細胞の肥大及び変性、慢性炎症及び胆汁うっ滞

30ppm 群において、雄の肝臓で、肝細胞過形成が切迫殺/途中死亡例で対照群に比べて有意に増加したが、最終屠殺及び全動物(切迫殺/途中死亡例+最終屠殺)では有意な増加は認められなかった。慢性変性変化は切迫殺/途中死亡例及び全動物で有意な増加が認められた。この変性変化には散発性の細胞壊死とアポトーシス、倍数性増加、細葉周囲性肝細胞の肥大及び変性、慢性炎症及び胆汁うっ滞があった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

10 及び 30ppm 群の雄で細葉周囲性微小空胞の発生が、最終屠殺及び全動物で有意に増加した。この変化は 0.5ppm 以上を投与した雌でも観察されたが、0.5 及び 10ppm 群の雌では細葉周囲性肝細胞脂肪性空胞化の発生が低かった。

その他に統計学的に有意な変動(10ppm 群雄の切迫殺/途中死亡例で下顎リンパ節の反応性過形成、並びに脾臓の髓外造血及び赤脾髄の細胞過多/鮮血の低下、0.5ppm 群雄の切迫殺/途中死亡例で慢性心筋炎の増加、30ppm 群雌の全動物で胆嚢の過形成及び脾臓の白脾髄過形成の低下)がみられたが、投与との関連は認められなかった。

腫瘍性病変: 中間屠殺群及び主群における腫瘍の発生について次表に示す。

中間屠殺群において、投与に起因する腫瘍発生の増加は認められなかった。

主群において、肝細胞癌が 30ppm 群雄の最終屠殺動物で 3/26 例(対照群 0/24 例)、又全動物で 5/52 例(対照群 1/52 例)に認められたが、対照群に比し有意差はなく、肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせると発現率(30 ppm 群及び対照群共 11/52 例)に差はなく、かつ肝細胞癌の最近の背景値(2.9~25%)の範囲内であることから投与の影響ではないと考えられた。

その他のいずれの腫瘍も自然発生性の腫瘍で、投与に起因する腫瘍発生の増加は認められなかった。

以上の結果から、本剤のマウスに対する混餌投与による発がん性試験を行った結果、30ppm 群では雌雄とも摂餌量の低下を伴い体重増加の抑制、肝臓の重量増加、肉眼的に肝臓の肥大の増加傾向及び表面変化の増加、肝臓の細葉周囲性微小空胞及び慢性変性変化が認められた。

10ppm 群では雌雄とも初期の体重増加の抑制、肝臓重量の増加傾向、雄では肝臓の細葉周囲性微小空胞の増加が認められた。0.5ppm 群では投与関連性の変化は認められなかったことから無毒性量は 0.5ppm (雄 0.055 mg/kg/日 雌 0.063 mg/kg/日)と判断した。

催腫瘍性は試験した最高用量の 30ppm でも認められなかった。

申請者注) 単回経口投与等により生じる可能性のある毒性影響は認められなかった。

中間屠殺群の腫瘍性病変

	性別	雄					雌				
	投与量 (ppm)	0	0.1	0.5	10	30	0	0.1	0.5	10	30

途中死亡例

検査例数		6	5	1	4	2	2	1	5	3	7
肺	肺腺腫 (B)	1									
子宮	血管肉腫 (M)	-	-	-	-	-	1				
全身性	悪性リンパ腫 (M)						1				

最終屠殺例

検査例数		14	15	19	16	18	18	19	15	17	13
肝臓	肝細胞癌 (M)					1					
肺	肺腺腫 (B)	2	1		2		1				
	肺癌 (M)				1			1	1		1
脾臓	血管腫 (B)							1			
精巣	検査動物数	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	間細胞腫 (B)	-		1	-	-	-	-	-	-	-
子宮	検査動物数	0	0	0	0	0	10	12	9	11	8
	平滑筋肉腫 (M)	-	-	-	-	-		1			
ハタゲ腺	検査動物数	0	1	0	0	1	0	3	2	1	0
	腺腫 (B)	-		-	-			1			-
乳腺	検査動物数	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	癌 (M)	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
皮膚	検査動物数	8	7	10	3	5	1	2	0	0	0
	肉腫 (M)							1	-	-	-
尾	検査動物数	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1
	乳頭腫 (B)		-			1	-	-	-	-	

全動物

検査例数		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
肝臓	肝細胞癌 (M)					1						
肺	肺腺腫 (B)	3	1		2		1					
	肺癌 (M)	1			1			1	1		1	
脾臓	血管腫 (B)							1				
精巣	間細胞腫 (B)	-		1	-	-	-	-	-	-	-	
子宮	平滑筋肉腫 (M)	-	-	-	-	-	1	1				
ハタゲ腺	腺腫 (B)	-		-	-			1			-	
乳腺	癌 (M)	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	
皮膚	肉腫 (M)							1	-	-	-	
尾	乳頭腫 (B)		-			1	-	-	-	-		
全身性	悪性リンパ腫 (M)						1					
合計	腫瘍数	良性	3	1	1	2	1	1	2	0		0
		悪性	1	0	0	1	1	3	3	1		1
		腫瘍総数	4	1	1	3	2	4	5	1		1
	担腫瘍動物数	良性	3	1	1	2	1	1	2	0		0
悪性		1	0	0	1	1	2	3	1		1	
動物総数		4	1	1	3	2	3	5	1		1	

検査動物数：個別臓器に検査動物数の記載がないときは検査例数と同じ。

空欄は発生なし。(B)：良性 (M)：悪性

統計学的方法：Fisher の直接確率検定で有意差なし

主群の腫瘍性病変(1)

	性別	雄					雌				
	投与量 (ppm)	0	0.1	0.5	10	30	0	0.1	0.5	10	30
途中死亡											
	検査例数	28	21	26	26	26	20	20	26	15	14
副腎	検査動物数	28	21	25	25	25	20	20	26	15	14
	髓質褐色細胞腫 (M)				1			1			
肝臓	肝細胞癌 (M)	1				2					
	肝細胞腺腫 (B)	3	1	2		1					
	血管肉腫 (M)			1							
肺	肺腺腫 (B)	1		2		2	1	2		2	
	肺癌 (M)				3						
卵巣	腺腫 (B)	-	-	-	-	-			1		
脾臓	血管肉腫 (M)									1	
精巣	肝細胞腫 (B)		1	1			-	-	-	-	-
	セルトリ細胞腫 (M)			1			-	-	-	-	-
子宮	平滑筋腫 (B)	-	-	-	-	-	1	1			1
	血管腫 (B)	-	-	-	-	-	1			1	1
	血管肉腫 (M)	-	-	-	-	-			1		
腹部	検査動物数	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	骨原性肉腫 (M)	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
脚部	検査動物数	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	乳頭腫 (B)	-	-	-	-	-		1	-	-	
造血系	悪性リンパ腫 (M)	2	2	1	1	3	2	2		2	1
	組織球性肉腫 (M)	1	1	1					1		1
	顆粒球性白血病 (M)										1
ハタゲ腺	検査動物数	1	2	1	1	1	3	1	1	2	0
	腺腫 (B)			1	1	1					-
乳腺	検査動物数	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	癌 (M)	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
腸間膜	検査動物数	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
	中皮腫 (M)	1	-	-	-	-	0	-	0	-	-
骨格筋	検査動物数	1	0	2	1	0	1	0	0	0	0
	横紋筋肉腫 (M)		-				1	-	-	-	-
皮膚	検査動物数	18	14	11	7	17	4	6	7	5	2
	線維肉腫 (M)				1	1					
	肉腫 (M)		1						1		

検査動物数：個別臓器に検査動物数の記載がないときは検査例数と同じ。

空欄は発生なし。(B)：良性 (M)：悪性

統計学的方法：Fisher の直接確率検定で有意差なし

主群の腫瘍性病変(2)

	性別	雄					雌				
	投与量 (ppm)	0	0.1	0.5	10	30	0	0.1	0.5	10	30
最終屠殺											
	検査例数	24	31	26	26	26	32	32	26	37	38
副腎	検査動物数	24	0	0	1	26	32	1	0	0	38
	皮質腺腫 (B)		-	-				1	-	-	1
肝臓	肝細胞癌 (M)		1	2	1	3					
	肝細胞腺腫 (B)	7	2		6	5					1
	血管肉腫 (M)					1					
	血管腫 (B)					1	1				
肺	肺腺腫 (B)	3	5	4	1	6	2		1	1	1
	肺癌 (M)	4	3	5	5	2	5	6	1	2	3
卵巣	検査動物数	-	-	-	-	-	32	26	21	24	37
	乳頭腫 (B)	-	-	-	-	-	1				
	顆粒膜/莢膜細胞腫 (B)	-	-	-	-	-				2	
	腺腫 (B)	-	-	-	-	-		1			
脾臓	検査動物数	24	13	11	10	26	32	16	10	16	38
	血管肉腫 (M)			1						1	
精巣	検査動物数	24	1	3	5	26	-	-	-	-	-
	肝細胞腫 (B)					1	-	-	-	-	-
甲状腺	検査動物数	24	0	0	0	26	32	1	0	0	38
	濾胞腺腫 (B)		-	-	-	1					
子宮頸部	検査動物数	-	-	-	-	-	31	0	0	0	38
	平滑筋肉腫 (M)	-	-	-	-	-					1
子宮	検査動物数	-	-	-	-	-	32	25	19	26	38
	平滑筋腫 (B)	-	-	-	-	-	1	1		1	
	平滑筋肉腫 (M)	-	-	-	-	-					1
造血器	検査動物数	24	0	1	0	26	32	2	0	0	38
	悪性リンパ腫 (M)		-	1			1	2	-	-	
ハダ腺左	検査動物数	2	1	0	3	1	0	1	0	1	3
	癌 (M)			-		1	-				
ハダ腺右	検査動物数	2	3	0	3	1	0	1	0	1	3
	腺腫 (B)		2	-	1	1	-				
乳腺	検査動物数	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
	癌 (M)	-	-	-	-	-	1	-	1	1	-
その他	検査動物数	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
	由来不明癌 (M)	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-
皮膚	検査動物数	12	13	13	12	14	1	2	0	1	0
	基底細胞腫瘍 (B)			1							
	線維肉腫 (M)			1							
尾	検査動物数	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2
	血管腫 (B)	-	-		-	-	1	-	-	-	
舌	検査動物数	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	扁平上皮乳頭腫 (B)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

検査動物数：個別臓器に検査動物数の記載がないときは検査例数と同じ。

空欄は発生なし。(B)：良性 (M)：悪性

統計学的方法：Fisherの直接確率検定で有意差なし

主群の腫瘍性病変(3)

		性別		雄					雌				
		投与量 (ppm)		0	0.1	0.5	10	30	0	0.1	0.5	10	30
全動物													
		検査例数		52	52	52	52	52	52	52	52	52	
副腎	皮質腺腫(B)								1			1	
	髄質褐色細胞腫(M)				1				1				
肝臓	肝細胞癌(M)	1	1	2	1	5							
	肝細胞腺腫(B)	10	3	2	6	6						1	
	血管肉腫(M)			1		1							
	血管腫(B)					1	1						
肺	肺腺腫(B)	4	5	6	1	8	3	2	1	3	1		
	肺癌(M)	4	3	5	8	2	5	6	1	2	3		
卵巣	乳頭腫(B)	-	-	-	-	-	1						
	顆粒膜/莢膜細胞腫(B)	-	-	-	-	-				2			
	腺腫(B)	-	-	-	-	-		1	1				
脾臓	血管肉腫(M)			1						2			
精巣	間細胞腫(B)		1	1			-	-	-	-	-		
	セトリ細胞腫(M)						-	-	-	-	-		
甲状腺	濾胞腺腫(B)					1							
子宮頸部	平滑筋肉腫(M)	-	-	-	-	-					1		
子宮	平滑筋腫(B)	-	-	-	-	-	2	2		1	1		
	平滑筋肉腫(M)	-	-	-	-	-					1		
	血管腫(B)	-	-	-	-	-	1			1	1		
	血管肉腫(M)	-	-	-	-	-			1				
腹部	骨原性肉腫(M)	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-		
肢	乳頭腫(B)	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-		
造血系	悪性リンパ腫(M)	2	2	2	1	3	3	4		2	1		
	組織球性肉腫(M)	1	1	1					1		1		
	顆粒球性白血病(M)										1		
ハダカ腺	腺腫(B)		2	1	2	2							
	癌(M)					1							
乳腺	癌(M)	-	-	-	-	-	1	-	2	1	-		
腸間膜	中皮腫(M)	1	-	-	-	-				-	-		
その他	由来不明癌(M)	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-		
骨格筋	横紋筋肉腫(M)		-			-	1	-	-	-	-		
皮膚	基底細胞腫瘍(B)			1									
	線維肉腫(M)			1	1	1							
	肉腫(M)		1										
尾	血管腫(B)	-	-			-	1			-	-		
舌	扁平上皮乳頭腫(B)	1		-	-	-	-	1	-	-	-		
合計	腫瘍数	良性	15	11	11	9	19	9	6	2	7	5	
		悪性	9	8	14	12	14	10	12	6	7	8	
		腫瘍総数	24	19	25	21	33	19	18	8	14	13	
	担腫瘍動物数	良性	14	11	8	9	17	8	6	2	5	5	
		悪性	9	8	12	11	12	8	11	6	7	8	
		動物総数	20	16	17	18	17	16	15	8	12	12	

空欄は発生なし。(B): 良性 (M): 悪性

統計学的方法: Fisher の直接確率検定で有意差なし

1-12. 繁殖性に及ぼす影響及び催奇形性

(1) ラットにおける 2 世代繁殖試験

(資料 23)

試験機関:

(GLP 対応)

報告書作成年:

検体純度:

供試動物: Sprague-Dawley (CrI: CD) 系ラット、1 群雌雄各 30 匹、試験開始時 6 週齢
体重 雄 115~168g、雌 99~140g

投与期間: P 世代: 投与開始 (7 週齢) から F1b 児離乳までの約 30 週間
(なお、300ppm 群は F1a のみとした)

F₁ 世代: 投与開始 (離乳時) から F2 児の離乳までの約 23 週間

F2 世代: 離乳まで

(10 月 22 日 ~ 7 月 11 日)

投与方法: 検体を 0、3、30 及び 300ppm の濃度になるように直接、基礎飼料に混入した混餌を自由に摂取させた。対照群には基礎飼料のみ摂取させた。混餌は毎週調製した。

用量設定根拠: 予備試験で、1、5、30、100 及び 500ppm を各群雌雄 6 匹に混餌投与した。500ppm 群では、第 1 週に雌雄に死亡例がみられ、摂餌量、着床数、児生存率、産児数にも影響がみられた。なお 100ppm 群では投与初期の数週の体重増加に影響がみられ、摂餌量にも影響がみられた。そこで本試験では最大投与量を 100ppm と 500ppm の中間の 300ppm とした。

交配・調整・選抜及び観察・検査項目: 概要を次頁にまとめた。

世代	期間	作業手順	観察/検査項目	
P	生育(10週)	雌雄 1:1 で交配。交配は膣垢検査で精子又は膣栓の有無で確認(妊娠0日)。	一般状態・生死：毎日観察。 体重：週1回測定。 摂餌量：週1回測定。 同居10日前から発情周期検査 交配状況の観察	
	交配(3週)		体重：妊娠0、6、13、20日に測定	
	妊娠(3週)			
	F1a	出産	(哺育1日)	出産状況の観察 新生児数、死産児数、外表異常、性別、生存児体重測定。
		哺育(25日)	哺育4日に1腹の同腹児数を雄4匹、雌4匹に調整(不可能なとき、合計8匹)。	母動物： 体重：哺育1、4、7、14、21、25日に測定。 児動物： 生存児数：毎日観察。 性別：生後1、4(調整前)、7、14、21、25日に判定。 体重測定：生後1、4(調整前)、7、14、21、25日に測定。 外表/内臓異常検査：死亡児及び生後4日目屠殺の新生児について。 発育検査：耳介展開、毛生、切歯萌出、眼瞼開裂
		離乳	継代用の各群雌雄各30匹を各腹からできる限り1匹ずつ無作為に選抜。	児動物：継代用に選抜しなかった離乳児の肉眼的病理検査。
		休息(10日)		(発情周期検査はせず) 体重：300ppm群を含め毎週測定。
		交配(3週)	対照群、3及び30ppm群のみ2回目交配(F1aに準ずる)	(F1aに準ずる)
		妊娠(3週)		(F1aに準ずる)
	F1b	出産	(哺育1日)	(F1aに準ずる)
哺育(25日)			(F1aに準ずる)	
離乳		親/離乳児動物の屠殺	親動物： 肉眼的病理検査：全群の全動物について。 病理組織学的検査：対照群と高用量群の全動物の生殖器。全群の全動物の甲状腺、肝臓、肉眼的異常組織。 切迫殺/死亡動物全例について。 臓器重量の測定：肝臓、精巣、精巣上体、前立腺、精囊、卵巣、子宮、甲状腺及び上皮小体、下垂体。 離乳児：肉眼的病理検査。	
F1	生育(10週)	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)	
	交配(3週)		(P世代に準ずる)	
	妊娠(3週)		(P世代に準ずる)	
F2	出産	(哺育1日)	(P世代に準ずる)	
	哺育(25日)	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)	
	離乳	親/離乳児動物の屠殺	(F1世代に準ずる)	

親動物

一般状態及び死亡率：全動物の全検査期間に一般状態及び生死を毎日観察した。

体重：交配前投与期間中及び交配期間中、毎週体重を測定した。交配雌は妊娠 0、6、13、20 日及び哺育 1、4、7、14、21 及び 25 日に体重を測定した。

摂餌量：交配前投与期間中、週 1 回 10 週間測定した。

検体摂取量：生育期間の体重、摂餌量及び飼料中の設定検体濃度から検体摂取量 (mg/kg/日) を算出した。

交配及び妊娠の確認：雌の性周期を同居 10 日前から確認し、雌雄 1:1 で同居させ、翌朝陰栓の形成または陰垢中の精子の有無により交尾を確認した。確認日を妊娠 0 日とした。

繁殖性に関する指標：交配、妊娠及び哺育期間と剖検時の観察に基づき、以下の指標を算出した。

交尾までの日数 = 同居 1~4、5~8、9~12、13~16、17~21 日の間に交尾した雌の割合として示し、同居 1~4 日の交尾率を表に示した。

交尾率 (%) = 交尾した動物数 / 交配に用いた動物数 x 100

妊娠率 (%) = 妊娠した動物数 / 交尾した動物数 x 100

受精・受胎率 (%) = 妊娠した動物数 / 交配に用いた動物数 x 100

出産率 (%) = 生存児を有する動物数 / 妊娠した動物数 x 100

妊娠期間 = 交配日 (妊娠 0 日) から出産日 (哺育 1 日) までの日数。

着床数：剖検時に子宮内の着床痕数を数え、着床後生存率 (= 分娩総児数 / 子宮内着床痕数 x 100) を算出した。

臓器重量：肝臓、精巣、精巣上体、前立腺、精囊、卵巣、子宮、甲状腺及び上皮小体、下垂体の重量を測定し、対体重比を算出した。

肉眼的病理検査：すべての P 及び F1 親動物について児の離乳後に剖検を行なった。

病理組織学的検査：対照群と高用量群の P 及び F1 親動物について、生殖器官 (雄の精巣、精巣上体、精囊、凝固腺及び前立腺、雌の卵巣、頸部を含む子宮及び膈) 及び全群の全動物の甲状腺、肝臓、下垂体、肉眼的異常組織並びに切迫殺/死亡動物全例について、病理標本を作製し、鏡検した。

児動物：

一般状態及び死亡率：全動物の全検査期間に一般状態及び生死を毎日観察した。

出産時に新生児数、生存児数、死産児数を調べた。

生存児に関し以下の指標を算出した。

$$\text{出生時生存児率(\%)} = \text{生存児数} / \text{総新生児数} \times 100$$

$$\text{生後4日生存率} = \text{生後4日の生存児数} / \text{生後1日の生存児数} \times 100$$

生後7、14、21及び25日生存率

$$= \text{生後7、14、21及び25日の生存児数} / \text{生後4日の調整後児数} \times 100$$

性別：生後1、4(調整前)、7、14、21、25日に判定し、性比(=雄：雌)を算出した。

体重： 哺育1、4、7、14、21及び25日に雌雄別に1腹分をまとめて重量を測定し、腹及び児当たりの平均体重を求めた。

発育検査：耳介展開、毛生、切歯萌出、眼瞼開裂日について検査した。

肉眼的病理検査：死亡児及び生後4日目屠殺の新生児並びに離乳時の屠殺動物全例について剖検した。

試験結果：

親動物：

一般状態：両世代において、検体投与に起因すると考えられる痙攣が次表のとおり、300ppm群の母動物及び児動物(生後14~20日)に認められた。

群	P世代-児F1		F1世代-児F2	
	痙攣発生動物数	発生時期	痙攣発生動物数	発生時期
300ppm	母動物：4例	3例：試験1週 2例：哺育14日	母動物：1例	妊娠20日
	児動物：13例(9腹)	生後14~20日	児動物：5例(4腹)	哺育15~18日

死亡率：P世代において、300ppm群の計7例(雄2例、雌5例)が死亡あるいは切迫殺された。うち雌雄各1匹は1週目に共食いされ交換した(試験結果の表には含めなかった)が、雌2/4例は痙攣を発現し、検体投与に関連した死亡と考えられた。30ppm群の雄1例(筋制御の低下)及び対照群の雌1例(一般状態の悪化)を切迫屠殺した。

F1世代において、300ppm群雌の計3匹が死亡あるいは切迫殺された。1例は死亡発見、他の1例は痙攣等を発現し切迫殺した。これらは検体投与に関連する可能性が高かった。又、30及び300ppm群の雌各1例を分娩中に、また口腔前庭の外傷のある対照群の雌1例を切迫殺した。

死亡例に投与関連性のある肉眼的及び組織学的変化は認められなかった。

体重：P世代において、300ppm群の雌雄とも生育期の摂餌量の有意な低下を伴い、体重あるいは体重増加の有意な抑制あるいは抑制傾向が認められ、妊娠時及び哺育時の体

重の抑制も認められた。30ppm 群雌雄及び 3ppm 群雌の生育期の体重増加が 1 週目のみ有意な抑制がみられたが、一過的でごく軽微な変化であり、摂餌量及び体重に影響がないので偶発的で、投与に関連がないと考えられた。

F1 世代において、雄は生育時のわずかな摂餌量の抑制を伴い、生育期の体重あるいは体重増加の抑制が認められた。雌では 1 週目の体重の有意な抑制、妊娠時及び哺育時の体重の抑制が認められた。

摂餌量及び食餌効率: 300ppm 群の P 世代雌雄の摂餌量は対照群に比べて有意に減少し、1 週の食餌効率が低下したが、以後は対照群と差がみられなかった。F1 世代の同群の雄は抑制傾向がみられたが、雌では対照群と差がほとんどなかった。

親動物の交配能力及び繁殖能力: 性周期に投与の影響はなく、P 世代では検体投与の影響は認められなかった。F1 世代では 300ppm 群で交尾率が 83% と有意に低下したが、背景データの範囲内であった (背景データ: 雄 83~100% 及び雌 92~98.1%)。また、授精率及び受胎率もやや低下したが、背景データの範囲内であった (雌雄 80% に対し、背景データ 75~100%)。着床後生存率も低下した。これ以外の繁殖諸指標に投与による明らかな影響はなかった。

臓器重量: 肝臓及び甲状腺の重量は 30 及び 300ppm 群の雌雄で P 及び F1 親動物とも高値を示した。卵巣重量は 300ppm 群の P 母動物では有意に低く、F1 母動物は絶対重量のみ有意に低かった。下垂体重量は F1 母動物で 30 及び 300ppm 群とも有意に低かった。

その他に表のように絶対重量あるいは相対重量に有意な変化がみられたが、変化の方向が一致していないこと及び病理組織学的に変化もないことから投与の影響とは考えられなかった。

病理学的所見: 肉眼的にはいずれの親動物とも特記すべき変化は認められなかった。

組織学的に、300ppm 群では、両世代の母動物の肝臓に細葉中心性肝細胞脂肪性空胞化、両世代の雌雄で甲状腺濾胞上皮過形成及び P 世代の母動物の膈に発情後期像の増加が認められたが、発情後期像の増加^{申請書注}は後述のように検体投与の影響ではないと判断した。30ppm 群では F1 母動物の甲状腺に濾胞上皮過形成の増加が認められた。

児動物

一般状態: 300ppm 群において、F1 児動物のうち 9 腹の児 13 匹が生後 14~20 日に、又 F2 児動物のうち 3 腹の児 4 匹が生後 15 日に、他の腹の 1 匹が生後 18 日に痙攣を発現した。

出産児数及び生存児数：300ppm 群において、F1a 児動物は腹当たり出産児数及び生存児数とも有意に少なく、又 F2 児動物でも生存児数が有意に少なかった。出生児の性比に投与による影響はみられなかった。

体重：300ppm 群では、F1 及び F2 児動物とも出生時から生後 25 日の離乳まで体重が有意に低かった。発育検査では切歯萌出が F1 児動物でのみ有意に遅延したが、耳介展開、毛生及び眼瞼開裂には F1 及び F2 児動物とも有意な差は認められなかった。

生存率：300ppm 群では、F1 及び F2 児動物とも出生時及び生後 4 日の生存率が有意に低かった。

肉眼的所見：F2 児動物の生後 4 日の屠殺児に小型動物が多く認められた以外に、特記すべき変化は認められなかった。

以上の結果より、ラットに検体を 0、3、30 及び 300ppm の混餌濃度で 2 世代にわたり反復投与した結果、300ppm 群では親動物に数例の死亡が認められ、死亡前に痙攣が発現した場合は多かった。児動物でも、親動物の混餌を摂取し始める頃に痙攣がみられた。母体重の増加抑制、交尾率の低下 (F1 世代のみ)、肝臓及び甲状腺重量の増加、肝臓に細葉中心性肝細胞脂肪性空胞化、甲状腺濾胞上皮過形成の増加が認められた。下垂体重量は F1 母動物で有意に低かったが、病理組織学的に変化もなかった。児動物では腹当たり出生児数及び生存児数の低下、児体重の低下が出生時から離乳児まで認められ、F1 児で切歯萌出のわずかな遅延が認められた。

30ppm 群では、親動物で肝臓及び甲状腺 (F1 世代は雌のみ) 重量の増加、下垂体重量の低下 (F1 世代雌のみ)、病理組織学的には甲状腺濾胞上皮過形成の増加が F1 世代雌に認められたのみであった。児動物で影響は何ら認められなかった。

従って、親動物に対する無毒性量は 3ppm (P：雄 0.251 mg/kg、雌 0.28 mg/kg、F1：雄 0.24 mg/kg、雌 0.26 mg/kg)、児動物に対する無毒性量は 30ppm (F1：雄 2.54 mg/kg、雌 2.71 mg/kg、F2：雄 2.54 mg/kg、雌 2.71 mg/kg) と考えられた。繁殖能に関し、本試験を通して 300ppm では交尾率や着床後生存率の有意な低下が認められたが、30ppm では影響が認められなかった。

申請者注 1 (単回経口投与等により生じる可能性のある毒性影響と無毒性量について)：

300 ppm 群では P 世代の親動物で投与 1 週に、雌で痙攣が、雌雄で体重増加抑制が認められた。300 ppm 群の児動物では、F1 および F2 世代ともに生存率の低下が認められた。30 ppm 群の親動物および児動物では、単回経口投与等により生じる可能性のある毒性影響は認められなかった。従って無毒性量は、親動物、児動物ともに 30 ppm (親動物：雄 2.54 mg/kg、雌 2.77 mg/kg、児動物：雄 2.54 mg/kg、雌 2.71 mg/kg) と判断される。

申請者注 2(発情後期像の発現増加について) :

残留農薬安全性評価委員会から、「ラットを用いた 2 世代繁殖試験における 300ppm 群親動物での発情後期像の発現増加についての説明」を求められ、下記のように回答した。

回答の要旨

膣の発情後期像に関しては親 P 及び親 F1 について、対照群及び高用量群のみ検査を実施し、3 及び 30ppm 群は肉眼的病変のみ検査する試験計画であった。したがって、肉眼的病変(3ppm 群の 1 例)についてのみ、膣の病理組織学的検査が行われた。

300ppm 群 P 動物の膣の発情後期像の発現増加に関しては、以下の理由から本剤投与の影響ではないと判断した。

- (1) P の対照群では a 及び b の 2 産を得ているが、300ppm 群では a の 1 産のみしか得ていない事から、対照群と 300ppm 群とでは薬剤投与以外に検査時の妊娠・出産の履歴も異なり、両群間の有意差について薬剤投与の影響か否かは不明である。
- (2) F1 世代に於いては対照群と 300ppm 群は各々 1 産のみであり、その発情後期像の頻度に有意な差は認められなかった。
- (3) P 及び F1 とも本剤の投与開始後、交配直前に観察した性周期は何れの投与群でも 4~5 日の範囲内にあり正常であった。
- (4) P 解剖時の 1 周期の日数は不明であるが、病理所見から対照群及び 300ppm 群共に発情前期、発情期、発情後期、発情間期の各ステージが存在し、性周期が巡っていた。
- (5) さらに下垂体、卵巣の病理所見に異常が認められなかった等から、視床下部-下垂体-性腺系に対して影響を及ぼしたと考えられる現象は見出せなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

親動物

世代		親 : P 児 : F1				親 : F1 児 : F2				
投与量 (ppm)		対照群	3	30	300	対照群	3	30	300	
動物数	雄	30	30	30	30	30	30	30	30	
	雌	30	30	30	30	30	30	30	30	
死亡/切迫殺数 ¹	雄	0	0	1	2	0	0	0	0	
	雌 a	0	0	0	1 妊娠時 3 哺育時	1 妊娠時	0	1 難産	1 難産 2 哺育時	
	雌 b	1								
交尾動物数	雄	30/29	30/30	30/30	30/-	30	29	29	25	
	雌	30/29	30/30	30/30	30/-	30	29	30	25	
授精動物数		27/29	30/30	29/30	30/-	27	29	27	24	
受胎動物数		27/29	30/30	29/30	30/-	27	29	28	24	
出産雌数		26/29	30/30	29/30	30/-	26	29	27	24	
出産 1 日に生存児を有する雌数		26/29	30/30	29/30	29/-	26	27	27	20	
離乳時に生存児を有する雌数		26/28	30/29	28/30	24/-	26	27	27	13	
性周期	(検体投与に起因する異常は認められなかった)									
一般状態	交尾率 (%)	雄	100/97	100/100	100/100	100/-	100	97	97	83↓
		雌	100/97	100/100	100/100	100/-	100	97	100	83↓
	妊娠率 (%)		90/100	100/100	97/100	100/-	90	100	93	96
	授精率 (%)		90/97	100/100	97/100	100/-	90	97	90	80
	受胎率 (%)		90/97	100/100	97/100	100/-	90	97	93	80
	出産率 (%)		96/100	100/100	100/100	100/-	100	97	96	96
	妊娠期間 (日)		21.4/22.6	22.4/22.7	22.4/22.7	23.4/-	22.5	22.9	22.6	22.7
	着床数/腹						14.9	14.1	15.1	14.6
着床後生存率 (%)						90	84↓	85	81↓	
一般状態	雄									
	雌				痙攣				痙攣	
体重 (%)	雄生育期	1 週							78↓	
		10 週		98	97	93			86	
	雌生育期	1 週		98	96	87			83↓	
		10 週		97	97	93			96	
	雌妊娠時	0 日			99/98	94↓/-			93↓	
		20 日			99/98	90/-			93↓	
雌哺育時	1 日				92↓/-			88↓		
	25 日				91↓/-			87↓		
体重増加 (%)	雄生育期	0-1 週			93↓					
		0-10 週			96	91↓			89↓	
	雌生育期	0-1 週		93↓	93↓	58↓				
		0-10 週				91↓				
雌妊娠時	0-20 日			99	82↓					
雌哺育時	1-25 日									
生育期摂餌量 (%)	雄			98	92↓				94	
	雌			96	91↓				104	
生育期検体摂取量 (mg/kg)	雄	0	0.25	2.54	24.74	0	0.24	2.54	27.32	
	雌	0	0.28	2.77	27.51	0	0.26	2.71	29.28	

¹: 投与 1 週に死亡した動物は含めず。

a は 1 産、b は 2 産。例えば 30/29 は 1 産の値/2 産の値。300ppm 群の F1b は試験せず。

統計学的方法: t-検定: 体重、摂餌量; ↓: p<0.05 ↓↓: p<0.01 ↓↓↓: p<0.001 矢印のない数値は有意差なし。

体重、体重増加及び摂餌量は変動の目安として対照群に対する比率を示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

親動物(続き)

世代		親 : P				親 : F1				親 : F1				児 : F2				
投与量 (ppm)		対照群	3	30	300	対照群	3	30	300	対照群	3	30	300	対照群	3	30	300	
動物数	雄	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	
	雌	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	
臓器重量 (%)	雄	最終体重			95	92↓											86↓	
		肝臓			103/109↑	137↑/149↑											113↑/116↑	120↑/139↑
		甲状腺			114↑/120↑	152↑/160↑											127↑/130↑	147↑/168↑
		精巣上体															92↓/107	
	精巣															93↓/109↑		
	雌	最終体重				90↓												81↓/80↓
		下垂体				81↓/90					94/87↓						81↓/80↓	75↓/78↓
		肝臓			109↑/109↑	116↑/130↑											111↑/117↑	141↑/146↑
卵巣					71↓/79↓												86↓/91	
甲状腺				138↑/156↑											117↑/117↑	143↑/147↑		
肉眼的病理所見(雌雄)		いずれの世代においても検体投与に起因する異常は認められなかった。																
病理組織学的所見(所見発生日数/検査動物数)																		
肝臓: 細葉中心性肝細胞脂肪性空胞化		(所見なし)																
雄		0/29	0/30	0/30	9/26↑	1/29	1/30	2/29	6/27↑									
雌																		
甲状腺: 濾胞上皮過形成																		
雄		0/30	0/30	2/29	10/29↑	0/28	2/30	3/30	9/30↑									
雌		0/29	0/30	0/30	6/26↑	0/29	0/30	7/29↑	15/27↑									
腫: 発情後期像																		
雌		13/29	1/1		19/25↑	21/29			21/27									

統計学的方法: Dunnett 検定: 最終体重、肝臓、下垂体、甲状腺 (F1 雄絶対、P 雌絶対及び相対)、卵巣 (P 絶対を除く); Behren's-Fisher's 検定: 甲状腺 (P 雄絶対及び相対、F1 雄絶対、F1 雌絶対及び相対)、F1 雌肝臓、P 卵巣相対; Fisher 直接確率検定: 病理組織所見
 ↑↓: p<0.05 ↑↓: p<0.01 ↑: p<0.001 矢印のない数値は有意差なし。
 臓器重量は変動の目安として対照群に対する比率を絶対重量/相対重量で示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

児動物

世代		親 : P				親 : F1				
投与量 (ppm)		対照群	3	30	300	対照群	3	30	300	
動物数	雄	30	30	30	30	30	30	30	30	
	雌	30	30	30	30	30	30	30	30	
出産日に生存児を有する雌数		26/29	30/30	29/30	29/-	26	28	27	23	
総産児数	合計	384/457	416/452	410/447	350/-	353	342	362	255	
	生存児数	378/453	410/448	408/444	291/-	353	337	358	220	
	死亡児数	6/4	6/4	2/3	59/-	0	5	4	35	
性比(雄:雌)	出生時 a	1:1.04	1:1	1:0.89	1:0.91	1:0.99	1:0.96	1:1.09	1:0.91	
	b	1:0.97	1:1.02	1:1.01						
	離乳時 a	1:1.04	1:0.99	1:0.98	1:0.91	1:0.90	1:0.95	1:0.96	1:1.07	
	b	1:1.02	1:1	1:1.03						
児体重 (g)	生後 1 日	雄	6.7/6.6	6.8/6.8	6.5/6.7	6.3↓/-	6.5	6.7	6.5	6.0↓
		雌	6.3/6.2	6.5/6.4	6.1/6.3	5.9↓/-	6.1	6.3	6.1	5.5↓
	生後 4 日 調整前	雄	9.9/9.6	10.2/9.8	9.7/9.6	8.8↓/-	9.8	10.3	9.9	8.6↓
		雌	9.3/8.8	9.7/9.3	9.2/8.9	8.3↓/-	9.1	9.7	9.2	7.8↓
	生後 25 日	雄	90.1/90.1	90.2/90.4	86.7/88.8	69.9↓/-	84.3	88.1	84.7	66.7↓
		雌	84.4/84.2	85.1/85.1	81.9/82.6	66.3↓/-	79.3	83.2	79.6	62.0↓
腹当たり	出産児数	14.8/15.8	14.0/15.1	14.1/14.9	12.1↓/-	13.6	11.9	13.4	11.8	
	生存児数	14.0/15.6	13.7/14.9	14.1/14.8	10.0↓/-	13.6	12.5	13.3	10.5↓	
生存率 (%)	出生時	98/99	98/99	100/99	83↓/-	100	98	99	78↓	
	生後 4 日	97/98	99/99	97/99	89↓/-	98	99	98	73↓	
	生後 7 日	100/100	99/96	98/100	100/-	100	98	98	98	
	生後 14 日	100/99	99/95	98/100	100/-	100	97	98	96	
	生後 21 日	100/99	99/95	98/100	98/-	100	97	98	92	
	生後 25 日離乳率 (%)	100/99	99/95	98/100	97/-	100	97	98	92	
発育検査 (生後日数)	耳介風開	有意差なし								
	毛生	有意差なし								
	切歯萌出開始日	9.7/9.4	9.4/9.1	9.7/9.4	10.4↑/-	有意差なし				
	開眼	有意差なし								
肉眼的病理検査										
生後 4 日屠殺児 小型(発生率%:腹数)		検体投与に起因する異常なし				2.8:1/23	3.2:4/23	8.7:3/26	37.3:7/11	
生後 25 日離乳児(発生率%)		検体投与に起因する異常なし								

a は 1 産、b は 2 産。例えば 30/29 は 1 産の値/2 産の値。300ppm 群の F1b は試験せず。
 統計学的方法: t-検定: 児体重、腹当たり個数; Mann-Whitney 片側検定: 生存率、発育検査。
 ↓: p<0.05 ↓↓: p<0.01 ↓↓↓: p<0.001 矢印のない数値は有意差なし。

(2) ラットにおける混餌投与による発達神経毒性試験 (資料 24)

試験機関:

(GLP 対応)

報告書作成年:

検体純度:

供試動物: Sprague-Dawley 系妊娠ラット (CrI: CD BR)、交尾開始時 64 日齢、

妊娠 0 日体重範囲: 雌 208.3~320.6g、1 群 30 匹

投与期間: 妊娠 6 日~哺育 10 日まで (3 月 14 日~ 5 月 3 日)

投与方法: 検体をアセトンに溶解して、0、0.5、10 及び 200ppm の混餌を調製し、妊娠 6 日~哺育 10 日まで毎日給餌した。対照群には溶媒を混合した飼料を給餌した。産栓あるいは精子の確認された日を妊娠 0 日とした。

観察・検査項目: 観察・検査の概要を表 1 にまとめた。

親動物: 一般状態及び生死を毎日観察した。

詳細な身体検査は攻撃性、鼻漏、ラッセル音、血涙、流涙、角膜混濁面積、脱毛、肛門生殖器の汚染及び一般状態、腹部の形及び糞の硬さ、腫瘤の触診、異常行動等について観察した。体重、摂餌量を測定した。

途中死亡母動物及び最後の腹が離乳後に屠殺した母動物について剖検を行った。

児動物: 生存及び死亡児数、性別の判定、体重の測定及び外表異常の観察、発育検査、自発運動量 (1 セッション 5 分間で 60 分測定)、聴覚驚愕 (1 セッション 10 試行の 5 ブロック) 及び遊泳/学習/記憶の検査 (水 Y 迷路で連続 6 回学習、ついで 25、30、61 及び 65 日に短期及び長期記憶について各 2 試行) を行った。

死亡児及び生後 4 日に淘汰した新生児の剖検あるいは胃内のミルクの有無を検査した。

生存動物について、生後 11 及び 60 日に腹当たり雌雄各 1 匹を屠殺し、剖検を行ない、脳を摘出して重量を測定した。この屠殺動物から群当たり雌雄各 6 匹を選定し、神経病理学的検査及び病理組織学的検査を行った。

生後 11 日屠殺児の神経病理検査: 脳重量を測定後直ちに固定して、大脳皮質、海馬、基底神経節、中脳、脳幹及び小脳のパラフィン包埋切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色、ルクソールファストブルー染色及びセビエール・ムンガー染色して組織標本を作製して鏡検した。

生後 60 日屠殺児の神経病理検査: 灌流固定後、脳、脊髄、末梢神経 (坐骨、脛骨、腓腹) を摘出した。対照群及び高用量群の脳及び脊髄は生後 11 日の場合と同様の

組織並びに頸髄、胸髄及び腰髄(横断及び縦断切片)を同様に染色して標本を作製した。末梢神経はプラスチック包埋切片を作成し、トルイジンブルー染色して、組織標本を作製して鏡検した。

全ての検査が終了後、残りの児動物を屠殺して肉眼的病理検査を行った。

表 1 観察/検査の概要

世代	期間	作業手順	観察/検査項目
P	交配	雌雄 1:1 で交配。朝に膣垢検査後、夜同居させた。妊娠は精子又は膣栓の有無で確認(妊娠 0 日)。	交配状況の観察 一般状態・生死：毎日観察。
	妊娠		体重：妊娠 0、6、10、15、20 日に測定 詳細な身体検査：妊娠 0 日、投与期間中毎日、哺育 14、21 日、離乳後は毎週観察 摂餌量：体重測定日に測定
F1	出産	(全胎児出産日を哺育 0 日)	出産状況の観察 新生児数、死産児数、外表異常、性別、生存児体重測定。
	哺育	哺育 4 日に 1 腹の同腹児数を雄 4 匹、雌 4 匹に調整(不可能なとき、合計 8 匹)。	母動物： 体重：哺育 0、4、11、21 日に測定 肉眼的病理検査：途中死亡動物を含め全群の全動物を対象として検査
	哺育 10 日	投与終了	児動物： 生存児数：生後 0、4、11、17、21 日に観察 性別：生後 0、4、11、17、21 日に判定
	離乳 (21 日)	母動物の屠殺	体重測定：生後 0、4、11、17、21 日、離乳後毎週測定 肉眼的病理検査：死亡児及び生後 4 日屠殺の児動物を対象として胃のミルクの有無を含め検査 発育検査：耳介展開、毛生、切歯萌出、眼瞼開裂、臍開口、包皮分離 自発運動量：生後 13、17、22、60 日に測定(雌雄各 1 例/腹) 聴覚驚愕検査：生後 22、60 日(雌雄各 1 例/腹) 遊泳：生後 6、8、10、12、14 日(雌雄各 1 例/腹) 学習(Y 迷路)：生後 24、60 日(雌雄各 1 例/腹) 記憶(Y 迷路)：生後 25、30、61、65 日(雌雄各 1 例/腹)
生後 60 日	児動物の屠殺	肉眼的病理検査：死亡児及び生後 4 日屠殺例対象；胃のミルクの有無を含む 脳重量の測定：生後 11、60 日(雌雄各 1 例/腹) 肉眼的病理検査：生後 11、60 日(雌雄各 1 例/腹) 神経病理学的検査：生後 11、60 日(雌雄各 6 例/群) その他の動物：全ての検査が終了後、屠殺して肉眼的病理検査	

結果：

母動物：

表 1. 母動物の成績

投与量 (ppm)		0	0.5	10	200
群当り動物数		30	30	30	30
妊娠/出産雌数		27	29	29	29
死亡雌数 (哺育時)					2
妊娠/出産率 (%)		90.0	96.7	96.7	96.7
一般症状		特記すべき異常なし			
体重 (%)	妊娠時	10 日			84↓
		15 日			95↓
		20 日			91↓
	哺育時	0 日			88↓
		4 日			89↓
		11 日			
体重増加 (%)	妊娠時	6-10 日			-153↓
		10-15 日			140↑
		15-20 日			
	哺育時	6-20 日			72
		0-4 日			72
		4-11 日			583↑
摂餌量 (%)	妊娠時	11-21 日			
		6-10 日			49↓
		10-15 日			
検体摂取量 (mg/kg/日) 妊娠時*		0	0.05	0.91	15.17
妊娠期間 (日)		22.1	22.0	22.0	22.0
肉眼的所見		特記すべき異常なし			

*: 報告書では 5 日間の平均摂取量が計算されているが、投与期間中の摂取量は申請者が算出した。
統計学的方法: Dunnett 検定-体重、摂餌量、妊娠期間; Fisher 直接確率検定-妊娠率、死亡率
↑↓: p<0.05 ↑↓: p<0.01 矢印のない数値は有意差なし。
体重、体重増加及び摂餌量は変動の目安として対照群に対する比率を示す。

死亡率: 200ppm 群で 2 例が哺育 6 及び 9 日に死亡した。死亡前に、異常所見がなく、剖検で肺の退色が認められたのみであったことから、検体投与の影響ではないと考えられた。

一般状態・身体検査: 投与に起因する悪影響は認められなかった。

妊娠/哺育時体重: 200ppm 群において、妊娠時体重は対照群に比し有意に抑制された。体重増加も対照群に比し妊娠時、特に投与初期 (妊娠 6~10 日) に抑制され、その後投与に対し適応がみられ、体重増加は増加した。哺育時体重は妊娠時体重の影響で初期 (哺育 0~4 日) に有意に抑制されたが、その後回復し、対照群との差は認められなかった (哺育 10 まで投与)。

妊娠時摂餌量：200ppm 群で投与初期(妊娠 6~10 日)に対照群に比し、有意な減少が認められたが、その後、対照群との差は認められず、動物が飼料に対して適応したことを示唆している。

妊娠/出産率、妊娠期間：検体の投与に起因する影響は認められなかった。

肉眼的所見：特記すべき異常は認められなかった。

児動物：

表 2 児動物の成績

投与量 (ppm)		0	0.5	10	200	
妊娠/出産雌数		27	29	29	29	
死亡雌数(哺育時)					2	
生存胎児数	生後 0 日	雄	208	224	218	224
		雌	190	220	226	204
腹当り児数(出生時)	生存	合計	14.7	15.3	15.3	14.8
		雄	7.7	7.7	7.5	7.7
		雌	7.0	7.6	7.8	7.0
	死亡	0.1	0.2	0.2	1.1↑	
平均体重(g)	雄	生後 0 日	6.5	6.5	6.3	5.9↓
		生後 4 日(調整前)	10.7	10.4	10.0↓	7.7↓
		生後 4 日(調整後)	10.7	10.3	10.0↓	7.8↓
		生後 17 日	41.7	41.2	38.9↓	31.3
		生後 21 日	53.9	52.1	50.4	41.3↓
	雌	生後 0 日	6.2	6.1	5.9↓	5.7↓
		生後 4 日(調整前)	10.3	9.7	9.4↓	7.5↓
		生後 4 日(調整後)	10.3	9.7↓	9.4↓	7.5↓
		生後 17 日	40.3	39.2	36.7↓	29.5↓
		生後 21 日	51.6	49.4	47.8↓	38.5↓
性比(雄/雌)	生後 0 日	1.1	1.0	1.0	1.1	
	生後 4 日(調整後)	0.9	1.1	1.0	0.9	
	生後 21 日	0.9	1.1	1.0	0.9	
生存率%	出生時	99.1	98.9	98.4	93.0	
	4 日(調整)	98.9	95.7	98.3	75.5↓	
	離乳率(%) (腹数)	86.927)	86.829)	87.129)	81.923)	
発育検査(日)	耳介展開	2.5	2.6	2.5	3.0↑	
	下顎切歯萌	11.4	11.6	11.4	12.1↑	
	上顎切歯萌	10.3	10.5	10.4	10.9↑	
	陰開口 ^a	31.4	32.0↑	31.6	32.9↑	
	包皮分離 ^a	44.0	44.7	45.4↑	48.8↑	
肉眼的所見		特記すべき異常なし				
神経病理学的所見		特記すべき異常なし				

統計学的方法：Dunnett 検定：体重、児数、出生率、生存率、離乳率、遊泳、学習/記憶、陰開口、包皮分離
多変量プロフィール分析：耳介展開、切歯萌出 Cox 比例ハザード回帰モデル：陰開口、包皮分離

↑↓: p<0.05 ↓↓: p<0.01 †: p<0.005 *: 報告書に有意水準の記載なし。*及び矢印のない数値は有意差なし。

a: 報告書で有意水準が明らかでないため申請者が Dunnett 検定を実施した。

体重、体重増加及び摂餌量は変動の目安として対照群に対する比率を示す。

児数/生存率：200ppm 群において、出生時の死産児数の増加がみられたが、出産児数が多く、生存児数に影響はなかった。生存率は出生時にわずかに低く(有意差なし)、生後4日の調整前では有意に低かった。4腹の児は生後4日までに全て死亡し、腹の離乳率は $23/27=85\%$ (対照群は100%)であった。

児体重：200ppm 群の体重は出生時から離乳まで対照群より低く、雌雄とも哺育期間中有意に体重増加が抑制された。10ppm 群でも体重はわずかに抑制され、雌では哺育期間中有意に体重が低く、雄では生後4及び17日に有意に低かったが、体重増加は対照群と同等であった。0.5ppm 群で雌の生後4日調整後、体重が有意に低かったが、対照群との差はわずかであり、調整前の体重と差がなく、離乳時の体重に対照群との差もないことから毒性学的に意義がないと考えられた。

性比：検体投与の影響は認められなかった。

死亡児の観察：検体投与の影響は認められなかった。

発育指標：200ppm 群雌雄の耳介展開、上および下顎切歯萌出、膈開口及び包皮分離に遅延がみられた。10ppm 群雄の包皮分離にも遅延(45.4日)がみられたが、変動の範囲内(既実施の他の試験 $n=23$ で平均45.0日、範囲41.8~49.7日)であり毒性学的に意義はないと考えられた。

※：申請者が実施した Dunnett 検定の結果、0.5ppm 群において膈開口が有意に遅延したが、10ppm では対照群と同等であることから偶発的なものと考えられる。申請者が実施した膈開口および包皮分離の統計検定の結果は本試験で用いた統計検定と同等の結果であったと考える。

聴覚驚愕反応(表3)：200ppm 群で反応に変化がみられ、生後22日では最大電圧反応に有意な遅延が10試行の全ての5ブロックで雌雄にみられた。最大反応までの時間あるいは平均反応時間に有意な差は認められなかった。

生後60日では慣れを評価するために、最初の3ブロック(1~3)は突発的音刺激なしに行った。最後の2ブロック(4~5)は音刺激を用いた。突発的音刺激は予想通り全ての群で反応の低下を生じた。投与の影響は認められなかった。

表 3 聴覚驚愕反応

検査時期	投与量 (ppm)		雄				雌				
			0	0.5	10	200	0	0.5	10	200	
生後 22 日	検査動物数		26	28	29	20	26	27	29	21	
	最大 反応	ブロック	1	130.3	153.6	121.2	104.7	239.4	146.6	132.6	109.0
			2	122.3	123.5	106.5	84.1	221.5	130.5	117.6	91.6
			3	122.3	122.5	98.8	86.2	111.5	130.8	127.3	87.1
			4	119.6	126.3	105.4	85.4	120.8	233.6	123.7	95.0
			5	130.2	137.9	113.2	92.7	132.3	134.1	119.2	95.3
	最大反 応まで の時間	ブロック	1	29.4	31.4	33.8	36.8	32.6	29.8	28.9	34.1
			2	27.2	27.4	27.6	31.7	27.1	26.6	26.6	28.0
			3	25.9	25.0	27.2	28.7	25.6	25.0	23.6	27.2
			4	25.0	23.9	23.2	25.5	25.4	22.5	22.8	24.4
			5	23.5	22.8	22.7	24.4	22.7	22.5	23.9	23.5
	平均 反応	ブロック	1	23.9	29.6	23.5	19.9↓	26.6	28.6	25.1	21.1↓
			2	21.9	23.6	21.1	15.5↓	23.1	24.4	21.2	17.5↓
			3	22.8	23.7	18.9	16.3↓	20.8	24.7	23.5	16.7↓
			4	22.5	25.3	20.4	16.1↓	23.8	25.3	23.6	17.5↓
			5	25.8	27.8	23.2	18.5↓	26.0	25.8	23.6	17.8↓
	生後 60 日	検査動物数		26	28	29	21	26	27	29	21
		最大 反応	ブロック	1	315.2	379.0	327.8	411.5	344.7	314.1	333.5
2				267.3	298.9	277.4	346.6	219.8	294.0	307.2	279.8
3				300.3	291.5	284.6	291.0	246.0	245.4	254.7	302.3
4				92.0	106.6	105.7	136.0	92.4	91.4	106.8	125.1
5				104.1	99.9	105.5	127.0	62.4	78.8	66.1	89.4
最大反 応まで の時間		ブロック	1	33.2	33.7	33.6	32.3	35.7	35.6	33.7	35.5
			2	32.8	32.4	32.5	30.9	33.6	31.7	32.0	32.8
			3	33.2	33.7	33.0	29.6	32.2	31.3	31.3	31.2
			4	37.0	36.8	38.9	33.6	34.7	32.4	35.6	21.3
			5	38.0	37.4	39.3	31.4	35.3	35.1	35.0	33.3
平均 反応		ブロック	1	69.5	87.3	76.0	85.0	60.5	57.7	60.0	58.9
			2	59.9	67.8	61.2	67.3	40.8	52.7	53.7	52.1
			3	62.9	64.1	61.0	59.3	6.0	46.3	47.3	53.6
			4	20.0	23.8	21.9	27.2	18.7	17.2	21.4	22.5
			5	22.0	22.8	22.0	24.6	13.2	15.0	13.7	28.0

統計学的方法：Shapiro-Wilk W または Kolmogorov D 検定で正規性を検定後、対比較検定：↓ p<0.0005

自発運動量：雄では、検体投与による自発運動量の変化は認められなかった。これに対し雌では、10 及び 200ppm 投与群において、158%及び 139%と、平均自発運動量の優位な増加 (SHAPIRO-Wilk W または Kolmogorov D 検定：p<0.01) が生後 17 日にのみ認められた。しかしながら、未成熟期であるにもかかわらず、雌の対照群の自発運動量が雄の対照群の値より極めて低く、統計解析した Blom の逆正規変換したデータも 1%水準で正規分布していなかったことから、投与に起因するものではないと考えられる。

遊泳発達 :

表 4 遊泳の評価 (評点別動物の割合%)

検査	投与量 (ppm)	評点*	雄				雌			
			0	0.5	10	200	0	0.5	10	200
生後 6 日	検査例数		26	28	29	22	26	27	28	23
	方向	0	11.5	7.1	6.9	50.0	7.7	7.4	3.6	34.8
		1	26.9	17.9	10.3	18.2	11.5	11.1	4.1	8.7
		2	11.5	7.1	24.1	4.5	19.2	18.5	14.3	13
		3	50.0	67.9	58.6	27.3	61.5	63.0	75.0	43.3
	水かき	0	23.1	14.3	3.4	9.1	3.8	3.7	3.6	13.0
		1	76.9	82.1	96.6	86.4	96.2	96.3	96.4	87.0
		2	0	3.6	0	4.5	0	0	0	0
	角度	0	69.2	82.1	79.3	95.5	76.9	63.0	64.3	91.3
		1	26.9	17.9	20.7	4.5	15.4	29.6	28.6	8.7
		2	3.8	0	0	0	7.7	7.4	7.1	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0
生後 8 日	検査例数		26	28	29	21	26	27	28	22
	方向	0	3.8	0	0	9.5	0	0	0	9.1
		1	15.4	14.3	6.9	4.8	3.8	11.1	14.3	4.5
		2	19.2	14.3	20.7	14.3	15.4	11.1	7.1	18.2
		3	61.5	71.4	72.4	71.4	80.8	77.8	78.6	68.2
	水かき	0	3.8	10.7	6.9	4.8	0	0	3.6	4.5
		1	96.2	89.3	93.1	95.2	100	100	96.4	95.5
	角度	0	23.1	32.1	17.2	52.4	26.9	29.6	25.0	59.1
		1	42.3	39.3	41.4	4.8	46.2	33.3	39.3	27.3
		2	34.6	28.6	41.4	42.9	26.9	37.0	35.7	13.6
		3	0	0	0	0	0	0	0	0
	生後 10 日	検査例数		26	28	29	19	26	27	28
方向		0	0	0	0	5.3	0	0	0	9.5
		1	7.7	0	6.9	15.8	7.7	0	0	0
		2	19.2	25.0	17.2	21.1	30.8	25.9	17.9	33.3
		3	73.1	75.0	75.9	57.9	61.5	74.1	82.1	57.1
水かき		0	3.8	0	3.4	5.3	0	0	0	0
		1	96.2	100	96.6	89.5	100	100	100	100
角度		0	15.4	7.1	0	21.1	7.7	44.4	3.6	9.5
		1	26.9	28.6	24.1	42.1	26.9	51.9	35.7	52.4
		2	57.7	64.3	72.4	36.8	61.5	3.7	60.7	38.1
		3	0	0	3.4	0	3.8	0	0	0
生後 12 日		検査例数		26	28	29	19	26	27	28
	方向	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1	0	0	3.4	10.5	0	0	0	0
		2	7.7	10.7	6.9	10.5	7.7	14.8	3.6	9.5
		3	92.3	89.3	89.7	79.0	92.3	85.2	96.4	90.5
	水かき	0	0	0	0	5.3	0	0	0	0
		1	100	100	100	94.7	100	100	100	100
	角度	0	0	0	0	5.3	0	0	0	4.8
		1	19.2	21.4	3.4	42.1	3.8	14.8	10.7	33.3
		2	38.5	53.6	72.4	47.4	53.8	59.3	50.0	61.9
		3	42.3	25.0	24.1	5.3	42.3	25.9	39.3	0

評点* : 方向 : 0=方向性のある動きなし ; 児は沈む 1=方向性のある動きなし ; 児は浮いている

2=ぐるぐる回る遊泳 3=弧状遊泳、一直線に遊泳、方向を変更

水かき : 0=なし 1=4肢で水かき 2=主として後肢で水かき

角度 : 0=頭部が水中に沈む 1=鼻部が水面にある 2=鼻部/頭部は水面上、耳は水中にある

3=鼻部/頭部/耳が水面上にある

統計学的方法: 繰り返し因子として処理時間を用いる累積ロジットモデル

表4 遊泳の評価（評点別動物の割合%）（つづき）

検査	投与量 (ppm)	評点*	雄				雌			
			0	0.5	10	200	0	0.5	10	200
生後 14 日	検査例数		26	28	29	19	26	27	28	21
	方向	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1	0	0	0	0	0	0	0	4.8
		2	3.8	3.6	6.9	5.3	3.8	3.7	3.6	0
		3	96.2	96.4	93.1	94.7	96.2	96.3	96.4	95.2
	水かき	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1	100	100	100	100	100	100	100	100
	角度	0	3.8	0	0	0	0	0	0	0
		1	3.8	3.6	0	10.5	0	0	0	4.8
		2	0	14.3	27.6	52.6	7.7	29.6	17.9	57.1
		3	92.3	82.1	72.4	36.8	92.3	70.4	82.1	38.1

評点*：方向：0＝方向性のある動きなし；児は沈む 1＝方向性のある動きなし；児は浮いている

2＝ぐるぐる回る遊泳 3＝弧状遊泳、一直線に遊泳、方向を変更

水かき：0＝なし 1＝4肢で水かき 2＝主として後肢で水かき

角度：0＝頭部が水中に沈む 1＝鼻部が水面にある 2＝鼻部/頭部は水面上、耳は水中にある

3＝鼻部/頭部/耳が水面上にある

統計学的方法：繰り返し因子として処理時間を用いる累積ロジットモデル

方向及び角度で評価したとき、200ppm 群は遊泳発達に軽度の遅延を生じた。生後 6 日の雌雄の方向の評点は低かったが、雄のみ有意 ($p < 0.01$) に遅延していた。浮いていることができない児(方向 0)の頻度が対照群で雄が 11.5%、雌で 7.7%であったのに対して、200ppm 群で雄 50.0%、雌 34.8%であった。また、一直線に遊泳できる児(方向 3)の頻度が対照群で雄が 50.0%、雌で 61.5%であったのに対して、200ppm 群で雄 27.3%、雌 43.3%であった。生後 14 日ではこれらの差は認められなかった。

角度の評価は経時につれて発達はあるが、雌の間に有意 ($p < 0.04$) な差があったが、群間には有意差は認められなかった。しかし、特に初期の検査日で 200ppm 群は対照群より頭が水面下にある程度が大であった。対照群では生後 14 日までに評点 3(＝鼻部/頭部/耳が水面上にある)に雌雄共 92.3%が達したが、200ppm 群では雄 36.8%、雌 38.1%のみであった。雄では有意差は認められなかった。

水かきには検体投与の影響は認められなかった。

学習/記憶：検体投与の影響は認められなかった。

脳重量(表 5)：200ppm 群において、雌雄共対照群に比し、脳重量及び対体重比の減少が認められたが、これは体重が対照群より低いことの影響であり、検体投与の影響ではないと考えられる。

表 5 脳重量

		投与量 (ppm)		0.5	10	200
脳重量 (%)	生後 11 日	雄	最終体重			59↓
			重量			80↓
			対体重比			139↑
		雌	最終体重			76↓
			重量			89↓
			対体重比			120↑
	生後 60 日	雄	最終体重			88↓
			重量			93↓
			対体重比			106
		雌	最終体重			87↓
			重量			92↓
			対体重比			106

統計学的方法 : Dunnett 検定 : ↑↓ : p<0.05 ↓ : p<0.01 矢印のない数値は有意差なし。
変動の目安として対照群に対する比率を示す。

肉眼的/神経病理学的検査 : 投与に起因すると考えられる特記すべき変化は認められなかった。

以上より、ラットの妊娠 6 日から哺育 10 日まで検体を 200ppm までの濃度で混餌投与した結果、200ppm 群において、母動物で妊娠時に摂餌量の減少を伴い体重及び体重増加の抑制が認められた。体重の抑制は哺育初期にも認められた。

児動物に対して、200ppm 群では対照群に比し、出生時から低体重で体重の抑制が継続して認められた。児の生存率の低下、発育遅延(切歯萌出、包皮分離、膈開口)、遊泳発達及び聴覚驚愕反応の低下が認められた。10ppm 群では体重の抑制が認められた。発達神経毒性は母動物に顕著な毒性が認められた用量でのみ認められた。

したがって、一般毒性に対する無毒性量は 0.5ppm(0.05mg/kg/日)、発達神経毒性に対する無毒性量は 10ppm(0.91mg/kg/日)であると判断された。

申請者注 1) 発達神経毒性の無毒性量について :

上記のように報告書では記載されているが、200ppm 群において児動物の発育遅延(切歯萌出、包皮分離、膈開口)、遊泳発達及び聴覚驚愕反応の低下は初期の検査で低下が認められるが、日時の経過につれて体重は対照群より低いものの順調に増加しており、後期の検査でこれらの低下が認められないこと、脳重量及び肉眼的/神経病理学的検査で検体投与に起因する影響も認められないことから、母毒性に伴う児動物の体重が出生時から低いことによる発育遅延が原因の一般毒性であると判断する。したがって、本試験における一般毒性に対する無毒性量は 0.5ppm(0.05mg/kg/日)、発達神経毒性に対する無毒性量は雌雄とも試験した最高用量の 200ppm 以上であると判断する。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はBASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

申請者注2) 単回経口投与等により生じる可能性のある毒性影響と無毒性量について：

200 ppmにおいて、親動物で投与初期（妊娠6-10日）の摂餌量の低下を伴う体重増加抑制が、児動物で生存率の低下、発育遅延（切歯萌出、包皮分離、陰開口）、遊泳発達及び聴覚驚愕反応の低下が認められた。従って、単回経口投与等により生じる可能性のある毒性影響の無毒性量は親動物、児動物ともに10 ppm(0.91 mg/kg)と判断される。

(3) ラットにおける催奇形性試験

(資料 25)

試験機関:

(GLP 対応)

報告書作成年:

検体純度:

供試動物: Sprague-Dawley 系妊娠ラット (CrI: CD)、入手時週齢: 雌 8~10 週齢、
体重範囲: 雌 165~262g、1 群 25 匹

投与期間: 器官形成期間の 10 日間 (9 月 4 日 ~ 9 月 14 日)

投与方法: 検体を 0.5%メチルセルロースに懸濁し、0、1、4 及び 20mg/kg の投与量で妊娠 6~15 日まで 10 日間、毎日 1 回強制経口投与した。対照群には溶媒を同様に投与した。投与懸濁液は毎日調製し、投与容量は妊娠 6、8、10、12 及び 14 日の体重に基づき算出した。膣栓あるいは精子の確認された日を妊娠 0 日とした。

投与量設定根拠: 同機関で本試験と同系の妊娠ラット 10 匹/群を用い、0、5、10 及び 20mg/kg の用量で本試験と同様の方法で試験を実施した。その結果、20mg/kg 群では飲水量の増加、最初の 4 日間摂餌量の減少、最初の 2 日間体重の減少が認められた。10mg/kg 群では摂餌量が同様に軽度減少し、投与初期の体重増加が抑制された。5mg/kg 群では投与の影響がなかった。胎児には 20mg/kg 群でも投与の影響はみられなかった。これらの結果から、0、1、4 及び 20mg/kg を選定した。

観察・検査項目:

親動物: 一般状態及び生死を毎日観察した。体重は妊娠 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18 及び 20 日に測定した。摂餌量は体重測定日に測定した。飲水量は毎日測定した。妊娠 20 日目に帝王切開し、黄体数、着床数、生存及び死亡・吸収胎児数を検査した。又、母動物の先天性異常と臓器の肉眼的変化を検査した。

生存胎児: 性別の判定、体重の測定及び外表異常の観察を行った。各同腹児の約半数の胎児について骨格標本作製し、骨格異常の有無を検査し、残りの胎児については内臓異常の有無を検査した。

試験結果: 概要を表 1 (親動物)~2 (児動物) に示す。

親動物

一般状態・死亡率: いずれの用量でも死亡はなく、一般状態に投与による悪影響は認められなかった。

20mg/kg 群において、投与開始後から屠殺時まで体重増加が抑制され、飲水量が軽度増加した。摂餌量は投与開始後から 11 日目まで有意に減少した。

4mg/kg 群では体重増加が投与開始後から 12 日まで抑制された。

着床所見及び肉眼的病理所見に、いずれの群とも投与に関連すると考えられる異常は認められなかった。

表 1. 親動物の成績

投与量 (mg/kg)		0	1	4	20	
群当り動物数		25	25	25	25	
未妊娠雌数		1	1	0	0	
死亡雌数		0	0	0	0	
生存児を有する腹数		24	24	25	25	
妊娠率 (%)		96	96	100	100	
動物 親 物	一般症状	投与に関連する影響なし				
	体重増加 ^{a, b} (妊娠 6 日からの増加)	8 日				39↓
		10 日			85↓	39↓
		12 日			90↓	61↓
		16 日				83↓
		18 日				88↓
		20 日				90↓
	摂餌量 ^{a, b}	6-7 日				86↓
		8-9 日				76↓
		10-11 日				90
		12-13 日				
		16-17 日				
	飲水量 ^{a, b}	8-9 日				116↑
		10-11 日				120↑
		12-13 日				128↑
		14-15 日				122↑
		16-17 日				120↑
		18-19 日				120↑
	肉眼的所見	投与に関連する異常はみられなかった				
	着床所見 (腹当り) ^c	黄体数	16.1	15.8	15.9	15.7
着床数		14.0	14.0	13.0	13.3	
着床前損失率 (%)		14.5	11.6	19.7	15.0	
早期吸収胚数		0.6	0.6	1.0	0.6	
後期吸収胚数		0.0	0.0	0.1	0.0	
死亡胚数		0.6	0.6	1.0	0.6	
着床後損失率 (%)		3.9	5.8	7.4	5.0	
生存胎児数		13.3	13.5	11.9	12.6	

^a: 変動の目安として対照群に対する比率%を示す。

^b: 申請者が有意差検定を実施。統計学的方法: DUNNETT 法及び MANN-WHITNEY 法 ††: p<0.05, †‡: p<0.01

^c: 着床所見に有意差なし (Kruskal-Wallis H 検定または Fisher 検定)。

表 2. 胎児の成績

投与量 (mg/kg)		0(対照)	1	4	20	
生存児を有する腹数		24	24	25	25	
検査胎児数		320	323	298	316	
児動物	同腹児体重	52.12	52.89	45.23	49.63	
	平均胎児体重(g)	3.96	3.98	3.82	3.96	
	腹当り児数	合計	13.3	13.5	11.9	12.6
		雄	6.0	6.8	6.2	6.2
		雌	7.3	6.7	5.8	6.3
	性比(雄の割合%)	43.7	51.9	52.2	50.4	
	奇形	検査胎児数	320(24)	323(24)	298(25)	316(25)
		奇形胎児数	1(1)	5(4)	1(1)	1(1)
		発現率(%)	0.3	1.4	0.3	0.3
	内臓異常 ^a	検査胎児数	161(24)	157(24)	147(25)	157(25)
		異常胎児数	8(6)	7(7)	9(8)	5(4)
		発現率(%)	4.6	4.3	8.8	4.6
	骨格異常 ^a	検査胎児数	158(24)	161(23)	150(25)	158(25)
		異常胎児数	46(18)	43(16)	40(16)	31(16)
		発現率(%)	27.2	26.9	24.7	18.5
骨格変異 ^b	検査胎児数	158	161	150	158	
	正常胸骨(%)	84(56.8)	104(64.8)	79(51.4)	98(63.9)	
	胸骨未化骨(%)	42(25.3)	27(16.6)	45(34.0)	41(24.5)	
	胸骨不全(%)	41(24.4)	37(22.9)	39(21.7)	27(16.6)	
	胸骨非対称(%)	2(1.2)	3(1.8)	1(0.8)	1(0.4)	
	胸骨変異総数(%)	74(43.2)	58(35.8)	76(52.0)	60(36.1)	

^a: 外表奇形胎児は除く。()内の数値は腹数

^b: 骨格変異の()内の数値は所見の発生率%

統計学的方法: Kruskal-Wallis H-検定で有意差なし。

胎児動物(表 2):

胎児体重、生存胎児数及び性比並びに胎児の奇形、異常及び変異の発生率に検体投与に関連する悪影響はいずれの群にも認められなかった。

以上の結果から、本剤を妊娠ラットの器官形成期に経口投与したとき、母動物に対して 20mg/kg 群で投与開始後から屠殺時まで体重増加が抑制され、飲水量が軽度増加し、摂餌量は投与開始後から 11 日目まで有意に減少した。4mg/kg 群では体重増加が投与開始後から 12 日まで抑制された。

又、胎児に対して、母動物に毒性のある 20mg/kg でも悪影響は全く認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

従って、無毒性量は親動物に対して 1 mg/kg/日、胎児に対して 20mg/kg/日であると判断される。また、催奇形性は最高投与量の 20 mg/kg/日でも認められなかった。

申請者注 1(母動物の最大無作用量について) :

残留農薬安全性評価委員会から、「ラットを用いた催奇形性試験における母動物での最大無作用量の考察」を求められ、下記のように回答した。

回答の要旨

ラットを用いた催奇形性試験の母動物の影響に関し、報告書で統計学的解析が実施されていなかった体重増加、摂餌量、摂水量について、申請者が有意差検定を実施し再考した。その結果、4 mg/kg/day 群で投与初期(妊娠 10 日および 12 日)の体重増加に有意な抑制が認められたことにより、母動物に対する最大無作用量は原報告書の 4 mg/kg/日ではなく、1 mg/kg/日が妥当と判断した。

申請者注 2(単回経口投与等により生じる可能性のある毒性影響と無毒性量について) :

20 mg/kg では、妊娠 6~20 日にかけての体重増加量が有意に抑制された。4 mg/kg でも体重増加量の抑制が認められたが、少なくとも妊娠 8 日時点では統計学的有意差を伴っておらず、単回投与で生じるとは考えられない。従って親動物の無毒性量は 4 mg/kg と判断された。児動物では単回経口投与等により生じる可能性のある毒性影響は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

(4) ウサギにおける催奇形性試験

(資料 26)

試験機関:

(GLP 対応)

報告書作成年: (GLP 対応)

検体純度:

供試動物: ニュージーランド白色種ウサギ 1 群雌 22 匹、試験開始時 17~25 週齢、

体重: 3.31~4.82kg

投与期間: 器官形成期間の 14 日間

投与方法: 検体を 0.5% Tween 80 含有 0.5% メチルセルロース溶液に懸濁し、0、0.1、0.2、0.5 及び 1.0 mg/kg の投与量で妊娠 6~19 日まで 14 日間毎日、1 回強制経口投与した。対照群には溶媒を同様に投与した。投与液は毎日調製し、投与容量は 5mL/kg として、各投与日の体重に基づき算出した。

授精能が確実な同系雄のプール精液により雌を人工授精した。人工授精後、各雌に黄体形成ホルモンを静注し、確実に排卵させた。人工授精日を妊娠 0 日とした。

投与量設定根拠: 同機関で本試験と同系の妊娠ウサギ 4 匹/群を用いて、用量 0、0.3 及び 1.2mg/kg で本試験と同様の方法で試験を実施した。その結果、両群とも投与期間及び投与後期間に呼吸促拍が、1.2mg/kg 群の非妊娠例では運動失調及び振戦が、0.3mg/kg 群の 1 例では全同腹児の吸収が認められた。これらの結果から、0.1、0.2、0.5 及び 1.0 mg/kg を選定した。

観察・検査項目:

親動物: 一般状態及び生死を毎日観察した。体重は毎日測定した。摂餌量は 1~5 日、6~12 日、13~19 日、20~23 日、24~28 日に測定した。妊娠 29 日に帝王切開し、黄体数、着床数、生存及び死亡・吸収胎児数を検査した。

生存胎児: 性別、体重、胎盤重量及び外表異常の観察を行った。各胎児の内臓観察を行った後、骨格標本作製し、骨格異常の有無を検査した。又、約 1/3 の胎児については頭部を切断してブアン液に固定し、頭部の形態観察を行った。

結果:

親動物

対照群の 1 例が体重減少、摂餌量の減少、嗜眠、脱糞量の減少を示したので切迫殺した。原因は腹膜内感染症であった。

体重は0.5及び1.0 mg/kg群で投与期間を通じて体重増加が対照群に比べて有意に抑制された。0.2 mg/kg群でも有意に体重増加が抑制されたが、軽度抑制かつ一過的であり、妊娠末期には対照群とほぼ同等であることから、毒性学的意義は疑わしい。摂餌量は0.5及び1.0 mg/kg群で、投与期間中、軽度の有意な低値を示した。

申請者注) 投与初期において各投与群で統計学的有意差を伴う体重増加抑制が認められたが、特に妊娠6～12日までは明確な用量相関性がなく、偶発的な変動と考えられた。

剖検で、検体投与に関連すると考えられる肉眼的な変化は認められなかった。

着床所見において、全胚吸収雌数が対照群、0.1及び1.0 mg/kg群の各1匹で認められ、また、0.1 mg/kg群では1例が妊娠23日目に流産した。腹当たり着床所見には検体投与の影響は認められなかった。

親動物の成績

群 (mg/kg/日)	0 (対照)	0.1	0.2	0.5	1.0	
1 群当り動物数	22	22	22	22	22	
妊娠雌数 (%)	20 (86)	21 (86)	21 (95)	18 (82)	19 (86)	
未妊娠雌数	1	1	1	4	3	
死亡/切迫殺雌数	1	0	0	0	0	
流産	0	1	0	0	0	
全胚吸収雌数	1	1	0	0	1	
生存胎児を有する腹数	19	19	21	18	18	
一般状態	投与に関連する影響なし					
体重 変化 [*] (%)	妊娠 0~6 日					
	妊娠 6~8 日		67	49↓	44↓	54
	妊娠 6~10 日		57↓	67	53↓	58↓
	妊娠 6~12 日		63	47↓	57	54↓
	妊娠 6~14 日		76	62	59	49↓
	妊娠 6~16 日		75	67	66	49↓
	妊娠 6~18 日		86	74	59↓	43↓
	妊娠 6~20 日		77	79	53↓	31↓
	妊娠 6~24 日		86	91	75	48↓
	妊娠 6~28 日		92	89	77	59↓
摂餌 量 [*] (%)	妊娠 1~5 日					
	妊娠 6~12 日				88↓	
	妊娠 13~19 日				79↓	67↓
	妊娠 20~23 日					
	妊娠 24~28 日					
腹当 り着 床所 見	黄体数	11.4	11.1	10.4	10.4	10.8
	着床数 (率)	10.7 (94)	9.2 (83)	9.0 (87)	9.0 (87)	9.7 (90)
	着床前損失率 (%)	6.5	17.1	14.9	14.7	10.3
	早期吸収胚数	0.5	0.5	0.4	0.7	0.7
	後期吸収胚数	1.3	0.4	0.4	0.2	0.4
	死亡胎児数	1.8	0.9	0.9	0.9	1.1
	着床後損失率 (%)	16.7	10.3	9.5	9.9	11.4
胎盤重量 (g)	5.6	5.6	5.5	5.7	5.3	
剖検所見	投与に関連する影響なし					

統計学的方法：体重変化は t-検定が実施されたが、第一種過誤の観点から多重検定がより適切と判断し、申請者が Dunnet 法で再検定した。摂餌量は Mann-Whitney U-検定。

↓ ; p<0.05, ↓↓ ; p<0.01 ↓↓ ; p<0.001

* : 体重変化及び摂餌量は変動の目安として対照群に対する比率%を示した。

胎児動物：

すべての観察所見において、いずれの群とも検体投与の影響は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

胎児動物の成績

投与量(mg/kg)	0(対照)	0.1	0.2	0.5	1.0	
検査胎児数(腹数)	169(19)	157(19)	171(21)	146(18)	155(18)	
腹当たり生存胎児数(雄/雌)	4.7/4.2	4.1/4.1	4.4/3.8	4.1/4.1	4.5/4.1	
胎児重量(g)	40.2	41.7	41	40.8	39.5	
性比(雄/総数)	52.8	50.0	53.7	50.0	52.3	
外表 検査	異常胎児% a			0.6(1)		
	尾欠損%	0.6(1)				
	短尾または糸状尾%		0.6(1)			0.6(1)
	潜在性二分脊椎%					0.6(1)
	後肢湾曲%	1.2(1)				
	未熟胎児 32g 以下%	13.6(10)	14.0(10)	11.1(8)	8.9(6)	14.2(7)
内臓 検査	肺中間葉発育不全%	0.6(1)				
	胆嚢変異%	9.5(8)	7.0(6)	3.5(6)	15.1(11)	9.0(10)
骨格 検査	検査胎児数(頭部)	114(19)	106(19)	120(21)	99(18)	106(18)
	小大泉門%	46.7(17)	44.3(14)	44.2(18)	37.4(12)	39.6(14)
	中大泉門%	50.9(17)	54.7(15)	53.3(20)	60.6(17)	57.5(18)
	舌骨体不完全骨化%	22.8(11)	17.0(9)	11.7(8)	10.1(7)	5.7(4)
	前頭骨縫合不正骨化%	6.1(5)	8.5(7)	1.7(2)	10.1(8)	8.5(7)
	検査胎児数(その他) %	169(19)	157(19)	171(21)	146(18)	155(18)
	過剰胸骨(5-6の間) %	4.7(4)	1.9(3)	2.3(4)	2.1(3)	1.9(3)
	肋骨 12/13 %	16.0(15)	13.4(14)	12.9(14)	13.0(13)	14.2(11)
	肋骨 13/13 %	31.4(15)	35.7(15)	34.5(18)	39.0(17)	38.7(15)
頭部 切片 検査	検査胎児数	55(19)	51(19)	51(21)	47(18)	49(17)
	切歯未萌出%	7.3(4)	3.9(2)	7.8(4)	6.4(3)	6.1(3)
	網膜嚢(両側) %	12.7(5)	11.8(6)	15.7(7)	4.3(2)	2.0(1)
	延髄を除く脳の嚢胞状 拡張%	9.1(5)	2.0(1)	7.8(3)	6.4(3)	0.0(0)
	延髄の嚢胞状拡張%	5.5(3)	2.0(1)			2.0(1)

a: 単眼症、長鼻、小頭症、軟口蓋、ドーム状頭 (): 異常を有する腹数。 空欄は所見の発生なし。
統計手法: Student の t 検定法 有意差なし。

以上の結果から、本剤を妊娠ウサギに経口投与したとき、母動物に対して 0.5 及び 1.0 mg/kg 群で体重増加が有意に抑制され、投与期間中の摂餌量の減少を伴っていた。0.2mg/kg 群では一過性に体重増加が抑制されたのみであった。又、胎児に対して、試験した最高用量でも検体投与の影響は認められなかった。

従って、無毒性量は親動物に対して 0.1 mg/kg/日、胎児に対して 1.0mg/kg/日であると判断される。また、催奇形性は最高投与量の 1.0 mg/kg/日でも認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

申請者注 1(最大無作用量について) :

残留農薬安全性評価委員会から、「ウサギを用いた催奇形性試験における最大無作用量の考察」を求められ、下記のように回答した。

回答の要旨

ウサギを用いた催奇形性試験において、0.2 mg/kg 群の母動物の体重増加の抑制は一過性ではあるが、投与期間内である妊娠 6~18 日の抑制であり、かつ統計学的にも有意であることより、母動物の最大無作用量は原報告書の 0.2 mg/kg/day ではなく、0.1 mg/kg/日 が妥当と判断した。また、胎児においては、何れの投与群でも検体による影響が認められなかったことより、胎児の最大無作用量は報告書通りの 1.0 mg/kg/日 が妥当と判断した。

申請者注 2(単回経口投与等により生じる可能性のある毒性影響と無毒性量について) :

単回経口投与等により生じる可能性のある毒性影響は認められなかった。妊娠 6~8 日において、0.2 および 0.5 mg/kg において統計学的有意差を伴う体重増加量の抑制が認められたが、最高用量である 1.0 mg/kg で有意差はなく、明確な用量相関性も認められないことから、偶発的な変動と考えられた。

1-13. 変異原性

(1) 遺伝子突然変異性

(1-1) 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 27)

試験機関:

(GLP 対応)

報告書作製年:

検体純度:

試験方法: ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 株) を用い、ラット肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9)の存在下及び非存在下において Ames らの方法を用いて検体の変異原性を調べた。

検体を DMSO に溶解し、第 1 回試験では 0.8~500 μg /プレートの範囲で公比 5 で希釈して 5 用量で、第 2 回試験では 25~400 μg /プレートの範囲で公比 2 で希釈して 5 用量で実施した。いずれの試験でも 3 連制で行った。

用量設定根拠: TA100 株を用い、検体を 8~5000 μg /プレートの範囲で処理した結果、S-9 Mix の存在下及び非存在下のいずれでも 1000 μg /プレート以上で菌に対する毒性がみられたので、第 1 回試験での最高用量を 500 μg /プレートとした。第 1 回試験結果より、500 μg /プレートでも毒性がみられたため、第 2 回試験の最高用量を 400 μg /プレートとした。

試験結果: 結果を次表に示す。

2 回の試験において、検体は S-9 Mix の存在の有無にかかわらず、いずれの用量でも、用いた菌株に復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照として用いた NaN_3 (アジ化ナトリウム)、AAN (2-アミノアントラセン)、AAC (9-アミノアクリジン)、2NF (2-ニトロフルオレン) では、全ての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性を有しないものと判断される。

1 回目試験 (検体群は 3 反復の平均値。ただし、対照群と陽性対照群は 5 反復)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型		フレームシフト型		
			TA1535	TA100	TA1537	TA98	
対照 (DMSO)	0	-	19.8	72.0	10.8	23.4	
検体	0.8	-	21.0	73.0	9.0	20.7	
	4	-	22.0	66.3	13.0	15.0	
	20	-	20.7	73.7	23.5	18.7	
	100	-	26.7	80.3	11.3	16.3	
	500	-	17.0	59.7	13.7	20.3	
対照 (DMSO)	0	+	19.2	131.4	10.0	35.6	
検体	0.8	+	11.3	138.0	14.0	59.0	
	4	+	12.7	117.0	12.3	51.3	
	20	+	17.7	122.7	11.0	35.3	
	100	+	9.3	136.7	16.7	39.7	
	500	+	8.7	140.7	14.7	48.7	
陽性 対照	NaN ₃	2	-	521.4	639.2	NT	NT
	AAC	50	-	NT	NT	865.0	NT
	2NF	50	-	NT	NT	NT	927.8
	AAN	5	+	NT	806.2	NT	412.8

2 回目試験 (検体群は 3 反復の平均値。ただし、対照群と陽性対照群は 5 反復)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型		フレームシフト型		
			TA1535	TA100	TA1537	TA98	
対照 (DMSO)	0	-	16.2	76.4	8.2	17.8	
検体	25	-	13.7	72.3	10.3	22.3	
	50	-	14.0	81.3	9.3	14.7	
	100	-	16.3	80.0	9.7	16.0	
	200	-	12.7	81.7	12.7	18.3	
	400	-	19.7	59.0	8.7	18.3	
対照 (DMSO)	0	+	23.0	107.4	11.4	31.4	
検体	25	+	25.3	107.7	14.0	27.7	
	50	+	22.3	118.0	15.7	27.7	
	100	+	23.0	103.3	11.3	28.0	
	200	+	22.3	115.3	14.7	26.0	
	400	+	19.3	123.0	12.7	36.0	
陽性 対照	NaN ₃	2	-	313.8	730.8	NT	NT
	AAC	50	-	NT	NT	524.4	NT
	2NF	50	-	NT	NT	NT	996.0
	AAN	5	+	NT	410.6	NT	329.8

注) NaN₃: アジ化ナトリウム AAN: 2-アミノアントラセン
AAC: 9-アミノアクリジン 2NF: 2-ニトロフルオレン
NT: 試験未実施

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はBASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

(1-2) 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 28)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作製年:

検体純度:

試験方法: ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) 及び大腸菌 *Escherichia coli* のトリプトファン要求株 (WP2uvrA⁻) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9) の存在下及び非存在下で Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体を DMSO に溶解し、50~5000 μ g/プレートの範囲の 5 用量で、2 回実験を繰り返し実施した。いずれの試験でも 3 連制で行った。

用量設定根拠: TA100 と WP2uvrA⁻ 株を用い、検体を 50~5000 μ g/プレートの範囲の 5 用量で試験した結果、最高濃度でも細胞毒性はみられなかった。従って、最高用量を 5000 μ g/プレートとした。

試験結果: 結果を次表に示す。

2 回の試験において、検体は S-9 Mix の存在の有無にかかわらず、いずれの濃度でも、用いた菌株に復帰変異コロニー数を増加させなかった。なお、1500 μ g/プレート以上で沈殿がみられたが、復帰突然変異体コロニー数の計測を妨害するものではなかった。

一方、陽性対照物質として用いた 2-AA (2-アミノアントラセン)、ENNG (1-エチル-3-ニトロ-1-ニトロソグアニジン)、4-NQO (4-ニトロキノリン-1-オキシド)、9-AA (9-アミノアクリジン) では全ての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性を有しないものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

1 回目試験 (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 Mix 有無	復帰変異コロニ-数/プレート					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA ⁻	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	105	15	32	20	12	
検体	50	-	104	15	37	17	11	
	150	-	113	12	31	18	9	
	500	-	105	17	35	19	12	
	1500	-	124	23	39	21	9	
	5000	-	110	16	35	14	5	
陽性 対照	ENNG	3	-	366	158	610	143	326
	ENNG	5	-					
	ENNG	2	-					
	4-NQO	0.2	-					
	9-AA	80	-					
溶媒対照 (DMSO)	0	+	117	17	42	33	14	
検体	50	+	133	12	47	31	13	
	150	+	139	15	39	32	10	
	500	+	134	19	49	31	12	
	1500	+	140	17	44	34	17	
	5000	+	124	13	40	24	7	
陽性 対照	2-AA	1	+	1064	154	348	191	119
		2	+					
		10	+					
		0.5	+					
		2	+					

2-AA : 2-アミノアントラセン

ENNG : 1-ethyl-3-(3-dimethylamino)propyl carbodiimide

4-NQO : 4-ニトロキノリン-1-オキシド

9-AA : 9-アミノアクリジン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

2 回目試験 (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 Mix 有無	復帰変異コロニ数/プレート					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA ⁻	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	108	13	25	21	16	
検体	50	-	112	13	29	30	16	
	150	-	104	11	36	26	16	
	500	-	122	15	33	33	17	
	1500	-	128	16	31	24	17	
	5000	-	111	13	32	24	9	
陽性 対照	ENNG	3	-	450	125	539	107	204
	ENNG	5	-					
	ENNG	2	-					
	4-NQO	0.2	-					
	9-AA	80	-					
溶媒対照 (DMSO)	0	+	133	24	45	35	20	
検体	50	+	140	24	44	40	14	
	150	+	142	21	46	42	17	
	500	+	144	20	54	42	26	
	1500	+	152	18	43	39	13	
	5000	+	140	13	44	40	10	
陽性 対照	2-AA	1	+	897	177	453	326	122
	2-AA	2	+					
	2-AA	10	+					
	2-AA	0.5	+					
	2-AA	2	+					

2-AA : 2-アミノアントラセン

ENNG : 1-イカル-3-ニトロ-1-ニトロゲンジン

4-NQO : 4-ニトロキノリン-1-オキシド

9-AA : 9-アミノアクリジン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はBASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

(1-3) 哺乳動物細胞を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異性試験

(資料29)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作製年：

検体純度：

試験方法：チャイニーズハムスターV79細胞のヒポキサンチン-グアニン ホスホリボシル トランスフェラーゼ (HPRT) 遺伝子座における *in vitro* 突然変異誘発性試験を代謝活性化系 (S-9 mix) の存在下及び非存在下で、2回行なった。溶媒としてDMSOを用いた。

以下とおりとした。

検体処理区 (S-9 mix 存在下及び非存在下) 0.8、4、20、100、500 μ g/mL

陽性対照区 (S-9 mix の非存在下) エチルメタンスルホネート (EMS) 1.0 mg/mL、

(S-9 mix 存在下及び非存在下) 9, 10-ジメチル-1, 2-ベンズアントラセン (DMBA) 10 μ g/mL

陰性 (溶媒) 対照も同様に試験した。

自然 HPRT 欠損突然変異体を除いた細胞を播種し (7.5×10^5 個/フラスコ)、代謝活性化系の非存在下及び存在下で、血清を含む培地中で3時間、検体処理を行った。細胞をHanks 平衡塩類溶液で洗浄後、細胞を完全培地に再浮遊させて培養した。突然変異発現時間の7日間に数回継代培養した。継代培養時に、選択培地に約 10^5 細胞/シャーレを播種し、播種から2~3時間後に6-チオグアニンを添加した。培養6日後、固定・染色して変異コロニー数を計測した。

用量設定根拠：検体をDMSOに溶解し、培地に処理したところ、最終濃度500 μ g/ml以上で培地中に大量の沈澱を生じた。この結果を基にS-9 Mixの存在下及び非存在下において最終濃度0.8、4、20、100及び500 μ g/mLで3時間処理後、平板効率を求めて毒性を評価したが、いずれの濃度でも毒性はみられなかったため、最高濃度を500 μ g/mLとした。

結 果：結果を次表に示す。

細胞毒性は、第2回目試験のS-9 Mix存在下における100及び500 μ g/ml処理において生存率が軽度に低下したが、それ以外では生存率の低下はみられなかった。

突然変異に関しては、1回目の試験で4 μ g/mL処理区の1反復のみ突然変異頻度が生存細胞10⁵個当たり11.6個と高かった (他の1枚は3.3)。他の処理培養細胞でも変異コロニー数が溶媒対照よりわずかに多いものもあったが、いずれも一貫性がなく、用量依存性もなく、有意差も認められなかった。2回目の試験においてS-9 Mixの有無にかかわらず、

検体処理群で突然変異頻度の増加はみられなかった。

一方、陽性対照群(S-9 Mix非存在下のEMS、S-9 Mix存在下のDMBA)では明らかな突然変異頻度の増加がみられた。

以上の結果より、本試験条件下では検体は代謝活性化の有無にかかわらず変異原性を示さないと判断される。

試験 1 (3 プレート/反復、2 反復の平均値)

S-9 Mix の有無		無			有		
処理	処理量 (μ g/mL)	細胞毒性・ (%)	突然変異率 (/10 ⁵ cell)	平板効率 (%)	細胞毒性・ (%)	突然変異率 (/10 ⁵ cell)	平板効率 (%)
溶媒対照 (DMSO)	0	100.0	0.3	107.0	100.0	5.4 ^b	97.7 ^b
検体	0.8	167.1	0.6	121.4	117.0	0.0	95.0
	4	157.7	7.5 [*]	89.2	111.6	2.8	99.5
	20	96.4	1.3	127.0	127.1	2.0	75.9
	100	132.6	0.0	78.4	100.4	0.0	92.8
	500	136.0	2.9	96.1	130.0	0.0	93.0
陽性 対照	EMS	1000	61.0	136.0	83.6	NT	NT
	DMBA	10	91.4	3.7	109.2	89.5	101.3

*:1 反復のプレートのコロニー数が 16、7、7 と高かった (10⁵ 生存細胞当たり平均 11.6)。

^a: 溶媒対照に対する比率 ^b: 1 フラスコの結果 (1 フラスコは乾燥のため) NT : 試験未実施

陽性対照 : EMS : エチルメタンサルホネート DMBA : 9,10-ジメチル-1,2-ベンズアントラセン

試験 2 (3 プレート/反復、2 反復の平均値)

S-9 Mix の有無		無			有		
処理	処理量 (μ g/mL)	細胞毒性・ (%)	突然変異率 (/10 ⁵ cell)	平板効率 (%)	細胞毒性・ (%)	突然変異率 (/10 ⁵ cell)	平板効率 (%)
溶媒対照 (DMSO)	0	100.0	0.0	89.5	100.0	0.6	64.5
検体	0.8	95.3	1.1	72.5	92.4	1.5	108.1
	4	123.7	0.0	78.0	88.4	0.0	70.5
	20	86.4	0.0	63.0	94.4	1.1	107.1
	100	118.3	2.4	84.3	47.1	0.0	91.2
	500	101.0	0.6	92.0	62.7	0.0	85.6
陽性 対照	EMS	1000	45.1	116.0	73.2	NT	NT
	DMBA	10	60.0	0.0	81.5	87.4	49.7

^a: 溶媒対照に対する比率 NT : 試験未実施

陽性対照 : EMS : エチルメタンサルホネート DMBA : 9,10-ジメチル-1,2-ベンズアントラセン

(2) 染色体異常誘発性

(2-1) ヒトリンパ球を用いる *in vitro* 染色体異常試験

(資料 30)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作製年：

検体純度：

試験方法：男女各 1 名の末梢血管から採血し、44 時間培養した培養ヒトリンパ球細胞を用い、ラット肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下及び非存在下で染色体異常誘発性を検定した。検体は DMSO に溶解して、4.69、9.38、18.75、37.5、75、150 及び 300 $\mu\text{g/ml}$ で S-9 Mix の存在下及び非存在下において試験した。

なお、溶媒対照 (DMSO) 及び陽性対照 [S9 Mix 非存在下：メチルメタンスルホネート (MMS)、S9 Mix 存在下：シクロホスファミド (CPA)] を加えた。

細胞を 3 時間処理後、生理食塩液で洗浄後、牛胎児血清とゲンタマイシン添加培地に再浮遊させて、24 時間培養した。培養終了 1 時間前にコルヒチン 1 $\mu\text{g/ml}$ を添加して、細胞分裂を停止させた。この細胞のスライドを作製して固定、Gurr's Giemsa で染色した。

染色体異常の評価に当り、最高濃度は細胞分裂指数が 50~80% まで低下している用量を最高評価用量として、75、150 及び 300 $\mu\text{g/ml}$ を選定して評価した。評価はドナー別に培養した 100 個の分裂中期像を観察して行った。染色体異常はギャップ、欠失、交換、核内倍加、高二倍体 (hyperdiploid)、倍数体、細粉化及び多重異常に分類した。

用量設定根拠：最高処理濃度は検体の培地中での溶解限度に近い 300 $\mu\text{g/ml}$ とした。本試験における染色体異常評価濃度は、作製したスライド標本を観察して、有糸分裂指標を求め選定した。有糸分裂指標は 300 $\mu\text{g/ml}$ 処理で 66~71% の阻害がみられたため、75、150 及び 300 $\mu\text{g/ml}$ の 3 濃度について染色体異常を評価した。

結 果：各ドナー 100 細胞当たり染色体異常出現頻度の合計値を次表に示す。

代謝活性化の有無にかかわらず、用いたいずれの検体処理濃度でも対照群と比べ染色体に異常を有する細胞の有意な増加はみられなかった。

一方、陽性対照群では有意な増加がみられた。

以上の結果より、本試験条件下で、検体は代謝活性化の有無にかかわらず培養ヒトリンパ球細胞に対し染色体異常を誘発しないと判断される。

ヒトリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験結果 (2 ドナーの合計値)

処理	濃度 μg/mL	S-9 Mix の有無	観察 細胞 数	異常を有する細胞数						異常細胞数(%)			有糸 分裂 頻度
				キ・ャツ	染色体		染色体分体		その 他 ^a	キ・ャツ を 含む	キ・ャツを除く		
					欠 失	交 換	欠 失	交 換			構 造+ 数的 異常	構 造 異常	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	200	3	1	0	1	0	4	4.5	3	1	3.4
検体	75	-	200	4	1	0	1	0	1	2.5	1.5	1	3.4
	150	-	200	5	1	0	0	0	1	3.5	1	0.5	3.1
	300	-	183	2	2	0	1	0	0	2.7	1.6	1.6	1.0
陽性対照 (MMS ^b)	100	-	75	6	6	0	10	8	0	28*	23**	23**	NT
溶媒対照 (DMSO)	0	+	200	4	1	1	2	0	1	4	2	1.5	3.4
検体	75	+	200	6	0	0	0	0	1	3.5	0.5	0	2.2
	150	+	186	4	1	0	0	0	0	2.7	0.5	0.5	2.2
	300	+	162	5	0	0	0	0	1	3.1	0.6	0	1.2
陽性対照 (CPA ^c)	100	+	67	8	10	0	28	7	0	39*	30**	30**	NT

^a : 核内倍加、Hyperdiploid、二倍体、多重異常あるいは細粉化等

^b : メチルメタンスルホネート (MMS)

^c : シクロホスファミド (CPA)

統計学的方法 : カイ二乗検定 ** : P < 0.001

NT : 試験未実施

(2-2) チャイニーズハムスター由来の CHL 細胞を用いた *in vitro* 細胞遺伝学的試験

(資料 31)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作製年：

検体の純度：

方法：継代培養したチャイニーズハムスター由来 CHL 細胞を用い、代謝活性化系の存在下及び非存在下で染色体異常誘発性を検定した。

検体は DMSO に溶解して、以下の濃度で試験した。

S9 Mix 非存在下： 6 時間処理区：0、7.5、15、30、45、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$
24 時間処理区：0、3.75、7.5、15、30、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$
48 時間処理区：0、3.75、7.5、15.0、22.5、30.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$

S9 Mix 存在下： 6 時間処理区：0、7.5、15、30、60、120 $\mu\text{g}/\text{mL}$

なお、溶媒対照 (DMSO) 及び陽性対照 [S9 Mix 非存在下：マイトマイシン C (MMC) 及び シクロホスファミド (CPA)、S9 Mix 存在下：CPA] を加えた。

細胞は S9 Mix 非存在下で 24 及び 48 時間培養し細胞を収穫した。また S9 Mix の非存在下及び存在下で 6 時間培養後、無処理培地でさらに 18 時間培養し細胞を収穫した。細胞の収穫 2 時間前にコルセミドを添加して、細胞分裂を停止させた。培養は各濃度 2 反復で行い、処理濃度当り 1 枚のスライドを作製して固定、2% Gurr's Giemsa R66 で染色した。

染色体異常の評価に当り、23~27 の染色体を有するよく広がった 100 個の分裂中期細胞を観察し、染色体異常はギャップ、切断、交換、その他 (複合異常) に分類した。倍数性についても観察した。

濃度設定根拠：予備試験において、検体濃度 3.9~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲の 9 濃度で、S9 Mix 非存在下で 6、24 及び 48 時間培養し、また S9 Mix 存在下で 6 時間培養後、無処理培地でさらに 18 時間培養し、細胞毒性について検討した。いずれの場合とも、用量依存性の細胞毒性が認められた。検体の沈殿が 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で投与及び細胞収穫時に認められた。S9 Mix 非存在下の 6 時間処理で 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、S9 Mix 存在下の 6 時間処理で 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、24 時間処理の 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及び 48 時間処理の 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で評価可能な分裂中期細胞が得られなかった。これらの結果から上記の用量を選定した。

結果：

細胞毒性：各処理区の細胞数を表1に示す。

各培養とも、予備試験で予想されたと同程度の細胞毒性を示した。

この結果から、各処理区とも表2に示す3濃度(表1の太字の濃度)について染色体異常を評価した。

表1 細胞数 (x 10⁵/mL)

処理時間	薬物	濃度 (μg/mL)	S-9 mixの有無	培養 A		培養 B		平均対対照比
				分裂細胞数	対対照比	分裂細胞数	対対照比	
6 時間	溶媒対照 (DMSO)	0	-	3.24	100	2.99	100	100
	検体	7.5		3.10	96	3.35	112	104
		15		2.96	91	1.68	56	74
		30		2.39	74	2.62	88	81
		45		2.50	77	2.20	74	76
		60		1.47	45	1.25	42	44
	CPA	10		3.51	108	3.73	125	117
	溶媒対照 (DMSO)	0	+	2.62	100	2.48	100	100
	検体	7.5		2.61	100	2.42	98	99
		15		2.40	92	2.45	99	96
		30		2.29	88	2.11	85	87
		60		1.79	68	1.88	76	72
		120		0.83NM	32	0.63NM	25	29
	CPA	10		1.83	70	1.72	69	70
24 時間	溶媒対照 (DMSO)	0	-	3.08	100	3.11	100	100
	検体	3.75		2.84	92	2.96	95	94
		7.5		1.08	35	2.91	94	65
		15		2.38	77	2.61	84	81
		30		1.48	48	1.38	45	47
		60		1.29	42NM	1.44	46NM	44
	MMC	0.05		2.69	87	1.41	45	66
48 時間	溶媒対照 (DMSO)	0	-	2.62	100	2.91	100	100
	検体	3.75		2.01	76	2.75	94	85
		7.5		2.05	78	2.40	82	80
		15.0		1.81	69	2.04	70	70
		22.5		1.15	44	1.38	47	46
		30.0		0.67NM	26	0.72NM	25	26
	MMC	0.05		2.34	89	2.77	95	92

MMC: マイトマイシン C CPA: シクロホスファミド

NM: 評価可能分裂中期細胞なし。

染色体異常誘発性：染色体の観察結果を表 2 に示す。

S9 Mix の非存在下及び存在下とも、6 時間処理区において、用量依存性の染色体異常を有する細胞数の増加がみられ、細胞毒性のある濃度でのみ染色体異常の出現頻度が対照群に比し有意に増加した。数的異常は全ての処理区のいずれの濃度とも認められなかった。

一方、陽性対照として用いた MMC (-S9 Mix) 並びに CPA (+S9 Mix) では、明確な構造的染色体異常を有する細胞が増加した。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で、チャイニーズハムスター由来 CHL 細胞株に対し、細胞毒性のある濃度でのみ染色体異常誘発性を有すると判断する。

表 2 6 時間処理区における染色体異常の出現頻度 (A 及び B は反復)

S-9 mix の有無	薬剤/濃度 (µg/mL)		処理時間	標本作製時間	観察細胞数	GAP	染色分体型		染色体型		その他	染色体異常計		染色体異常を有する細胞数			
							切断	交換	切断	交換		+GAP	-GAP	+GAP	-GAP		
-	溶媒対照 (DMSO) 0		6	24	A:100	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0		
					B:100	0	0	0	3	0	0	3	3	1	1		
					計:200	1	0	0	3	0	0	4	3	2	1		
	検体	30			A:100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
							B:100	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1
							計:200	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1
		45			A:100	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1
							B:100	1	1	5	1	1	0	9	8	6	6
							計:200	1	1	5	1	2	0	10	9	7	7↑
	60	A:100			0	9	20	0	0	0	0	29	29	14	14		
		B:100	4	13	19	0	1	1	37	33	16	15					
		計:200	4	22	39	0	1	1	66	62	30↑	29↑					
CPA 10		A:100	2	1	0	0	0	0	3	1	3	1					
		B:100	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1					
		計:200	2	1	0	1	0	0	4	2	4	2					
+	溶媒対照 (DMSO) 0		6	24	A:100	1	0	0	1	2	0	4	3	4	3		
					B:100	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1		
					計:200	1	0	1	1	2	0	5	4	5	4		
	検体	15			A:100	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0		
							B:100	0	0	0	0	1	0	1	1	1	
							計:200	1	0	0	0	1	0	2	1	2	1
		30			A:100	3	0	0	1	0	0	4	1	4	1		
							B:100	1	0	0	0	1	0	2	1	2	1
							計:200	4	0	0	1	1	0	6	2	6	2
	60	A:100			2	3	6	0	0	0	11	9	8	6			
		B:100	2	2	4	0	3	0	11	9	5	5					
		計:200	4	5	10	0	3	0	22	18	13↑	11					
CPA 10		A:50	11	24	31	6	0	0	72	61	33	31					
		B:50	16	22	30	4	1	1	73	57	35	31					
		計:100	27	46	61	10	1	1	145	118	68↑	62↑					

MMC: マイトマイシン C CPA: シクロホスファミド
統計検定: Fisher 正確検定 ↑: p<0.05 ↑↑: p<0.001

表 2 24 及び 48 時間処理区における染色体異常の出現頻度 (A 及び B は反復)

S-9 mixの有無	薬剤/濃度 (µg/mL)		処理時間	標本作製時間	観察細胞数	GAP	染色体分体型		染色体体型		その他	染色体異常計		染色体異常を有する細胞数		
							切	交	切	交		+GAP	-GAP	+GAP	-GAP	
							断	換	断	換						
-	溶媒対照 (DMSO) 0		24	24	A:100	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	
					B:100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
					計:200	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
	検体	7.5			A:100	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1
					B:100	1	0	0	0	1	0	2	1	2	1	1
					計:200	1	0	0	1	1	0	3	2	3	2	2
	検体	15			A:100	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
					B:100	1	0	0	0	1	0	2	1	2	1	1
					計:200	2	0	0	0	1	0	3	1	3	1	1
	検体	30			A:100	0	1	0	0	1	0	2	2	2	2	2
B:100			0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1			
計:200			0	1	0	1	1	0	3	3	3	3	3			
MMC	0.05	A:50	6	8	12	2	0	0	28	22	22	17				
		B:100	2	7	19	1	0	0	29	27	29	27				
		計:150	8	15	31	3	0	0	57	49	51↑	44↑				
-	溶媒対照 (DMSO) 0		48	48	A:100	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	
					B:100	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	
					計:200	0	0	0	1	1	0	2	2	2	2	
	検体	7.5			A:100	0	1	0	2	1	0	4	4	3	3	
					B:100	1	0	0	0	1	0	2	1	2	1	
					計:200	1	1	0	2	2	0	6	5	5	4	
	検体	15.0			A:100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					B:100	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	
					計:200	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	
	検体	22.5			A:100	2	0	0	0	0	1	2	0	3	1	
B:100			2	0	0	0	0	0	2	0	2	0				
計:200			4	0	0	0	0	1	4	0	5	1				
MMC	0.05	A:50	3	16	23	5	3	2	50	47	27	27				
		B:50	1	20	25	11	1	1	58	57	33	32				
		計:100	4	36	48	16	4	3	108	104	60↑	59↑				

MMC: マイトマイシン C CPA: シクロホスファミド
 統計学的有意差 ↑: p<0.05 ↑↑: p<0.001

(3-1) マウスを用いた小核試験

(資料 32)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作製年：

検体純度：

試験動物：CD-1 系マウス (5~6 週齢)、1 群雌雄各 5 匹

体重範囲 雄 23.9~29.7g、雌 19.7~24.2g

試験期間：投与後 72 時間

試験方法：検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液に懸濁して 10mL/kg の容量で、1、5、25mg/kg の用量を単回強制経口投与した。なお、対照群には 0.5%CMC (陰性) 及びクロラムブシルの 10%エタノール溶液を 30mg/kg の用量で同様に投与した。

投与 24 時間後に陰性及び陽性対照群を含め全ての検体投与群の雌雄各 5 匹を屠殺して、大腿骨の骨髓を採取し、スライドガラス上に固定後、メイ-グリュンワルド/ギムザを用いて染色し、骨髓標本を作製した。陰性対照群及び 25mg/kg 群は投与 48 及び 72 時間後にも雌雄各 5 匹を屠殺し、同様に標本を作製した。

各標本について、細胞毒性を調べるために、動物当たり 2000 個以上の赤血球を観察し、全赤血球に対する多染性赤血球の割合を算出した後、引き続き 1000 個の多染性赤血球及び成熟赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球数を計数した。

各標本について、小核を有する多染性赤血球及び成熟赤血球の頻度を調べた。さらに、多染性赤血球/成熟赤血球の割合も求めた。

投与量設定根拠：同種同系統の動物を用い、1 群雌雄各 2 匹とし、検体を 0.5%CMC 水溶液に懸濁して 25、50、100 及び 200mg/kg の用量で単回強制経口投与した。投与 72 時間後に動物を屠殺し、本試験と同様の方法で骨髓標本を作製し、多染性赤血球/成熟赤血球の割合を調べた。また、試験期間中一般状態の観察及び体重測定も行った。その結果、100 及び 200mg/kg 群では死亡例がみられ、25 及び 50mg/kg 群では検体投与による症状が観察され、体重の減少もみられた。また、25 及び 50mg/kg 群では多染性赤血球/成熟赤血球の割合が減少した。以上の結果より、本試験での最高投与量は 25mg/kg とした。

結果：次表に結果を示す。

いずれの検体投与群とも対照群と比べ小核を有する多染性赤血球及び小核を有する成熟赤血球数の有意な増加はみられなかった。また、多染性赤血球/成熟赤血球比も対照群と比べ異常はみられなかった。

一方、陽性対照群では小核を有する多染性赤血球数の有意な ($p < 0.01$) 増加がみられた。

以上の結果より、本試験条件下では、検体の小核誘発性は陰性と判断される。

処理区	投与量 (mg/kg)	動物数	処理時間	性	MNPCE ^{a)}	MNME ^{b)}	P/M ^{c)}
対照 (0.5%CMC)	0	5	24	雄	0.2±0.4	0.3±0.5	0.9
				雌	0.4±0.5	0.4±0.5	0.9
				雄+雌	0.3±0.5	0.4±0.5	0.9
			48	雄	1.0±1.0	1.0±0.7	0.8
				雌	1.0±1.2	1.0±1.4	1.0
				雄+雌	1.0±1.0	1.0±1.0	0.9
			72	雄	0.8±0.8	0.7±1.0	0.8
				雌	0.4±0.5	0.5±0.7	0.8
				雄+雌	0.6±0.7	0.6±0.8	0.8
検体	1	5	24	雄	1.0±0.7	0.4±0.5	1.0
				雌	0.4±0.5	0.9±1.1	0.9
				雄+雌	0.7±0.7	0.6±0.8	0.9
	5	5	24	雄	0.0±0.0	0.6±0.8	1.0
				雌	0.8±0.8	0.3±0.4	0.7
				雄+雌	0.4±0.7	0.4±0.6	0.8
	25	5	24	雄	0.8±0.8	0.2±0.4	0.9
				雌	0.2±0.4	0.2±0.4	0.8
				雄+雌	0.5±0.7	0.2±0.4	0.9
			48	雄	0.4±0.5	0.2±0.4	0.9
				雌	0.8±1.0	1.1±2.1	0.9
				雄+雌	0.6±0.8	0.7±1.5	0.9
72	雄	1.1±0.8	0.4±0.5	0.9			
	雌	1.0±0.7	0.3±0.4	0.8			
	雄+雌	1.0±0.7	0.3±0.4	0.9			
陽性対照 (クロラムピル)	30	5	24	雄	69.8±24.3 [†]	0.9±0.8	0.4
				雌	65.4±24.0 [†]	0.9±0.6	0.5
				雄+雌	67.6±22.9 [†]	0.9±0.7	0.5

注) a : 多染性赤血球 1000 個あたりの小核を有する多染性赤血球数

b : 成熟赤血球 1000 個あたりの小核を有する成熟赤血球数

c : 多染性赤血球/成熟赤血球比

統計学的方法 : Mann-Whitney U 検定 † : $P < 0.01$

(3-2) マウスを用いた小核試験

(資料 33)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作製年：

検体純度：

試験動物：CD-1 系マウス (5~6 週齢)、1 群雌雄各 5 匹
体重範囲 雄 23.5~29.1g、雌 17.9~24.0g

試験期間：投与後 72 時間

試験方法：検体を 0.5%メチルセルロース (MC) 水溶液に懸濁して 10mL/kg の容量で、12.5、25.0 及び 50.0mg/kg の用量を単回強制経口投与した。なお、対照群には 0.5%CMC (陰性) 及びクロラムブシルの 10%エタノール溶液を用量 30mg/kg で同様に投与した。

投与 24 時間後に、陰性及び陽性対照群を含め全ての検体投与群の雌雄各 5 匹を屠殺して、大腿骨の骨髓を採取し、スライドグラス上に固定後、5%ギムザを用いて染色し、骨髓標本を作製した。陰性対照群及び 50.0mg/kg 群は投与 48 及び 72 時間後にも雌雄各 5 匹を屠殺し、同様に標本を作製した。

各標本について、細胞毒性を調べるために、動物当たり 2000 個以上の赤血球を観察し、全赤血球に対する多染性赤血球の割合を算出した後、引き続き 1000 個の多染性赤血球及び成熟赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球数を計数した。

各標本について、小核を有する多染性赤血球及び成熟赤血球の頻度を調べた。さらに、多染性赤血球/成熟赤血球の割合も求めた。

投与量設定根拠：同種同系統の動物を用い、1 群雌雄各 2 匹とし、検体を 0.5%MC 水溶液に懸濁して 10mL/kg の容量で 30、50、70 及び 120mg/kg の用量を単回強制経口投与した。投与 72 時間後に動物を屠殺し、本試験と同様の方法で骨髓標本を作製し、多染性赤血球/成熟赤血球の割合を調べた。また、試験期間中、一般状態の観察及び体重測定も行った。その結果、投与後、円背位、活動低下、運動過剰、立毛、痙攣等の症状を示した。120mg/kg 群では雄が 2 例とも死亡し、70mg/kg 群では雌雄各 1 例が死亡した。30mg/kg 群の雌 1 例を除き、全ての投与動物は体重が減少した。投与動物の多染性赤血球/成熟赤血球の割合には明確な骨髓増殖抑制の影響はみられなかった。この結果より、本試験での最高用量は 50mg/kg とした。

結果：次表に結果を示す。

50mg/kg 群では円背位、立毛、痙攣、活動低下等が合計で 8/30 例に認められた。他の群では一般症状の変化は認められなかった。

いずれの検体投与群とも対照群と比べ小核を有する多染性赤血球及び小核を有する成熟赤血球数の有意な増加はみられなかった。また、多染性赤血球/成熟赤血球比も対照群と比べ異常はみられなかった。また、小核を有する多染性赤血球数に投与関連性の影響は雌雄とも認められなかった。

一方、陽性対照群では小核を有する多染性赤血球数の有意な ($p < 0.01$) 増加がみられ、多染性赤血球/成熟赤血球比 (0.6) は減少がみられた。

以上の結果より、本試験条件下では、検体の小核誘発性は陰性と判断される。

処理区	投与量 (mg/kg)	動物数	処理時間	性	MNPCE ^{a)}	MNME ^{b)}	P/M ^{c)}
対照 (0.5%MC)	0	5	24	雄	1.2±0.8	0.6±0.5	0.8
				雌	1.1±0.4	0.2±0.4	1.1
				雄+雌	1.2±0.6	0.4±0.5	0.9
			48	雄	0.4±0.8	1.1±0.8	1.0
				雌	0.9±0.6	0.9±0.5	1.0
				雄+雌	0.6±0.7	1.0±0.7	1.0
			72	雄	0.6±0.9	0.0±0.0	1.0
				雌	0.8±0.8	0.4±0.5	1.0
				雄+雌	0.7±0.8	0.2±0.4	1.0
検体	12.5	5	24	雄	1.0±1.2	1.0±0.8	0.7
				雌	0.5±0.5	1.1±1.1	1.0
				雄+雌	0.8±0.9	1.1±0.9	0.9
	25.0	5	24	雄	1.2±0.4	0.7±1.0	0.8
				雌	0.9±0.6	1.0±1.1	1.0
				雄+雌	1.1±0.5	0.9±1.0	0.9
	50.0	5	24	雄	1.0±0.7	0.4±0.8	1.0
				雌	0.2±0.4	0.4±0.5	1.1
				雄+雌	0.6±0.7	0.4±0.7	1.0
			48	雄	1.4±1.1	0.3±0.4	0.9
				雌	0.4±0.8	0.7±0.4	0.9
				雄+雌	0.9±1.1	0.5±0.5	0.9
72	雄	0.6±0.9	0.4±0.5	0.9			
	雌	1.5±1.2	0.5±0.7	0.6			
	雄+雌	1.0±1.1	0.4±0.6	0.7			
陽性対照 (ケラムアール)	30	5	24	雄	59.6±23.3	1.5±0.3	0.5
				雌	36.8±7.6	0.7±0.8	0.7
				雄+雌	48.2±20.3 [†]	1.1±0.7	0.6

注) a : 多染性赤血球 1000 個あたりの小核を有する多染性赤血球数

b : 成熟赤血球 1000 個あたりの小核を有する成熟赤血球数

c : 多染性赤血球/成熟赤血球比

統計学的方法 : Mann-Whitney U 検定 † : $P < 0.01$

(4-1) 一次 DNA 損傷

細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 34)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作製年：

検体純度：

方法：枯草菌の組換え修復機構保持株 (H17, rec+) と欠損株 (M45, recE-) を用い、代謝活性化及び非活性化法によって DNA 損傷の誘発性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて溶解した。本試験では 20000 µg/disk を最高濃度とし、各プレート 2 枚を用いた。

結果：検体処置群では代謝活性化を含め、最高濃度においても両株に生育阻止を全く認めなかった。

一方、陽性対照 (非活性化法ではマイトマイシン C、活性化法では Trp-P-1) では両株の間で明らかな生育阻止の差が生じた。

また、陰性対照のカナマイシンでは、両菌株の生育阻止の直径は同程度であった。

以上の結果より、フィプロニルは DNA 損傷誘発性を有しないものと判断される。

薬物	濃度 (µg/disk)	S9 分画 (-)			S9 分画 (+)		
		阻止域 (mm)		差 (mm)	阻止域 (mm)		差 (mm)
		M-45	H-17		M-45	H-17	
溶媒対照 (DMSO)	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
検体	500	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1000	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	2000	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	5000	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	10000	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20000	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
陰性対照 (カナマイシン)	0.2	9.0	7.0	2.0			
陽性対照 (マイトマイシン C)	0.01	18.5	0	18.5			
陽性対照 (Trp-P-1)	5				10.5	0	10.5

Trp-P-1 : 3-アミノ 1,4-ジメチル-5H-ピリド [4,3-b] インドール

1-14. 生体の機能に及ぼす影響

フィプロニルの一般薬理試験

(1) 中枢神経系に対する作用

(資料 35)

試験機関： (株)三菱化学安全科学研究所

報告書作成年：

検体純度：

投与液の調製方法：検体は 0.5% トラガント溶液に懸濁して、所定の濃度とした。

用量の選定根拠及び観察時期：一般症状の観察は急性毒性試験結果を参考にして 0~300mg/kg を設定し、300mg/kg 群では全例が、100mg/kg 群では 1/3 例が死亡し、30mg/kg 群では投与の影響が認められたことから、一般症状の観察以外の試験は 3、10 及び 30mg/kg とし、症状の変化について、経時的に測定を行わない試験は症状がピークに達した投与 6 時間後に観察した。

(1-1) マウスにおける一般症状

試験動物：ICR 系マウス、5 週齢、体重 雄 24.7~29.7g、1 群各 3 匹

方法：検体 0、10、30、100 及び 300mg/kg を強制経口投与し、投与 1、2、4、6、8 及び 24 時間後に Irwin の多次元観察法に準じて観察した。

また、投与 2、3、4 及び 7 日後に毒性症状の徴候と死亡の有無を観察した。

結果：100 及び 300mg/kg 群では運動性の低下、挙尾反応・振顫などの中枢興奮様症状、運動協調性の低下及び瞳孔の散大・眼瞼裂の軽度な狭小が認められた。これらの症状は、100mg/kg 群では投与 4~6 時間後、300mg/kg 群では投与 1~4 時間後より発現し、6 時間後にピークに達した後も継続し、100mg/kg 群では 24 時間後に 1 例が、300mg/kg 群では 8 時間後に 2 例、24 時間後に残りの 1 例が死亡した。

30mg/kg 群では投与 6 時間~8 時間後に間代性痙攣・挙尾反応・振顫・軽度な瞳孔の散大が認められたが、投与 24 時間後には回復し、投与 7 日後まで異常は認められなかった。

10mg/kg 群においては一般症状に及ぼす影響は認められなかった。

(1-2) マウスにおける痙攣誘発作用

(1-2-1) 電撃痙攣に及ぼす影響

試験動物: ICR系マウス、5週齢、体重 雄 26.7~32.6g、1群雄各10匹

方 法: 検体 0、3、10 及び 30mg/kg を強制経口投与し、6時間後に電撃痙攣装置を用いて、角膜に正常動物の痙攣誘発閾値よりやや低い電気刺激(電流値: 8mA、パルス幅: 5msec、刺激間隔: 10msec、刺激時間: 0.5sec)を与え、痙攣及び昏睡の発現の有無を観察した。

陽性対照群には電気刺激を与える 15 分前にペンチレンテトラゾール 40mg/kg を皮下投与した。

結 果: いずれの検体投与群においても電撃により惹起される痙攣に対する誘発作用は認められなかった。

陽性対照群では、8/10 例に強直性屈曲、強直性伸展及び間代性の各痙攣ならびに昏睡が発現し、有意な痙攣誘発作用が認められた。

(1-2-2) ペンチレンテトラゾール痙攣に及ぼす影響

試験動物: ICR系マウス、5週齢、体重 雄 27.3~33.3g、1群雄各10匹

方 法: 検体 0、3、10 及び 30mg/kg を強制経口投与し、6時間後にペンチレンテトラゾール 80mg/kg を皮下投与し、強直性伸展痙攣及び死亡の発現の有無を観察した。

陽性対照群にはペンチレンテトラゾールを投与する 10 分前にカフェイン 150mg/kg を経口投与した。

結 果: 30mg/kg 群で 5/10 例に強直性伸展及び死亡が発現し、有意な誘発作用が認められた。10 及び 3mg/kg 群では、ペンチレンテトラゾール投与による痙攣に対する誘発作用は認められなかった。

一方、陽性対照群では全例に強直性伸展及び死亡が発現し、有意な痙攣誘発作用が認められた。

(1-3) ラットにおける正常体温に及ぼす影響

試験動物: Wistar系ラット、5週齢、体重 雄 127~146g、1群雄各6匹

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

方 法： 検体 0、3、10 及び 30mg/kg を強制経口投与し、投与前及び投与 1、2、4、6 及び 8 時間後に直腸温はデジタル電子体温計を用いて測定した。

結 果： いずれの投与群においても体温に対する影響は認められなかった。

(1-4) ウサギにおける脳波に対する作用

(資料 36・37)

試験機関:

報告書作成年:

(1-4-1) 単回経口投与の脳波に対する影響

検体純度: フィプロニル

試験動物: ニュージーランド白色種ウサギ、約 6~9 月齢、体重雌 2.70~3.33kg、1 群雌各 5 羽

方法: ペンチレンテトラゾール麻酔下でウサギの脳を手術して電極を埋め込み、12 日間の回復期間中に、拘束に馴化させる訓練をした。16 時間絶食した動物に 0.01% Tween 80 添加 0.5%メチルセルロースナトリウム溶液に懸濁した検体 4 mg/kg を強制経口投与し、投与前及び投与後 24 時間毎に 1 週間にわたり、無麻酔下で脳波を測定した。その他、行動と臨床症状は投与後 1 週間まで毎日観察し、体重は投与 1 週間前、直前及び投与後 24 時間毎に 2 週間後まで測定した。溶媒対照群には、0.01% Tween 80 添加 0.5%メチルセルロースナトリウム溶液を 1mL/kg 投与し、検体投与群と同様に測定、記録を行った。

結果: 検体投与により皮質 EEG の総電気活性とスペクトル成分が変化し、主に投与後 72 時間目と 144 時間目に平均周波数と中央周波数がやや右に遷移した。以上の変化は軽度な中枢神経系刺激を示唆する所見と考えられた。

行動・臨床症状及び体重には、投与関連性の影響はみられなかった。

(1-4-2) 反復経口投与の脳波に対する影響

検体純度:

試験動物: ニュージーランド白色種ウサギ、約 6~9 月齢、体重雌 3.09~3.47kg、1 群雌各 5 羽

方法: 麻酔下で手術して脳に電極を埋め込み、10 日間の回復期間中に、拘束に馴化させる訓練をした。0.01% Tween80 添加 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し容量 1mL/kg で用量 4 及び 8 mg/kg を 4 日間反復強制経口投与し、投与前 30 分間及び投与後 1 時間目から 30 分間毎日、無麻酔下で脳波を測定した。その他、行動と臨床症状は投与後毎日観察し、体重は投与 1 週間前、直前及び投与後毎日測定した。溶媒対照群には、0.01% Tween80 添加 0.5%メチルセルロースナトリウム溶液を 1mL/kg 投与し、検体投与群と同様に測定、記録を行った。

なお、死亡が 4mg/kg 群で 2/5 例、8mg/kg 群で 1/5 例に認められたので、試験は 5 日目に中止した。

結 果: 中毒症状として、激越行動、過呼吸、呼吸窮迫症、異常低姿勢、皮膚温上昇、耳介血流量増加、振戦、運動失調、痙攣等が認められ、呼吸停止による死亡が 4mg/kg 群で 2/5 例、8mg/kg 群で 1/5 例に認められた。

検体投与により皮質 EEG の変化が著明で脳波全体の振幅が低下傾向を示し、時に大きな徐波と鋭波がみられた。EEG の詳細な解析で、中枢神経系が全体として軽度活性化していることが示唆され、4mg/kg 群の方が著明であった。この変化のピークは投与約 72 時間後と考えられた。

(2) 循環器系に対する作用

(資料 38)

試験機関:

報告書作成年:

検体純度:

試験動物: ニュージーランド白色種ウサギ、体重 2.5~3.5kg、1 群雌各 8 羽

方 法: 0.01% Tween80 添加 0.5% カルボキシメチルセルロース溶液に懸濁し容量 1mL/kg で用量 4mg/kg をウサギに単回強制経口投与し、投与後 1、24、48、72、96 及び 120 時間に無麻酔下で血圧、心拍数、心電図を測定した。

結 果: 血圧・心拍数について、溶媒対照と比較し統計学的に有意な影響はみられなかった。心電図についても、何れの動物でも投与時点から投与 120 時間後まで、不整脈や心リズム障害は発現しなかった。

(3) 自律神経系、(4) 消化器系、(5) 骨格筋及び(6) 血液に対する作用 (資料 35)

試験機関:

報告書作成年:

検体純度:

投与液の調製方法: 中枢神経系に対する作用に記載のとおり。

用量の選定根拠及び観察時期: 中枢神経系に対する作用に記載のとおり。

(3) 瞳孔径に及ぼす影響

試験動物: Wistar 系ラット、5 週齢、体重 雄 140~163g、1 群雄各 6 匹

方 法: 検体 0、3、10 及び 30 mg/kg を強制経口投与し、投与前及び投与後 1、2、4、6、8 及び 24 時間後に実体顕微鏡により瞳孔径を測定した。

結 果: 30mg/kg 群で投与 6 時間後に有意な散大が認められた。

10 及び 3mg/kg 群では瞳孔径に対する影響は認められなかった。

(4) 消化器系に及ぼす影響

試験動物: ICR 系マウス、5 週齢、体重 雄 21.9~28.0g、1 群各 8 匹

方 法: 一晚絶食させたマウスに検体 0、3、10 及び 30mg/kg を強制経口投与し、投与 6 時間後に 5%アラビアゴム溶液に懸濁させた 5%炭末液 0.2mL/匹を強制経口投与し、その 30 分後に頸椎脱臼により致死させて胃腸管を摘出、十二指腸起始部より炭末到達先端までの長さを測定して、小腸全長に対する炭末最先進部の移行率(%)を腸管輸送能とした。

結 果: 30mg/kg 群で有意な抑制が認められ、その抑制率は 30.5%であった。

3 及び 10mg/kg 群では腸管輸送能に対する影響は認められなかった。

(5) 骨格筋に及ぼす影響

試験動物: ICR 系マウス、5 週齢、体重 雄 27.1~33.3g、1 群各 8 匹

方 法： 水平に張り渡した針金にマウスの前肢をかけ、5 秒以内に後肢をかけられた動物を選び試験に供した。

検体 0、3、10 及び 30mg/kg を強制経口投与し、投与後 1、2、4、6、8 及び 24 時間後に同様にマウスの前肢を針金にかけて懸垂させ、10 秒以内に後肢を針金にかけられなかった場合を筋弛緩作用陽性とした。

結 果： いずれの投与群においても懸垂作用に対する影響は認められなかった。

(6) 血液に及ぼす影響

(6-1) 溶血作用

試験動物： Wistar 系ラット、5 週齢、体重 雄・126~149kg、1 群各 6 匹

方 法： 検体 0、3、10 及び 30mg/kg を強制経口投与した。投与 6 時間後にペントバルビタール麻酔下で後大静脈より採血し、ヘパリン処理後 3000rpm で 5 分間遠心分離して得た血漿の 540nm における吸光度を分光光度計を用いて測定した。

結 果： いずれの投与群においても溶血作用は認められなかった。

以上の結果より、本剤は無麻酔動物の生体機能に対して、致死量 (50mg/kg) に近い 30mg/kg 群で痙攣誘発、瞳孔の散大及び腸管輸送能の抑制を認めた。また、中枢神経系が全体として軽度活性化しており、変化のピークは投与約 72 時間後であった。

「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

試験項目 (試験動物)	投与経路(溶媒) [麻酔の有無]	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
1) 中枢神経系に対する作用						
1-1) 一般症状 [Irwin 法] (マウス)	経口投与 (0.5%トリアソール溶液) [無麻酔]	0、10、30、 100、300	雄 3	30 [死亡例 数: 100mg/kg 1/3 例、 300mg/kg 3/3 例]	10	30mg/kg 以上の投与群で、 投与後 1 時間以降に間代 性痙攣・挙尾反応・振頭な どの中樞興奮様症状、瞳孔 の散大などが認められ、 100mg/kg 以上で死亡例(左 記)がみられた。
1-2) 痙攣誘発作用						
電撃痙攣誘発 作用 (マウス)	経口投与 (0.5%トリアソール溶液) 陽性対照: ペンチレニト ラゾール 40mg/kg(皮下) [無麻酔]	0、3、10、30	雄 10	-	30	いずれの投与群とも電撃 により惹起される痙攣に 対する誘発作用は認めら れなかった。
薬剤痙攣誘発 作用 (マウス)	経口投与 (0.5%トリアソール溶液) 痙攣誘発剤: ペンチレニ トラゾール 80mg/kg(皮 下) 陽性対照: カフェイン 150mg/kg(経口) [無麻酔]	0、3、10、30	雄 10	30	10	30mg/kg 群で 5/10 例に強 直性伸展及び死亡が発現 し、有意な誘発作用が認め られた。
1-3) 正常体温 に対する作用 (ラット)	経口投与 (0.5%トリアソール溶液) [無麻酔]	0、3、10、30	雄 6	-	30	いずれの投与群において も体温に対する影響は認 められなかった。
1-4) 脳波に対 する影響(ウサ ギ)	経口投与 (0.5%Tween80 添加メ チルセルロース懸濁液) [無麻酔]	0、4	雌 5	4	-	皮質 EEG の総電気活性と スペクトル成分が変化し、 主に投与後 72 時間目と 144 時間目に平均周波数と 中央周波数かやや右に遷 移した。
		0、4、8	雌 5	4	-	皮質 EEG の変化が著明で 脳波全体の振幅が低下傾 向、時に大きな徐波と鋭波 がみられた。中枢神経系が 全体として軽度活性化し ており、4mg/kg 群の方が 著明であった。変化のピー クは投与約 72 時間後と考 えられた。4mg/kg 群で 2/5 例、8mg/kg 群で 1/5 例が 死亡した

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

試験項目 (試験動物)	投与経路(溶媒) [麻酔の有無]	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
2)呼吸、循環器系に対する作用						
血圧・心拍数・ 心電図(ウサギ)	経口投与 (0.5%Tween80 添加カ ルボキシメチルセルロース懸濁 液) [無麻酔]	0.4	雌 8	-	4	溶媒対照と比較し、有意な 影響はみられなかった。
3)自律神経系に対する作用						
瞳孔径に及ぼ す影響(ラット)	経口投与 (0.5%トランクソル溶液)	0.3、10、30	雄 6	30	10	30mg/kg 群で投与6時間後 に有意な散大が認められ た。
4)消化器系に及ぼす影響(腸輸送能に対する作用)						
(マウス)	経口投与 (0.5%トランクソル溶液) [無麻酔]	0.3、10、30	雄 8	30	10	30mg/kg 群で有意な抑制 (抑制率 30.5%)が認めら れた。
5)骨格筋に及ぼす影響(懸垂動作試験)						
(マウス)	経口投与 (0.5%トランクソル溶液) [無麻酔]	0.3、10、30	雄 8	-	30	いずれの投与群とも影響 は認められなかった。
6)血液系に及ぼす影響						
溶血に対する 作用(ラット)	経口投与 (0.5%トランクソル溶液) [無麻酔]	0.3、10、30	雄 6	-	30	いずれの投与群とも影響 は認められなかった。

1-15. 解毒及び治療

マウス・ラット・ウサギにおける解毒試験

(資料 39)

試験機関:

報告書作成年:

検体純度:

供試動物: マウス: OF1系、8~9週齢(体重 雄 25~36g、雌 18~27g)、1群各5~24匹

ラット: SD系 ICO:OFA、8~9週齢(体重 雄 168~346g、雌 162~231g)、

1群各6~12匹

ウサギ: ニュージーランド白色種、3ヶ月令(体重 雄 2.9~3.6kg、雌 2.9~4.0kg)、

1群各4匹

解毒剤選定根拠: 予備実験で3種動物(ラット、マウス、ウサギ)に対する単回投与により誘発される中毒症状及び死亡について検討した。その結果、マウスでは25mg/kg以上、ラットでは50mg/kg以上、ウサギでは20mg/kg以上で、全動物に振戦、強直性間代性痙攣、音への過敏反応等の神経毒性症状が誘発された。

そこで、検体の神経毒性に関与する機序について以下の実験を行った。

アンフェタミン様作用: アンフェタミンと関連物質の毒性作用(痙攣発作—死亡)は個体別飼育より集団飼育で顕著であることが知られているので、マウスを用い飼育法の違いによる死亡率を比較した結果、集団飼育でも死亡率の上昇がないことから、本剤の神経毒性はアンフェタミン様作用を介さないと判断された。

雌雄マウスの急性経口毒性LD50値

集団飼育マウス: 150 (110~204)mg/kg

個体別飼育マウス: 95 (60~148)mg/kg

GABA 作動系との相互作用: 痙攣誘発剤ピククリン (GABA 受容体の競合的阻害剤)及びピクロトキシン (GABA 受容体に関連したCl⁻チャンネル阻害剤)と検体との相互作用について、中等度の発作を生じるが死亡のみられない痙攣誘発剤の用量でマウスを用いて検討した。その結果、ピククリン(2.5 mg/kg、腹腔)あるいはピクロトキシン(1.5 mg/kg、皮下)と検体(50、100 mg/kg、経口)との併用は痙攣発作を増強し、死亡率を高めた。

さらに、GABA 作動性伝達を促進する抗痙攣剤フェノバルビタール(Cl⁻チャンネルのピクロトキシン部位に結合したバルビツール酸部位を介する)及びクロナゼパム(GABA_A受容体機能の増強)が検体のピククリン/ピクロトキシン誘発痙攣増強作用に対する拮

抗作用を有するかについて検討した。検体及び/またはピククリンあるいはピクロトキシンの投与前のフェノバルビタール (40 mg/kg、経口) あるいはクロナゼパム (0.8 mg/kg、経口) の投与は、全身性痙攣の増強を有意あるいは完全に抑制した。

これらの結果から、検体の神経毒性発現機序は、アンフェタミン様作用ではなく、脳内 GABA 受容体に作用し、GABA 神経伝達を阻害するためであることが示唆されたので、解毒剤とし GABA 作動性伝達促進剤であるクロナゼパム及びフェノバルビタールを選択し、その効果を検討した。

治療用解毒剤の検索

マウス、ラット、ウサギを用いて、検体投与による死亡等が解毒剤の事前投与と継続投与が、どの様に影響するかを検討した。解毒剤としてクロナゼパム、フェノバルビタールを用いた。

予防的/治療的投与によるクロナゼパム及びフェノバルビタールの効果

方法：検体投与 1 時間前に抗痙攣剤 (クロナゼパムまたはフェノバルビタール) またはその溶媒の 1 日当たり総用量の半量を経口投与し、投与 5 時間後に残りの半量を投与した。翌日以降マウス・ラットについては 5 日間、ウサギについては 10 日間、抗痙攣剤またはその溶媒を半量ずつ 6 時間間隔で 1 日に 2 回投与を繰り返した。投与量 (mg または mL/kg/日) は以下のとおりである。

		マウス	ラット	ウサギ
検体 (mg)	フィピロニル	100, 200	50	80
抗痙攣剤 (mg/kg)	クロナゼパム	0.4, 0.8	0.8, 1.6	0.8
	フェノバルビタール	40, 80	2.5, 5, 10, 20, 40, 80	10, 20, 40
溶媒 (mL)	*	20	10	5

*：検体の溶媒は 0.2% Tween 80 溶液またはコーンオイル、抗痙攣剤は注射用水。

結果：

表-1a に要約した。

表-1a 解毒剤の予防的投与による効果

解毒剤 mg/kg	フィプロニル mg/kg	供試 動物	試験成績(%)			
			死亡率	予防効果	結果要約	
クロナセ ハム	-	100	マウス	雄 63	-	フィプロニル 100mg/kg に対し、クロナセハム 0.8mg/kg 投与で予防効果が認めら れたが、体重・摂餌量・摂水量の減 少には有意な予防効果を示さな かった。 またフィプロニルの高用量(200mg/kg) 投 与に対しては予防効果が認められ なかった。
	0.4	100		雌 54	-	
	-	100		雄 33	46 *	
				雌 38	31	
	0.8	100		雄 71	-	
				雌 71	-	
	-	200		雄 29	60 **	
				雌 25	70 **	
0.8	200	雄 71	-			
		雌 71	-			
		雄 29	9			
		雌 25	17			
フェイナル ビタル	-	100	マウス	雄 72	-	フィプロニル 100mg/kg に対し、フェイナル ビタル 80mg/kg 投与で予防効果が認め られた。また、フェイナルビタルを 80mg/kg 投与したところフィプロニル 200mg/kg に対しても有意な予防効 果が得られた。
	80	100		雌 72	-	
	-	200		雄 11	80.3**	
				雌 11	81.7**	
	80	200		雄 100	-	
				雌 94	-	
		雄 50	50 **			
		雌 44	52.3**			
クロナセ ハム	-	50	ラット	雄 100	-	フィプロニル 50mg/kg に対し、クロナセハム 0.8mg/kg では予防効果が認められ ず、1.6mg/kg 投与で予防効果が認め られたが、体重・摂餌量・摂水量の 減少には有意な予防効果を示さな かった。
	0.8	50		雌 100	-	
	-	50		雄 100	0	
				雌 100	0	
	1.6	50		雄 50	-	
				雌 33	-	
		雄 33	40			
		雌 17	40			
フェイナル ビタル	-	50	ラット	雄 67	-	フィプロニル 50mg/kg に対し、フェイナル ビタル 40mg/kg 投与は、死亡に対する予 防効果を示したが、フェイナルビタルを 80mg/kg 投与することにより、死亡 に対する完全な予防効果のみでな く食欲不振の程度と持続期間にも 予防効果がみられた。
	40	50		雌 83	-	
	-	50		雄 0	100	
				雌 17	79	
	80	50		雄 50	-	
				雌 33	-	
		雄 0	100			
		雌 0	100			
クロナセ ハム	-	80	ウサギ	100 ^{a)}	-	フィプロニル 80mg/kg に対し、クロナセハム 0.8mg/kg では予防効果は認められ なかった。
	0.8	80		75 ^{a)}	25	

統計学的方法 : Fisher 直接確率検定 * : p<0.05 ** : p<0.01

表-1a 解毒剤の予防的投与による効果(つづき)

解毒剤 mg/kg	フィプロニル mg/kg	供試 動物	試験成績(%)			
			死亡率	予防効果	結果要約	
フェノバル ピタール	-	80	ウサギ	67 ^{a)}	-	フィプロニル 80mg/kg に対し、フェノバルピ タール 10mg/kg 投与で、死亡に対する予 防効果を示した。高用量(40mg/kg) の投与では、死亡のみでなく食欲不 振も改善された。
	10	80		33 ^{a)}	51	
	20	80		0 ^{a)}	100	
	40	80		0 ^{a)}	100	

a): 雄+雌

解毒剤の単用では保護効果がない用量を2等分し、検体投与1時間前及び投与5~6時間後にそれぞれ投与し、さらに半量ずつ6時間間隔で1日に2回、5日間併用投与を繰り返した。結果を表1bに示す。

表-1b 解毒剤の予防的投与による併用の効果

解毒剤 mg/kg		フィプロニル mg/kg	供試 動物	試験成績(%)		
CLO	PB			死亡率	予防効果	結果要約
-	-	100	マウス	58	-	フィプロニル 100mg/kg に対し解毒剤の単 独使用では予防効果は認められな かったが、併用では顕著な死亡率の 低下が認められた。
0.4	-	100		42	28	
-	40	100		42	28	
0.4	40	100		24	57	
-	-	50	ラット	42	-	フィプロニル 50mg/kg による死亡に対し て併用により中程度の死亡率の低 下がみられた。
-	5	50		42	0	
0.8	5	50		25	40	

CLO: クロナゼパム PB: フェノバルピタール

マウス及びラットに対して解毒剤の単用では保護効果がない用量で併用すると検体による痙攣発作とその後の死亡に対する保護効果(死亡率の低下)が認められ、これら解毒剤の抗痙攣作用の相加的効果が示唆された。

治療的投与によるクロナゼパム及びフェノバルピタールの拮抗作用

方法: 検体の投与前後にクロナゼパムまたはフェノバルピタールを投与した場合に認められた保護効果(死亡率の低下)が、検体の投与後のみに投与した場合にも認められるかについてマウスを用いて検討した。投与スケジュールは前記の予防的/治療的投与による効果試験に準じたが、抗痙攣剤の投与は検体投与1時間後から行った。

フィプロニル投与量: 100、200mg/kg(経口投与)
 解毒剤: クロナゼパム投与量: 0.4、0.8mg/kg(経口投与)
 フェノバルピタール投与量: 20、40、80mg/kg(経口投与)

結果: 表-2に要約した。

表-2 解毒剤の治療的投与による効果

解毒剤 mg/kg	フィプロニル mg/kg	供試 動物	試験成績 (%)		
			死亡率	治療効果	結果要約
クロナゼパム	-	100	雄 50.0	-	フィプロニル 100 または 200mg/kg 投与後にクロナゼパムを連続投与しても予防的投与の結果と異なり、有意な治療的効果は認められなかった。
			雌 50.0	-	
	0.4	100	雄 58.0	0	
			雌 42.0	16	
	-	100	雄 60.8	-	
			雌 75.0	-	
	0.8	100	雄 50.0	14.5	
			雌 58.2	31.2	
-	200	雄 100	-		
		雌 100	-		
0.8	200	雄 83.0	17		
		雌 72.3	27.7*		
フェノバルビタール	-	100	雄 50.0	-	フィプロニル 100mg/kg 単回投与後にフェノバルビタールを 20, 40 または 80mg/kg 投与したところ、40mg/kg 以上の投与量で有意な死亡率の低下及び治療的効果が認められた。 フィプロニル 200mg/kg 投与に対し、同様にフェノバルビタールを 40 または 80mg/kg 投与した場合、40mg/kg では効果が認められなかったが、80mg/kg では死亡、痙攣に対し有意な防止効果が認められた。しかし、食欲不振に対する効果は認められなかった。
			雌 50.0	-	
	20	100	雄 50.0	0	
			雌 17.0	66	
	-	100	雄 58.5	-	
			雌 58.5	-	
	40	100	雄 17.0	71*	
			雌 16.5	67*	
	-	100	雄 72.3	-	
			雌 77.6	-	
	80	100	雄 11.3	83**	
			雌 16.7	79.7**	
	-	200	雄 100	-	
			雌 100	-	
	40	200	雄 92.0	8	
			雌 75.0	25	
-	200	雄 89.0	-		
		雌 89.0	-		
80	200	雄 28.0	69.3**		
		雌 33.3	64**		

統計学的方法 : Fisher 直接確率検定 * : p<0.05 ** : p<0.01

結論: 以上の結果より、クロナゼパムとフェノバルビタールを用いた試験において、治療的投与時に得られた結果から、本剤の神経毒性に対して著明な防止効果及び治療効果を示すフェノバルビタールが有効な解毒剤として提案できる。

1-16. その他の試験成績

(1) チロキシンの血中クリアランスを用いた甲状腺機能への影響試験

(資料 40)

試験機関:

[GLP 対応]

報告作製年:

試験の目的: 本剤の甲状腺機能への間接的な作用を把握するため、甲状腺ホルモン(チロキシシン(T₄))の血中クリアランスに及ぼす影響を検討した。同時に、チロキシシンクリアランスを増加させる事が知られているフェノバルピタールを対照剤として、その程度を比較した。

検体純度:

供試動物: Cr1: CD(SD)BR系ラット雄、7週令、体重282~306g、1群6匹

投与方法: 検体は0.5%メチルセルロース懸濁液に懸濁し、容量5mL/kgで用量10mg/kgを1日または14日間強制経口投与した。比較剤フェノバルピタールも同様に懸濁し、容量2mL/kgで用量80mg/kgを腹腔内投与した。対照群には溶媒のみ5mL/kgを経口投与した。投与容量は直近の体重に基づき算出した。

その他、チロキシシンクリアランスを測定するため、試薬として、^[125I]チロキシシン; L-[3', 5' -^{125I}]チロキシシンのエタノール/水(3/1)溶液(放射能濃度50μCi/mL)及びNaIを使用した。

試験方法: 検体投与1日及び14日の投与約5分及び10時間5分後の2回、NaI(1mg/匹)の0.9%生理食塩水を腹腔内投与し、更に検体投与4時間後に^[125I]チロキシシン(10μCi/kg)の0.9%生理食塩水を尾静脈より静注した。チロキシシン投与後0.5、1、2、4、8、12、24及び30時間に尾静脈より採血し、血液中の総放射能をガンマーカウンターで測定し、血液中の放射能推移を測定した。

採血の一部は、チロキシシンから^{125I}が放出されたかどうか、またそれが全血中^{125I}濃度測定値に影響したか否かをチェックするため、トリクロロ酢酸(TCA)で処理して血中タンパクを沈殿除去した上清中の放射能を測定した。

結果: 測定された放射能は、血液TCA処理後の上清中には認められず、従って測定された放射能濃度はほぼ全量チロキシシン量を示していると考えられた。得られた個々のチロキシシン濃度データより、チロキシシンの血中動態パラメーター(半減期、クリアランス、分布容量)を算出した(表1)。

表 1 検体投与がラットのチロキシシン血中動態パラメーターに及ぼす影響(平均値±SD)

群	チロキシシン血中動態 パラメーター	投与期間	
		1 日	14 日間
溶媒対照	終末半減期 (hr)	17.2±2.5	22.5±2.4
	クリアランス (mL/分)	0.0548±0.0052	0.0568±0.0050
	分布容量 (mL)	80.54±6.55	110.05±2.41
検体 (10mg/kg)	終末半減期 (hr)	15.6±3.0	11.8±1.5 (52%↓)
	クリアランス (mL/分)	0.0606±0.0073	0.1484±0.0174 (261%↑)
	分布容量 (mL)	80.43±4.10	150.31±14.41 (137%↑)
フェノバルビタール (80mg/kg)	終末半減期 (hr)	14.1±0.5 (82%↓)	15.5±2.6 (69%↓)
	クリアランス (mL/分)	0.072±0.0053 (132%↑)	0.1045±0.0168 (184%↑)
	分布容量 (mL)	87.83±5.91 (109%↑)	137.83±12.79 (125%↑)

統計学的方法: Student t-検定 1: $P \leq 0.05$ ↓↑: $P \leq 0.01$

() の数値は対照群に対する比率%

検体のチロキシシンクリアランスに及ぼす影響は投与 1 日後では有意な影響は認められなかったが、14 日間投与後では、チロキシシンの半減期は対照群の 52% と短縮し、クリアランス速度は対照群の 261%、分布容量も 137% となり、増加した。これは、フェノバルビタール以上であったが、効果の発現は遅かった。

本試験結果はフィプロニルを 10mg/kg/日 で 14 日間投与すると全血中の甲状腺ホルモン (チロキシシン) の消失を促進することを示している。