

1-6. 90日間反復経口投与毒性試験

(1) ラットを用いた亜急性毒性試験

(資料 14)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:

検体純度:

試験動物: CD系ラット、4~5週齢、体重: 雄 178~185g; 雌 155~153g、1群雌雄 各 10匹

試験期間: 13週間(11月20日~ 2月22日)

投与方法: 検体を0、1、5、30、300ppmの濃度で飼料に混入し、13週間にわたって混餌投与した。混餌は毎週調製した。

投与量設定根拠: 別の試験機関において25、50、100、200及び400ppmの用量で実施した4週間反復経口投与予備毒性試験の結果、400ppmで死亡がみられ、100ppm以上で投与初期に用量依存性の摂餌量の減少を伴い体重増加の抑制、200ppm以上で血小板数の軽度増加、400ppmで総蛋白及びグロブリンの増加、100ppm以上で肝細胞肥大を伴い全投与群で肝臓重量の増加、全投与群で甲状腺濾胞細胞肥大を伴い甲状腺重量の増加傾向が認められた。これらの結果から、最高用量を300ppmとし、30、5及び1ppmを設定した。

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。

明らかに投与関連性と考えられる症状は認められなかった。300ppm群の雌で特に尾の痂皮形成と擦過傷の発現率(6/10例)が対照群(2/10例)に比べて高かったが、投与によるものであるとは断定できなかった。

試験期間中、死亡はみられなかった。

体重変化: 毎週1回、全ての動物の体重を測定した。

投与後週	性別/投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	1	5	30	300	1	5	30	300
0~1週			92↓	51↓				61↓
1~12週				113↑				

統計学的方法: Student t-test ↓: p<0.05 ↑: p<0.01 ↓↓: p<0.001

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。

300ppm群雌雄で、体重増加が投与1週目で有意に低下し、雄では、その後の12週間、体重増加が対照群に比べて統計学的に有意に増加した。しかし、体重は雌雄とも試験

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

期間中対照群より低い傾向にあった。30ppm 群雄で体重増加が投与 1 週目で有意に低下したが、その後の体重及び体重増加に対照群との差はみられなかった。

摂餌量及び食餌効率：全動物の摂餌量を週 1 回測定し、食餌効率も算出した。

投与 1 週目に 300ppm 群の雌雄の摂餌量が対照群より低値を示した(対照群に対し雄 74%、雌 86%) が、その後の摂餌量に対照群との差はみられなかった。

食餌効率も投与 1 週目に対照群より低値を示したが、その後対照群との差はみられなかった。

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。

投与量 (ppm)	1ppm		5ppm		30ppm		300ppm	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
摂取量 (mg/kg)	0.07	0.07	0.33	0.37	1.93	2.28	19.87	24.03

神経機能検査：投与 12 週目に、以下の項目について対照群と 300ppm 群を対象にして神経機能検査を行った。

脳神経反射：瞳孔対光反射、共感性対光反射、眼瞼まばたき反射、驚愕反射、その他の脳神経を評価するための頭部の一般的検査

分節反射：屈筋反射(撤去反射)

姿勢反応：踏み直し反応(視覚性及び触覚性)、立ち直り反応、把握反射

一般的観察：行動変化(攻撃的、鎮静)、歩行と姿勢の異常(筋緊張を含む)、振戦あるいは他の運動障害の有無

いずれの動物にも異常所見はみられなかった。

血液学的検査：投与 13 週目の全生存動物(各 10 例)を対象として一晚絶食後、眼球後部静脈叢から採取し、以下の項目の測定を行った。

赤血球数、白血球数、血液塗抹(正赤芽球を含む形態異常及び異常細胞型)血液像[好中球、リンパ球、好酸球、好塩基球、単球及び非染色巨大細胞]、血小板数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、網状赤血球数、プロトロンビン時間

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。

雌において、300ppm 群でヘマトクリット、平均赤血球容積及び平均赤血球血色素量が減少、プロトロンビン時間が短縮し、血小板数が増加した。30ppm 群でもヘマトクリットの減少及びプロトロンビン時間が短縮した。しかしながら、これらの変化は雌にのみ認められる反応であり、またその程度も軽微であることから毒性学的意義はないと考えた。

検査項目	性別/投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	1	5	30	300	1	5	30	300
ヘマトクリット値				96↓	98↓	97↓	98↓	96↓
ヘモグロビン濃度							97↓	96↓
平均赤血球血色素濃度		100↑	100↑					
平均赤血球容積								94↓
平均赤血球血色素量		106↑						95↓
総白血球数			82↓				75↓	
リンパ数			82↓				75↓	
血小板数			111↑					113↑
プロトロン時間	105↑						96↓	95↓

統計学的手法: Student t-test ↑↓: p<0.05 ↑↓: p<0.01 ↑↓: p<0.001

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。

又、ヘモグロビン濃度は雌のすべての投与群及び雄の 300ppm 群で減少した。ヘモグロビン濃度 (g%) の背景データとの比較を次表に示す。

性別	群 (ppm)	本試験		背景データ ³	
		平均値	範囲 ¹	平均値	範囲 ²
雄	0	15.9	15.5-16.8	15.9	14.6-17.3
	300	15.3	14.0-16.4		
雌	0	15.9	15.1-16.7	15.5	14.0-17.0
	1	15.6	15.3-16.1		
	5	15.5	14.9-16.3		
	30	15.4	14.9-16.1		
	300	15.3	14.7-15.9		

¹ 本試験の範囲は個体別データの最大と最小値

² 背景データの範囲は 95%信頼限界

³ 背景データは 17~18 週齢の雄 499 匹、雌 500 匹の値

300ppm 群雄を除き全ての個体別値は背景データの 95%信頼限界の範囲内にあった。雄では対照群の平均値は背景データと等しく、300ppm 群はこれより低かった。雌では対照群の平均値は背景データよりやや高く、300ppm 群はこれよりわずかに低かったが、その他の投与群は背景データとほとんど差がなかった。これらの点から 300ppm 群は雌雄とも投与に関連のある軽微な影響、30ppm 以下の投与群は雌雄とも投与に関連がないと考えられた。

その他に認められた有意な変化は用量関連性がないことから、投与に関連性がないと判断された。

血液生化学的検査: 血液学的検査で使用した血液と同時に採取した血液から得られた血漿を用いて、以下の項目の測定を行った。

アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、総蛋白、タンパク分画、グルコース、ビリルビン、尿

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

尿素窒素、クレアチニン、電解質(ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン)

検査項目	性別/投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	1	5	30	300	1	5	30	300
アルカリホスファターゼ						129↑		
アラニンアミノトランスフェラーゼ							80↓	80↓
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ			84↓		80↓	72↓	54↓	65↓
尿素窒素	116↑	120↑	124↑	124↑				
グルコース						112↑	121↑	115↑
総蛋白		104↑	104↑	109↑	108↑	106↑	108↑	110↑
α ₁ グロブリン		115↑	115↑	131↑			118↑	127↑
α ₂ グロブリン				125↑	125↑	100↑	125↑	150↑
βグロブリン				118↑	114↑		121↑	129↑
A/G 比				75↓				82↓
ナトリウム					98↓	99↓	99↓	
塩素		101↑			98↓		98↓	
カルシウム			104↑	104↑				

統計学的手法: Student t-test ↑: p<0.05 ↓: p<0.01 ↑↓: p<0.001

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。

300ppm 群雌雄の総蛋白が対照群に比べて高値を示した。これは対照群に比べてグロブリンが高値を示し、A/G 比が対照群に比べて低下したためであった。さらに、雄では尿素窒素、雌ではグルコースの増加が認められ、肝臓重量の増加を伴う肝細胞脂肪性空胞化が認められ、肝機能の変化を示唆している。5.及び 30ppm 群でも 300ppm 群と同様の増加が認められた。しかし、A/G 比に変化はなく、肝臓重量の増加はより少なく、組織学的に対照群と差がなかったことから、5.及び 30ppm 群の変化は適応性の変化と考えられる。1ppm 群雌でも、総蛋白と α₂及び β-グロブリン濃度が対照群に比べて軽微な高値を示したが、用量依存性がなく、毒性学的に意義はないと考えられた。尿素窒素は、雄 1 ppm 以上で有意な増加が認められたが、いずれも背景データ範囲内(下表参照)であり、腎機能障害を疑う所見が他に認められなかったことから、毒性学的な意義はないものとする。

尿素窒素の背景データ

データ	対照群	投与量 (ppm)				背景データ
		1	5	30	300	
抄録記載値		116	120	124	124	
実測値	25	29	30	31	31	20-36

アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性の低下がみられたが、低下であるので毒性学的意義はないと考えられた。30 および 300ppm 群のカルシウムの増加はごく軽微な変化(対照群は 2.5~2.7mM/L に対し、両群は各 2 例が対照群の上限を超え 2.8mM/L であった)であり、毒性学的に意義は

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

ないと考えられる。その他に認められた有意な変化は用量関連性がないことから、投与に関連性がないと判断された。

尿検査：血液学的検査と同時期に採取した一夜尿について、以下の項目を検査した。

外観、尿量、pH、比重、蛋白、総還元物質、グルコース、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン、潜血、沈渣、

いずれの検査項目においても投与関連性の変化は認められなかった。

眼科学的検査：投与開始前は全動物、投与 13 週時は対照群及び 300ppm 群の全生存動物を対象として検査した。

検体投与に関連のある異常は認められなかった。

臓器重量：試験終了時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。

肝臓、腎臓、副腎、肺及び気管支、脾臓、心臓、脳、甲状腺及び上皮小体、精巣、前立腺、卵巣、子宮及び頸部、胸腺、下垂体、唾液腺(下顎)

下表に対照群と比べて統計学的に有意差の認められた項目を示す。

臓器重量		性別/投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		1	5	30	300	1	5	30	300
甲状腺	重量			125	200↑			121↑	168↑
	対体重比			123	225↑			116	183↑
肝臓	重量			114	142↑		118↑	124↑	154↑
	対体重比			113↑	143↑		110	117↑	158↑
唾液腺	重量					90	93	99	85↓
	対体重比					84↓	86↓	92	87↓

統計学的手法：甲状腺は Behren-Fisher test、肝臓/唾液腺は Dunnett t-test

↑↓: 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。

甲状腺及び肝臓の重量及び対体重比は 300ppm 群雌雄で有意な高値を示した。同様の傾向が 30ppm 群雌雄でも認められた。5ppm 群の雌でも肝重量が高い傾向にあった。

投与群雌の唾液腺の重量及び対体重比が有意に低下ないし低下傾向を示したが、用量依存性もなく、病理組織学的変化も認められないので毒性学的意義はないと考えられた。

肉眼的病理検査：投与終了時の全生存動物について剖検を行った。

300ppm 群雌の尾に痂皮形成が 5/10 例 (p<0.05 で有意; 対照群は 0/10 例) に認められたが、投与に起因するとは考えられなかった。その他の肉眼的変化も投与に起因する変化はなかった。

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

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、さらに肝臓はオイルレッドO染色、大腿骨骨髓の塗抹標本はメイ-グリーンワルド-ギムザ染色して病理標本を作成した。検鏡は対照群及び300ppm群の全動物、並びに1、5及び30ppm群の全動物の甲状腺、上皮小体、腎臓、肝臓、肺及び肉眼的病変部について行った。

乳腺(尾側)、リンパ節(下顎、腸間膜)、大動脈、唾液腺(左)、骨(大腿骨)、骨髓(大腿骨)、胸骨及び骨髓、胸腺、気管、肺(主気管支を含む)、心臓、甲状腺、上皮小体、食道、胃、小腸(十二指腸、空腸、回腸)、大腸(盲腸、結腸、直腸)、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精囊、前立腺、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、膣、脳、下垂体、坐骨神経(左)、骨格筋(大腿)、脊髄、眼球(視神経を含む；左)、皮膚、全ての肉眼的病変部

認められた主要な病変を次表に示す。

各群雌雄各10例中の病変の発生頻度

臓器/所見		性別/投与量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	1	5	30	300	0	1	5	30	300
甲状腺	濾胞上皮肥大	3	1	0	5	8	1	0	0	0	10↑
	濾胞細胞過形成	2	0	0	1	6	1	0	1	1	2
肝臓	汎小葉性脂肪性空胞化 (HE染色)	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
	汎小葉性肝細胞脂肪性空胞化 (脂肪染色)	0	2	0	1	7↑	0	0	0	0	1
	小葉中心性肝細胞脂肪性空胞化 (脂肪染色)	4	3	2	6	3	7	9	6	10	7

統計学的手法：Fisherの直接確立検定法(両側) ↑：p<0.001

300ppm群雌雄で甲状腺濾胞上皮肥大の増加がみられた。又、これらの雄動物で甲状腺濾胞細胞過形成の増加もみられたが、統計学的有意差は認められなかった。

肝臓のヘマトキシリン・エオジン染色では汎小葉性脂肪性空胞化の発生頻度は低く対照群との差はみられなかったが、オイルレッドO染色では対照群を含む全群で脂肪が観察される頻度が高かった。300ppm群雄では対照群に比べて汎小葉性的変化が有意に高く、広範に分布していた。これに対し、対照群では小葉中心性の分布を示した。雌では投与群と対照群で本質的な差はなかった。

以上の結果から、本剤のラットに対する13週間飼料混入投与による亜急性毒性試験における影響として、300ppm群の雌雄では投与1週目に体重増加の抑制及びその後の体重の低下傾向、摂餌量および食餌効率の低下、血液生化学的検査項目の変動(総蛋白の増加、グロブリンの増加、A/G比の低下)、甲状腺及び肝臓重量の増加、甲状腺の濾胞上皮肥大が認められた。さらに、雄では甲状腺濾胞細胞過形成、汎小葉性肝細胞脂肪性空胞化の増加が、雌では赤血球検査項目の軽微な変動(ヘマトクリット、平均赤血球容積及び平均

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

赤血球色素量の減少、プロトロンビン時間の短縮、血小板数の増加)、グルコースの増加が認められた。

30ppm 群の雌雄で血液生化学的検査項目の変動(総蛋白の増加、グロブリンの増加)、甲状腺及び肝臓重量の増加ないし増加傾向が認められ、さらに雄では投与 1 週目に体重増加の抑制、尿素窒素の増加、雌では赤血球検査項目の軽微な変動(ヘマトクリットの減少及びプロトロンビン時間の短縮)、グルコースの増加が認められた。

5ppm 雌雄で血液生化学的検査項目の変動(総蛋白の増加、グロブリンの増加が認められ、さらに、雄では尿素窒素、雌ではグルコースの増加、肝臓重量の増加傾向が認められた。

30ppm 以下の投与群の血液生化学的変化は一般に用量関連も明瞭でなく、軽微で病理組織学的変化を伴っていないので、生体異物に対する適応反応と判断される。

従って、無作用量 (NOEL) は 1ppm(雌雄共 0.07mg/kg/日)、無毒性量 (NOAEL) は 30ppm(雄 1.39 mg/kg/日、雌 2.28 mg/kg/日)と判断される。

申請者注 1 (無毒性量について) :

報告書の結論では無作用量 (NOEL) を 1ppm(雌雄)としたのみであるが、5ppm でみられた血液生化学的変動が軽微であり、病理組織学的変化を伴っていないことからドイツ BASF 社は 5ppm における変化を生体異物に対する適応反応と判断し、この用量を無毒性量 (NOAEL) とした。1997 年 JMPR の評価においても 5ppm を無毒性量としている。

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、雌雄 300 ppm 群で投与 1 週に認められた体重増加量の抑制であった。30 ppm でも同じく投与 1 週に雄のみで体重増加量の抑制が認められたが、軽微であり、単回経口投与等によって生じるとは考えられなかった。従って無毒性量は雌雄ともに 30 ppm (雄 1.93 mg/kg、雌 2.28 mg/kg) であると判断した。

(2) イヌを用いた 13 日間経口(カプセル)投与及び 28 日間回復毒性試験

(資料 15)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:

検体純度:

試験動物: 純系ビーグル犬雌、26 週齢、体重: 7.85~9.15kg、対照群 1 頭、投与群 4 頭

試験期間: 13 日間投与及び 28 日間回復(2 月 8 日~ 6 月 18 日)

投与方法: 検体を用量 0 及び 20 mg/kg/日でゼラチンカプセルに充填して反復経口投与し、神経毒性が認められるまで投与した。症状が投与開始 5 日、7 日または 13 日に発現した(次表に動物番号と投与期間を示す)ので、翌日から投与を中止し、続けて 28 日間の休薬期間を設けた。対照群には投与群の動物の投与を中止するまで空のカプセルを投与した。

群	動物番号	投与期間
対照	3977	13 日
20mg/kg	3979	13 日
	3981	5 日
	3983	5 日
	3985	7 日

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。

死亡は認められなかった。

神経毒性症状は全ての投与動物で異常歩行、振戦、四肢あるいは体幹の硬直、痙攣、點頭、顔面皺縮等が認められた。視覚の欠如が 1 例(動物番号 3981; 試験 5 日間投与)で認められた。これらの症状は投与中止後、2~10 日間続いた。

活動低下も認められ、投与中止後、10 日間続いた。

体重変化: 馴化期間中は毎週 1 回、投与及び休薬期間中は毎週 2 回、全ての動物の体重を給餌前に測定した。

体重の減少が試験 3 日までに全動物で認められ、投与中止後 17 日までにもとの体重に復した。

摂餌量: 全動物の摂餌量(毎日 400g 給餌)は毎日飼料残量を測定して算出した。

試験期間中の週別摂餌量(g/週)を次表に示す。

群	動物番号	試験週						
		-1	1	2	3	4	5	6
対照	3977	2800	2800	2800	2800	2800	2800	2400a
20mg/kg	3979	2800	1415	300	2240	2685	2210	2125a
	3981	2800	715	1295	2800	2800	2400a	
	3983	2185	560	2800	2800	2800	1950a	
	3985	2215	635	2495	2800	2800	2725	

a: 6日間のデータである。

顕著な食欲不振が投与初日から認められ、イヌ 3979(試験 13 日まで投与)は試験 2~16 日まで、イヌ 3981(試験 5 日まで投与)は試験 2~13 日まで、イヌ 3983(試験 5 日まで投与)は試験初日~7 日まで、イヌ 3985(試験 7 日まで投与)は試験初日~10 日まで、摂餌量の低下が認められた。投与中止後 8 日までに摂餌量はもとに復した。

獣医学的検査: 投与開始前、試験 2 週及び回復期間終了前(試験 5 週)に、以下の項目について検査した。

歯及び歯肉、粘膜及び皮膚、耳及び眼、表在性リンパ節、腹部(触診を含む)、外生殖器及び乳腺、胸部(心臓及び肺の聴診を含む)、歩行及び姿勢(肢の触診を含む)、一般行動及び外観

試験 1 週後の検査で 3/4 例に消瘦が認められた。その他に各 1 例に異常歩行、行動の変化、円背位、末梢血管拡張及び顔面皷縮等が認められたが、試験 5 週(回復 19~27 日)の検査では神経毒性症状も、不健康な症状も認められなかった。

神経機能検査: 投与前週に 3 回、試験期間中毎週 3 回、以下の神経機能検査を行った。

脳神経反射: 瞳孔対光反射、共感性対光反射、眼瞼まばたき及び角膜反射、催吐反射、
その他の脳神経を評価するための頭部の一般的検査

分節反射: 交差性伸筋反射を含む屈筋反射(撤去反射)、膝蓋腱反射、伸筋緊張反射

姿勢反応: 踏み直し反応(視覚性及び触覚性)、姿勢性突伸反応、立ち直り反応、緊張性頸反応、跳び直り反応

一般的観察: 行動変化(攻撃的、鎮静)、歩行と姿勢の異常、振戦あるいは他の運動障害の有無

障害回避検査: 水平及び垂直障害回避

聴覚検査: 頭部方向反応(音源の方向を向く)、視覚反応(音で瞬き、音源の方向に眼を向ける)、聴覚反応(音に対する耳介の運動)、これらで、反応がなければさらに聴覚性驚愕反応検査等を行う。

神経反応のタイプ、発現頻度及び時期には顕著な変動があったが、多くの異常が観察され、回復期間中の回復は緩やかであった。症状として、瞬き反射、踏み直し反応(視覚性及び触覚性)、瞳孔対光反射、共感性対光反射、姿勢性突伸反応、緊張性頸反応、後肢跳び直り反応の抑制が、姿勢及び歩行の異常と共に認められた。また、過剰屈筋、嘔吐、角膜反応、點頭等も認められた。

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

障害回避検査で、回復期間の 4~9 日の間に 1 例(動物番号 3981)で、一時的な視覚障害が疑われた。

聴覚検査で、試験期間中投与による明確な影響は認められなかったが、対照群より反応が一般的に遅かった。

肉眼的病理検査；回復期間の終了時に、動物を灌流固定し、末梢神経、脳、脊髄を肉眼的に検査した。

検体投与に関連があると考えられる肉眼的所見はみられなかった。

病理組織学的検査；灌流固定した動物を対象として、下記の臓器/組織を摘出し、パラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオジンで染色して組織標本を作製し、神経病理学的検査を行った。なお、脳は各レベルで 2 切片、脊髄は背根神経節及び腹根神経線維を含む縦断切片を作成した。

脳(前脳、小脳及び延髄)、脊髄(頸部、胸部及び腰部膨大部)、坐骨神経(近位及び遠位)、脛骨神経(近位及び遠位)

検体投与に関連があると考えられる組織学的所見はみられなかった。

以上の結果から、本剤の 20mg/kg/日を雌犬に神経症状が認められるまで投与し、認められた翌日から投与を中止し、28 日間その回復性について検討した。投与開始 5 ないし 13 日後に明確な神経毒性の機能障害が認められたが、投与中止後 12 日までに完全に回復した。神経毒性症状に関連のある病理組織学的変化は認められなかった。

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と無毒性量について)：

20 mg/kg の雌雄で種々の神経症状(歩行異常、振戦、硬直、痙攣など)、体重減少、摂餌量低下および削痕(投与 1 週)が認められた。従って無毒性量は、雌雄ともに 20 mg/kg 以下と判断された。

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

(3) イヌを用いた 13 週間経口 (カプセル) 投与毒性試験

(資料 16)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:

検体純度:

試験動物: 純系ビーグル犬、19~23 週齢、体重: 雄 8.0~9.8kg; 雌 7.3~9.5kg、
1 群雌雄各 4 頭

試験期間: 13 週間(2 月 5 日 ~ 5 月 11 日)

投与方法: 検体を用量 0.5、2.0、10.0 mg/kg/日 でゼラチンカプセルに充填して 13 週間経口投与した。対照群に空のカプセルを投与した。

投与量設定根拠: 同研究所で同系統の動物を用い、用量 1、10、20 mg/kg/日 でゼラチンカプセルに充填して 4 週間経口投与 (対照群及び 10 mg/kg 群では 6 週間) した予備毒性試験の結果、20mg/kg 群で、活動低下、點頭、顔面痙攣、前肢機能異常、過剰屈筋反射等の神経症状、体重増加の顕著な抑制、総蛋白及びアルブミンの増加が認められた。10mg/kg 群では點頭、前肢を広げた症状が認められた。1 mg/kg 群では投与に関連する影響はみられなかった。この結果から、本試験の用量を 0、0.5、2.0 及び 10mg/kg/日 とした。

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: 10.0 mg/kg 群の雌で食欲不振、削瘦、活動低下及び円背位等の一般的な毒性を示唆する症状が、投与開始後最初の 2~3 週に著明であった。その後、生存雄では回復がみられたが、生存雌では食欲不振が持続した。又、神経症状として雄で 1 頭が 1 週に振戦、他の 1 頭が 2 週に痙攣、3 及び 7 週に點頭を、生存雌 1 例で 6 週に振戦、點頭を示した。

2.0 mg/kg 群では、雌で投与開始後最初の 1~4 週に食欲不振が 1~2 頭に認められたのみであった。

2.0 mg/kg 群の雄及び 0.5 mg/kg 群の雌雄には投与に関連した症状は認められなかった。

切迫殺: 10.0 mg/kg 群で、投与 1~2 週目に雄 1 頭と雌 3 頭が食欲不振、体重減少及び削瘦を示し、又雄では軽度脱水と体温低下も認められた。雌ではさらに、屠殺前に、痙攣、行動鎮静、過剰流涎、後肢伸展、見当識障害、運動失調、視野障害、心拍不規則等が認められたので、雄は投与 10 日、雌は投与 8~12 日に切迫屠殺した。

これら動物から屠殺前に採血して臨床検査を行った結果を次表に示す。

10.0 mg/kg投与群の切迫殺例(雄1例、雌3例の平均)の血液学的検査

採血時期		Ht	Hg	RBC	WBC	PLT	PT	PTTK
雄	投与前(0日)	38	13.3	5.96	12.1	392	7.0	15.2
	死亡直前	44	14.6	6.79	9.0	449	6.5	13.4
雌	投与前(0日)	35.3	12.9	5.54	16.0	285.7	7.1	14.5
	死亡直前	46.3	15.7	6.97	15.6	317.3	6.6	12.2

ヘマトクリット値(Ht)、ヘモグロビン濃度(Hg)及び赤血球数(RBC)の上昇とプロトロンビン時間(PT)及び活性化部分トロンボプラスチン時間(PTTK)の短縮が認められたが、健康状態が悪化したことによる多少の血液濃縮によるものと考えられた。

体重変化：毎週1回、全ての動物の体重を給餌前に測定した。

10.0 mg/kg群の雄2頭と雌3頭で投与1週に体重が減少した。これらのうち雄1頭と雌3頭は体重がさらに減少したため、投与2週に切迫屠殺した。残りの雄1頭は3週まで体重が減少し続けたが、4週から体重が増加して以後回復した。他の雄2頭では、投与1週の体重増加が停滞したが、その後体重は順調に増加した。残りの雌1頭の体重も順調に増加した。

2.0 mg/kg群の雌2頭で投与2週に一過性の体重減少あるいは体重増加の停滞が認められた。

しかし、生存例の体重及び体重増加を全般的に見たとき(次表)、いずれの投与群も対照群と差がないと考えられた。

検査時期	性別/投与量(mg/kg)					
	雄			雌		
	0.5	2.0	10.0	0.5	2.0	10.0
体重	104	104	100	104	95	95
体重増加	113	108	104	96	83	108

統計学的解析は実施していない

動物数は10mg/kg群の雄は3例、雌は1例、その他の群は4例の平均値

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

摂餌量：全動物の摂餌量は毎日飼料残量を測定して算出した。

試験期間中の総摂餌量の対照群に対する比率%を次表に示す。

検査時期	性別/投与量(mg/kg)					
	雄			雌		
	0.5	2.0	10.0	0.5	2.0	10.0
1~13週	101	101	91	103	97	95

統計学的解析は実施していない

10.0 mg/kg群において、雄1頭は摂餌量が他の動物より少なかったが、投与開始前後でほとんど差がみられなかった。他の雄1頭及び雌3頭は食欲不振が投与開始後1日目から顕著で、雄は投与10日、雌は投与8~12日に切迫屠殺した。残りの雄2頭及び雌1頭の食欲不振を改善するために、基礎飼料を湿らせたり、肉を添加した

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

ところ、生存雄では摂餌量が徐々に改善し、3~5 週までに正常な摂餌量に回復した。生存雌 1 頭は、さらに 5 及び 6 週に摂餌量が一過性に減少した。総摂餌量は対照群より少なく雄で 91%、雌で 95%であった。

2.0 mg/kg群の雌では 2 頭(1 頭は投与 2 週、他の 1 頭は最初の 2 週間、8~9 週及び 12 週)で摂餌量が軽度減少した。

0.5 mg/kg群では、投与による影響はみられなかった。

獣医学的検査：投与開始前並びに投与 3、7 及び 11 週後に、以下の項目について検査した。

歯及び歯肉、粘膜及び皮膚、耳(外耳道)、表在性リンパ節、腹部(触診を含む)、外性器及び乳腺、胸部(心臓及び肺の聴診を含む)、歩行及び姿勢(肢の触診を含む)、一般行動及び外観

10.0 mg/kg群の雄 1 頭で、投与 3 週後に消瘦と散発性全身筋攣縮が観察された。これ以外に意義のある所見はなかった。

神経機能検査：投与前に 1 回、投与 6 及び 12 週後に以下の神経機能検査を行った。

脳神経反射：瞳孔対光反射、共感性対光反射、眼瞼まばたき及び角膜反射、催吐反射、その他の脳神経を評価するための頭部の一般的検査

分節反射：交差性伸筋反射を含む屈筋反射(撤去反射)、膝蓋腱反射、伸筋緊張反射

姿勢反応：踏み直し反応(視覚性及び触覚性)、姿勢性突伸反応、立ち直り反応、緊張性頸反応、跳び直り反応

一般的観察：行動変化(攻撃的、鎮静)、歩行と姿勢の異常(筋緊張を含む)、振戦あるいは他の運動障害の有無

10.0 mg/kg群において、雄 1 頭で、投与 6 週後に點頭、顔面攣縮及びまばたき反射と催吐反射過剰が認められた。又、雌 1 頭で投与 12 週後に触覚性踏み直し反応の低下が観察された。

2.0 及び 0.5 mg/kg群では、投与による影響はみられなかった。

血液学的検査：投与前、投与 6 及び 12 週後に、一晚絶食した動物の頸静脈から採取した血液を用いて、以下の項目の測定を行った。

ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、赤血球数、網状赤血球数、総白血球数、白血球像(好中球、リンパ球、好酸球、好塩基球、単球、非染色巨大細胞)、血液塗抹、血小板数、平均赤血球血色素量、平均赤血球容積、平均赤血球血色素濃度、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間

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。

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

6週後に、表のような変動が0.5mg/kg群でみられたが、一時的であり、用量関連性もないので、投与に起因する影響とは考えられない。

申請者注) 12週後に10.0mg/kg群でリンパ球の増加がみられたが、この群の動物は投与前も対照群と比較し、139%と有意(p<0.05)に高く、成長に伴い対照群と同様の傾向でリンパ球数は減少(投与前値の70~80%)していることから、毒性学的意義はなく、投与に起因する影響とは考えられない。

検査時期	検査項目	性別/投与量(mg/kg)					
		雄			雌		
		0.5	2.0	10.0	0.5	2.0	10.0
6週後	ヘマトクリット	91↓					
	ヘモグロビン	90↓					
	赤血球数	88↓					
12週後	リンパ球			128↑ (139↑)			

統計学的方法: Student t-test ↑↓: p<0.05 ↓: p<0.01 括弧内の数値は投与前の値。
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。

血液生化学的検査: 血液学的検査で使用した血液と同時に採取した血液から得られた血漿を用いて、以下の項目の測定を行った。

アルカリホスファターゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、クレアチンホスホキナーゼ、尿素、クレアチニン、グルコース、総ビリルビン、総コレステロール、総蛋白、タンパク画分、ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン

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	検査項目	性別/投与量(mg/kg)					
		雄			雌		
		0.5	2.0	10.0	0.5	2.0	10.0
6週後	アルカリホスファターゼ			124↑			
	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ			133↑			
	尿素					121↑	
	グルコース	92↓					
	総ビリルビン		50↓				
	総コレステロール			75↓			
	アルブミン	83↓					
	α ₁ -グロブリン				75↓		
	α ₂ -グロブリン	133↑					
	β-グロブリン	133↑					109↓
	A/G比	67↓					86↓
	ナトリウム	101↑	101↑	101↑	101↑	101↑	101↑
	カリウム						
塩素	103↑	104↑					
カルシウム		104↑					
12週後	アルカリホスファターゼ			143↑			
	クレアチニン	89↓					
	ナトリウム		97↓				
	塩素	91↓					

統計学的方法: Student t-test ↑↓: p<0.05 ↑↓: p<0.01 ↑: p<0.001
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。

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

10.0 mg/kg群において、雄では投与 6 及び 12 週後にアルカリホスファターゼ及び 6 週後にアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性の亢進、6 週後にコレステロール濃度の低下が認められたが、これらの変化に関連する臓器組織における病理組織学的変化が認められないことから、毒性学的意義は疑わしい。コレステロール濃度の低下は投与初期の摂餌量の減少による栄養状態を反映したものと考えられ、摂餌量が回復した 12 週後には有意差は認められなかった。生存した 1 頭の雌には対照群との差はみられなかった。

2.0 及び 0.5mg/kg 群で表のような有意な変化がみられたが、用量関連性がなく、検査時期の点でも一貫性もないので検体投与の影響とは考えられなかった。

尿検査：投与前、投与 5 及び 11 週後に採取した一夜尿について、以下の項目を検査した。

外観、尿量、pH、比重、タンパク、総還元物質、グルコース、ケトン、ビリルビン、ウロビリノーゲン、亜硝酸塩、潜血、沈渣

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	検査項目	性別/投与量 (mg/kg)					
		雄			雌		
		0.5	2.0	10.0	0.5	2.0	10.0
11 週後	尿量 比重		59↓ 101↑	78 101↑			

統計学的方法： Student t-test ↑↓： p<0.05 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。

2.0mg/kg 群雄で尿量の有意な低下が認められたが、雌雄及び用量の間に一貫性のある傾向が認められないので、検体投与の影響とは考えられなかった。又、2 及び 10mg/kg 群における比重の高値は尿量の減少による尿濃縮の影響と考えられ、検体の投与に関連がないと考えられた。

眼科学的検査：投与前は全動物、投与 6 及び 12 週後は全生存動物を対象として検査した。

検体投与に関連のある所見は認められなかった。

臓器重量：試験終了時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。

肝臓、腎臓、肺、副腎、下垂体、脳、心臓、脾臓、胸腺、甲状腺及び上皮小体、精巣、前立腺及び尿道、卵巣、子宮

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。

投与量 mg/kg/日		雄			雌		
		0.5	2.0	10.0	0.5	2.0	10.0
脳	対体重比				86↓		
精巣	対体重比	88↓					

統計学的方法： Dunnett-test ↑↓： 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。

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

生存例の臓器重量に検体投与に関連のある変化は認められなかった。

又、切迫殺例の臓器重量にも検体投与に関連のある変化は認められなかった。

肉眼的病理検査；投与終了時の全生存動物及び途中死亡動物について剖検を行った。

切迫殺動物では削瘦が観察されたのみで、臓器組織に特記すべき異常は認められなかった。

投与終了時に屠殺した動物にも、特記すべき異常は認められなかった。

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・エオジン染色して病理標本を作成し、検鏡した。

乳腺、リンパ節(気管支、腸間膜、下顎)、大動脈、唾液腺(左顎下腺)、大腿骨、胸骨及び骨髄、胸腺、気管、肺、心臓、甲状腺、上皮小体、食道、胃、小腸(十二指腸、空腸、回腸)、大腸(盲腸、結腸、直腸)、肝臓、胆嚢、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、前立腺及び尿道、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、陰、脳、下垂体、坐骨神経(左)、骨格筋(大腿)、脊髄、眼球(視神経を含む)、皮膚、全ての肉眼的病変部

検体投与関連性と考えられた所見は 10.0 mg/kg 群の切迫殺動物における雄 1 頭で腸間膜リンパ節の濾胞及び傍濾胞萎縮、並びに胸腺皮質萎縮、雌 1 頭で胸腺皮質萎縮がみられたのみであった。これらの変化は投与による直接的变化というよりストレスによる可能性が高い。

投与終了後の生存例には検体の投与に起因する変化は認められなかった。

以上の結果から、本剤の犬に対する 13 週間カプセル投与による亜急性毒性試験における影響として、10.0 mg/kg 群では投与に起因する食欲不振、摂餌量の減少、体重減少、削瘦、活動低下及び円背位等の一般的な毒性を示唆する症状が投与初期に著明で、投与 8~12 日に雄 1 頭及び雌 3 頭を切迫殺した。生存雌雄各 1 例で神経症状(雄：痙攣、點頭、顔面撃縮、並びにまばたき反射及び催吐反射過剰、雌：振戦及び触覚性踏み直し反応の低下)が認められた。雄では食欲不振に起因する栄養状態を反映したと考えられるコレステロール濃度の低下が認められた。

2.0 mg/kg 群では、雌 2 頭で一過性の食欲不振を伴い摂餌量の減少及び体重増加抑制が認められたのみであった。

以上より、ビーグル犬に対する無毒性量(NOEL)は、雄は 2.0 mg/kg/日、雌は 0.5 mg/kg/日と判断した。

申請者注 1 (無毒性量について)：

報告書では雌雄あわせての無毒性量を 0.5 mg/kg/日としているが、雄の 2.0 mg/kg/日群では検体由来の毒性影響がみられないことから、雌雄別では雄の無毒性量を 2.0 mg/kg/日とした。

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)：

2.0 mg/kg の雌で投与 1~4 週に一般症状としての食欲不振と摂餌量低下が認められたが、2/4 例と個体数も少なく軽微であり、体重や体重増加量の変化も伴わないことから、毒性学的のない変化と考えられた。2.0 mg/kg では雄でも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。最高用量である 10 mg/kg では、雌雄で投与 1 週に食欲不振、削瘦、活動低下、雄では加えて流涎、振戦が認められた。従って無毒性量は、雌雄ともに 2.0 mg/kg と判断された。

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

1-7. ウサギを用いた 21 日間反復経皮毒性試験

(資料 17)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:

検体の純度:

試験動物: ニュージーランド白色系ウサギ、1 群雌雄各 6 匹、開始時雄 19、雌 20 週齢、
体重: 雄 3.04~3.62kg、雌 3.06~3.81kg

試験期間: 21 日間(11 月 9 日~ 12 月 1 日)

投与方法: 検体を 0.5%CMC 水溶液に溶解して、0、0.5、1.0、5.0 及び 10.0mg/kg/日を容量 1.0 mL/kg で刈毛した動物の背部皮膚に均一に直接塗布し、6 時間閉塞貼付した。被覆除去後、処置部位は湿らせた布で拭いた。この処置は毎週連続 5 日間、3 週間継続した。投与液は週 1 回調製した。

投与量設定根拠: 同研究所で同系統の動物を用いて行った急性経皮毒性試験において、LD50 は雄 445mg/kg、雌 354mg/kg で、中毒症状として、250mg/kg 以上では痙攣、振戦、下痢、削瘦等が認められた。さらに、投与後 3~13 日の間に生死に係らず 1 日に数回、比較的短期間(1~2 分間)の遅発性痙攣が認められた。この結果から、最高用量として、10mg/kg を選定した。

観察・検査項目及び結果:

一般状態及び死亡率: 処置部位の刺激性の変化を含め一般状態及び生死を毎日観察した。

死亡は認められなかった。[文書の重要な部分を引用して読者の注意を引いたり、このスペースを使って注目ポイントを強調したりしましょう。このテキスト ボックスは、ドラッグしてページ上の好きな場所に配置できます。]

処置部位の皮膚に刺激性の変化は認められなかった。

試験終了近くで自発運動の亢進が 10.0mg/kg 群雌雄各 1 例に認められた。この症状は急性経皮毒性試験(資料 4)でも観察されていることから投与による影響の可能性がある。

体重変化: 毎週 1 回、全ての動物の体重を測定した。

体重及び体重の変化を次表に示す。

	投与後 期間	用量群 (mg/kg)							
		雄				雌			
		0.5	1.0	5.0	10.0	0.5	1.0	5.0	10.0
体重	2 週				96				
	3 週				93↓				98
体重増加	1~3 週				-21↓				49

統計学的方法: t-test による対比較検定 ↓: 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。

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

10.0mg/kg 群の雄は体重の減少が 3/5 例に認められ、体重は試験終了時に有意に抑制された。試験期間中の平均体重増加(47g 減少)は対照群(225g 増加)より有意に減少した。同群雌の平均体重に対照群との差は認められなかったが、平均体重増加は対照群に比し 49%であった。

摂餌量及び食餌効率；全動物の摂餌量を 1 日おきに測定した。

次表のとおり 10.0mg/kg 群の雌雄共対照群に比し摂餌量の減少がみられたが、雄の 3 週のみ有意であった。1.0mg/kg 群の雌で有意に増加がみられたが、用量関連性がないので投与に関連がないと考えられた。

投与後 期間	用量群 (mg/kg)							
	雄				雌			
	0.5	1.0	5.0	10.0	0.5	1.0	5.0	10.0
2 週				83		122 [†]		92
3 週				56 [↓]				79

統計学的方法：t-検定 [†]；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。

血液学的検査；約 24 時間絶食後の最終屠殺前に耳介動脈から採血し、以下の項目の測定を行った。

赤血球数、白血球数、血液像、血小板数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均赤血球血色素量、平均赤血球容積、平均赤血球血色素濃度

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。

検査項目	用量群 (mg/kg)							
	雄				雌			
	0.5	1.0	5.0	10.0	0.5	1.0	5.0	10.0
平均赤血球血色素濃度							99 [†]	102 [†]

統計学的手法：t 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。

表のように平均赤血球血色素濃度のみ有意な変化がみられたが、5.0 と 10.0mg/kg 群で変動に一定の傾向がないこと、また関連する検査項目に差がみられないことから検体投与に起因する変化ではないと考えられた。

血液生化学的検査；血液学的検査用の血液と同時に採血した血液を用いて、以下の項目の測定を行った。

アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT/GPT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST/GOT)、γ-グルタミルトランスフェラーゼ(γ-GGT)、アルカリホスファターゼ(AIP)、クレアチンキナーゼ(CK)、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)、ソルビトールデヒドロゲナーゼ(SDH)、総蛋白、アルブミン、グロブリン、A/G 比、グルコース、ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、電解質(ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン)

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

次表のように 5.0mg/kg 群の雌でアルブミンの有意な増加のみ認められたが、用量関連性がなく、検体投与に起因する変化ではないと考えられた。

検査項目	用量群 (mg/kg)							
	雄				雌			
	0.5	1.0	5.0	10.0	0.5	1.0	5.0	10.0
アルブミン							107↑	

統計学的手法：t 検定：↑；p<0.05

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

臓器重量：試験終了時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。

肝臓、腎臓、副腎、精巣、卵巣

下表に対照群と比べて統計学的に有意差の認められた項目を示す。

検査項目	用量群 (mg/kg)							
	雄				雌			
	0.5	1.0	5.0	10.0	0.5	1.0	5.0	10.0
副腎 重量	133↑	128↑						
対体重比	133↑	133↑						

統計学的手法：t 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。

表のように副腎重量の有意な変化がみられたが、用量関連性もなく検体投与に起因する変化ではないと考えられた。

肉眼的病理検査：投与終了時の全生存動物について剖検を行った。

検体投与に起因する特記すべき変化は認められなかった。

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・エオジン染色して病理標本を作成し、対照群と高用量群について検鏡した。

肝臓、腎臓、皮膚(無処置部位及び処置部位)、全ての肉眼的病変部

次表のように 10.0mg/kg 群の雌でのみ臆に出血が認められたが、検体投与に起因する変化ではないと考えられた。

検査項目	用量群 (mg/kg)										
	雄					雌					
	0	0.5	1.0	5.0	10.0	0	0.5	1.0	5.0	10.0	
臆	検査動物数						4	0	0	0	5
	出血						0				4

以上の結果から、本剤のウサギに対する 21 日間反復経皮投与毒性試験における影響として、10.0mg/kg 群雌雄で摂餌量の減少を伴い、体重あるいは体重増加の抑制または減少が認められた。10.0mg/kg 群雌雄各 1 例で自発運動の亢進が試験終了近くで認められたが、急性経皮毒性試験でも観察されていることから投与による影響の可能性がある。その他の検査で検体投与に起因する変化は認められなかったことから、無毒性量は雌雄とも 5.0mg/kg/日と判断される。

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

1-8 90 日間反復吸入毒性試験

試験成績提出の除外

急性吸入毒性及び他投与経路による反復投与毒性試験の結果、並びに既知化合物との化学構造上の相関等からみて、90 日間反復吸入投与による新たな知見を得られないと考えられるため試験を省略。

1-9. ラットを用いた 90 日間反復経口投与神経毒性試験 (資料 18)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:

検体純度:

試験目的: イヌ垂急性毒性試験及び慢性毒性試験で神経症状が認められたため、詳細な神経学的試験を試みた。

試験動物: Sprague Dawley 系ラット、8 週齢、体重: 雄 251.2~279.9g、雌 162.6~192.3g、1 群雌雄各 15 匹

投与期間: 投与後 13 週間 (6 月 22 日 ~ 9 月 23 日)

投与方法: 検体を飼料に直接 0、0.5、5.0 及び 150ppm の濃度で混入し、13 週間にわたって随時摂取させた。検体を混入した飼料は毎週調製した。

投与量設定根拠: ラットを用い 0、0.5、1.5、30 および 300ppm の用量で実施された慢性毒性/発がん性併合試験 (資料 21) の結果、300ppm 群で投与 1 週に雄 3 例、雌 2 例が死亡発見され、さらに 3 週および 9 週にも 2 例に死亡がみられた。これらの死亡例の数は死亡前に痙攣の徴候がみられた。30ppm 群では死亡はみられず、1.5ppm 群では検体の影響は明確でなく、0.5ppm 群では影響は全くみられなかった。300ppm 群で死亡がみられたことから、13 週間の試験終了時には毒性徴候が発現するが、顕著な死亡がないと考えられる 150ppm を最高用量とし、明確な無作用量を想定して 0.5ppm、中用量として 5ppm を選定した。

観察・検査項目及び結果:

死亡率: 生死を毎日観察した。

0.5ppm 群の雌 1 例が投与 16 日に死亡し、剖検で両側性腎盂拡張が認められたが、投与との関連性は認められず、死因は腎障害による合併症と考えられた。その他に死亡は認められなかった。

一般状態: 一般状態を毎日観察した。

いずれの用量においても投与に関連した症状は観察されなかった。

体重の変化: 投与開始時及びその後は週 1 回すべての動物の体重を測定した。又、体重は機能検査を行った日及び剖検時にも測定した。

対照群と比べ統計学的に有意差の認められた各測定時期における体重の変化を次表に示す。

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

150ppm 群において、投与 1 ないし 2 週に体重及び体重増加の抑制が、試験 1 週では摂餌量の減少を伴い認められ、検体投与の影響と考えられた。0.5mg/kg 群では投与 5 週まで体重増加がみられた。しかし、投与 4 ないし 6 週以降は、いずれの投与群共に対照群との差が認められなかった。

投与後(週)		性別/用量 (ppm)					
		雄			雌		
		0.5	5.0	150	0.5	5.0	150
体重	1			94↓			
	2	103↑					94.0↓
	3	103↑					
	4~13						
体重増加	1	113↑		38↓			30↓
	2	116↑		83↓			
	3	114↑					
	4	112↑					
	5	114↑	112↑				
	6~13						
	0~13						

統計学的方法: t-test による対比較検定 ↑↓: 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。

摂餌量及び食餌効率: 全動物の摂餌量を週 1 回測定し、食餌効率も算出した。

対照群と比べ統計学的に有意差の認められた各測定時期における摂餌量の変化を次表に示す。

投与後(週)		性別/用量 (ppm)					
		雄			雌		
		0.5	5.0	150	0.5	5.0	150
1			77↓			76↓	
2~5							
6						109↑	
7~11							
12			106.1↑				
13							

統計学的方法: t-test による対比較検定 ↑↓: 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。

150ppm 群雌雄において、投与 1 週の摂餌量の減少が認められ、1 ないし 2 週に体重及び体重増加の抑制を伴っていた。その後、雌雄とも摂餌量の増加が 1 週のみ認められたが、ほとんどの週で対照群との差は認められなかった。

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。

投与量 (ppm)		0.5	5.0	150
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	0.0297	0.3006	8.8922
	雌	0.0354	0.3508	10.7792

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

詳細な状態の観察：各群雌雄各 10 例を対象に、ホームケージ内、オープンフィールドの標準観察台及び取扱い時における詳細な状態(下記)を投与前週、投与 4、9 及び 13 週に観察した。

姿勢(ケージ内)、眼瞼閉鎖、歩行、痙攣、振戦、異常行動、覚醒、脱糞、排尿、立ち上がり、瞳孔径、筋緊張、流涎、被毛の外観、痂皮、接近反応、驚愕反応、痛覚反応、視覚性置き直し、握力(前肢及び後肢)、直腸温、空中立ち直り、後肢着地開脚幅、呼吸状態、立毛、眼球突出、削瘦、流涙、脱水、発声、ハンドリング時の反応性

統計学的有意差のある、あるいは所見の性質から生物学的に意義のあると判断された機能総合検査所見を次表に示す。

性、用量 (ppm)		雄				雌			
		0	0.5	5.0	150	0	0.5	5.0	150
使用動物数		10	10	10	10	10	10	10	10
排尿	投与前	3	3	3	5				
	4 週	5	6	9	10↑				
驚愕反応過剰	4 週	0	0	0	4				
痛覚反応過剰	投与前	3	1	2	1				
	4 週	0	0	0	4				
前肢握力 (kg)	投与前					0.52	0.47	0.50	0.57
	4 週					0.80	0.79	0.96	0.88
	9 週					0.90	0.82	0.89	0.89
	13 週					0.61	0.68	0.70	0.88↑

統計学的方法：Gamma、Kendall's tau-B、Stuart's tau-C、Somers' D 検定

↑: p<0.01

投与 4 週に 150ppm 群雄で、排尿の認められた動物数の増加が観察されたが、自律神経系の変化を伴っておらず、また、他群より投与前週に排尿が観察された動物数も多いことから、生物学的有意性はないと判断した。驚愕反応及び痛覚反応過剰を示した動物数が 4/10 例に認められたが、その他の観察項目に影響がなく、一過性の変化であることから投与に関連がないと判断した。

前肢握力の増加が 150ppm 群雌の投与 13 週に認められたが、この有意差は対照群の低下によるものと考えられ、150ppm 群の値は投与 4 及び 9 週時の検査値と同等であることから、生物学的意義はないと考えられた。

自発運動量：各群雌雄各 15 例を対象として投与前週、投与 4、9 及び 13 週に 10 分間隔で 9 試行(合計 90 分)を行った。歩行活動、立ち上がりおよび微細運動の回数を求めた。

10 分間隔で計数した総自発運動量の経時的な推移、及び 90 分間の累積自発運動量にも検体投与による影響は認められなかった。

肉眼的病理検査：投与終了時に動物番号順に各群雌雄各 10 匹(150ppm 群雌は 11 匹)の生存動物を灌流固定し肉眼的検査を行った。

一般臓器、神経組織に肉眼的変化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

臓器重量；全ての灌流動物の脳を摘出後、脳重量を測定し、体重比を求めた。

脳重量が、150ppm 群の雄でわずかに増加したが、対体重比では変化がなかった。

性、用量 (ppm)	雄				雌			
	0	0.5	5.0	150	0	0.5	5.0	150
使用動物数	10	10	10	10	10	10	10	11
最終体重			107↑	108↑				
脳	重量			105↑				
	対体重比			98				

統計学的方法:t-testによる対比較検定 ↑: p<0.05 ↑↑: p<0.01

病理組織学的検査；下記の臓器/組織を摘出した。対照群及び高用量群について動物番号順に雌雄各6匹を選定し、組織標本を作製して神経病理学的検査を行った。なお、¹は横断切片、²は縦断切片を作成した。(灌流固定しなかった動物は屠殺廃棄した。)

脳¹(前脳、大脳の中央部、中脳の中央部、小脳及び橋、延髄)、脊髓(頸部^{1,2}、胸部¹、腰部¹)、ガッセル神経節²、背根神経節²、背側及び腹側脊髄神経根²、遠位坐骨神経(膝上部)²、腓骨神経・腓腹神経(膝下部)²、脛骨神経(膝下部)²

脳、脊髓、ガッセル神経節、神経根および背根神経節の切片は、パラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオジン、ルクソールファーストブルー/クレシルバイオレット及び Bielschowsky 法で染色した。末梢神経はグリコールメタアクリレート包埋しトルジンプルー及び Bielschowsky 法で染色した。

神経組織に認められた全ての組織学的所見を次表に示す。

所見	性別/用量 (ppm)							
	雄				雌			
	0	0.5	5.0	150	0	0.5	5.0	150
検査動物数	6	-	-	6	6	-	-	6
橋：浮腫(軽度)	0			0	1			0
脊髓 腰部：軸索/髄鞘の腫脹(軽微)	0	-	-	1	0	-	-	1
脊髓 胸部：軸索/髄鞘の腫脹(軽微)	0	-	-	0	0	-	-	2
脛骨神経：神経内膜の線維化(軽微)	1	-	-	2	0	-	-	2
背根神経節：神経細胞の空胞化	0	-	-	0	1	-	-	1
ガッセル神経節：軸索変性		-	-		1	-	-	0
坐骨神経：髄鞘の空胞化	0	-	-	0	0	-	-	2
(軽微)								1
(軽度)								1
腓骨/腓腹神経：神経内膜の線維化	4	-	-	3	2	-	-	3
(軽微)	4			2	2			2
(軽度)	0			1				1

-：検査せず

表のような病変が認められたが、これらは、低頻度であり、自然発生的病変と考えられ、検体投与に関連した変化は認められなかった。

以上の結果から、フィプロニルをラットに0.5、5及び150ppmで13週間飼料混入投与した神経毒性試験における影響として、150ppmで投与初期の1ないし2週間、摂餌量に軽微な減少

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

を伴い体重及び体重増加の抑制が認められた。又、神経系の機能及び組織学的に検体の投与に起因する所見は認められなかった。5ppm では一般毒性にも影響は認められなかった。

従って、神経毒性に対する無毒性量 (NOAEL) は 150ppm (雄 8.8922mg/kg/日 雌 10.7792 mg/kg/日)、一般毒性に対する無毒性量 (NOAEL) は 5.0ppm (雄 0.3006mg/kg/日、雌 0.3508 mg/kg/日) と判断される。

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と無毒性量について) :

150 ppm 群雌雄で投与 1 週に体重及び体重増加の抑制を伴う摂餌量の減少が認められた。5.0 ppm 群では雌雄ともに異常は認められなかった。従って無毒性量は、雌雄ともに 5.0 ppm (雄 0.3006mg/kg/日、雌 0.3508 mg/kg/日) と判断された。

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

1-10. 28日間反復投与遅発性神経毒性試験

試験成績提出の除外

急性毒性及び反復投与毒性試験の結果、並びに遅発性神経毒性を有する既知化合物との化学構造上の相関等からみて、遅発性神経毒性を有する恐れがないと認められるため試験を省略。

1-11. 慢性毒性及び発癌性

(1) ビーグル犬を用いた 52 週間経口投与慢性毒性試験

(資料 19)

試験機関:

(GLP 対応)

報告書作成年:

検体純度:

供試動物: 純系ビーグル犬、20~23 週齢、体重 5.36~7.21kg、1 群雌雄各 6 頭

試験期間: 52 週間(1 月 15 日~ 1 月 27 日)

投与方法: 検体を用量 0.2、2.0、5.0 mg/kg/日、最初の 15 日間はゼラチンカプセルに直接充填して投与した。それ以降は用量の正確さを改善するために、検体と乳糖(1:20)を混合して増量した後、ゼラチンカプセルに直接充填して投与した。混合物は 3~4 週間ごとに調製した。対照群には最初の 15 日間は空のカプセルを、以後は乳糖を 100 mg/kg/日の用量で充填したゼラチンカプセルを投与した。

用量設定根拠: 同研究所で同系統の動物を用い、用量 0.5、2.0 及び 10 mg/kg でゼラチンカプセルに充填して 13 週間投与した結果(資料 No. 16)、10 mg/kg 群では食欲不振、摂餌量の減少、体重減少、削瘦、活動低下及び円背位等の一般的な毒性を示唆する症状が投与初期に著明で、一部を切迫殺した。生存例でも有意な毒性が認められた。2.0 mg/kg/日群では、一過性の食欲不振を伴い摂餌量の減少及び体重増加抑制等軽微な影響が認められた。0.5 mg/kg では影響が認められなかった。これらの結果から 0.2、2.0 及び 5.0 mg/kg/日を選択した。

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。

死亡率: 2.0 mg/kg 群の雄 1 例及び 5.0 mg/kg 群の雄 2 例は、投与に起因する重篤な神経症状を示し、体重減少と食欲不振あるいは視覚障害がみられたので、それぞれ投与 11、31 及び 34 週に切迫殺した。

一般状態: 神経症状発動物数を次表に示す。

神経症状発動物数

症状	性別/投与量 (mg/kg)							
	雄				雌			
	0	0.2	2.0	5.0	0	0.2	2.0	5.0
検査動物数	6	6	6 ¹	6 ²	6	6	6	6
痙攣			1 (1)	2 (3)			1 (1)	
四肢の伸展強直			4(16)	3(19)			3(19)	6(20)
過敏性行動	1(1)		2 (2)	3 (7)			2 (4)	1 (4)
異常歩行/姿勢			1 (1)	4(47)			2(2)	2(13)
筋の攣縮/振戦			2 (2)	3(13)			2 (3)	2 (8)

()内は神経症状の認められた週数。 空欄は当該所見の発生なし。
¹ : 1例を投与 11 週に切迫殺した。 ² : 2例を投与 31 及び 34 週に切迫殺した。

5.0 mg/kg 群の雌雄全例、2.0 mg/kg 群の雄 5 例及び雌 3 例で投与 2 週以後、間欠的に神経障害を示唆する各種筋肉の痙攣、硬直、攣縮及び振戦、過敏性行動及び歩行や姿勢異常が発現した。これらの動物のうち、5.0mg/kg 群の雄 2 例は健康状態不良、視覚障害がみられたため切迫殺した。2.0 mg/kg群の雄 1 例も体重減少と食欲不振を含む著明な健康状態不良を示したため切迫殺した。

さらに、5.0 及び 2.0 mg/kg 群で活動パターンの変化、発声、點頭、攻撃性及び投与に対する抵抗がみられ、投与との関連性が疑われた。

0.2 mg/kg 群では投与による明らかな影響は認められなかった。この群の雌 1 例で投与 13~18 週に著明な過剰活動が、18~19 週には活動低下が、投与 39 週まで消瘦が認められた。この動物で 12~15 週に認められた体重減少はこの行動変化によるものと考えられた。同群及び高用量群の動物では、この行動変化は全く認められないため、投与に関連はないものと考えられた。

申請者注 :

投与 1 週には、いずれの投与群でも異常は認められなかった。唯一、5.0mg/kg の雌 1 例で投与後 1~3 日に食欲不振が一般症状として記録されたが、同期間において測定した摂餌量には影響がなく、毒性学的意義はないものと考えられる。

体重変化 : 毎週 1 回、全ての動物の体重を給餌前に測定した。健康不良動物はより頻繁に測定した。

投与終了時の体重及び体重増加を次表に示す。

体重/体重増加 (kg)		性別/投与量 (mg/kg)							
		雄				雌			
		0	0.2	2.0	5.0	0	0.2	2.0	5.0
体重	26週時	12.7	12.8	12.9	12.8	11.0	10.5	10.6	10.1
	52週時	13.4	13.7	13.7	13.6	12.0	11.4	11.7	11.1
体重 増加	0-26週	4.4	4.5	4.5	4.4	3.5	3.3	3.3	2.9
	26-39週	0.5	0.4	0.4	0.5	0.5	0.7	0.5	0.5
	39-52週	0.2	0.5	0.4	0.3	0.5	0.2	0.6	0.5
	0~52週	5.2	5.4	5.3	5.2	4.5	4.1	4.4	3.8

5.0 mg/kg 群の雌 1 例の体重増加 (1.0 kg) が投与後最初の 26 週間、特に低値を示し (同群の他の動物の体重増加: 2.8~3.7 kg)、この群のこの期間の平均体重に影響した。他の投与群では対照群と差がなかった。

切迫屠殺例では屠殺前の 2~6 日間に 0.6~1.4 kg の体重減少がみられた。

摂餌量: 全動物の摂餌量は毎日飼料残量を測定して算出した。

試験期間を通じて、投与群動物の摂餌量は一般に対照群と差がなかった。

獣医学的検査: 投与開始前並びに投与 12、24、36 及び 48 週に、以下の項目について検査した。

歯及び歯肉、粘膜及び皮膚、耳、眼、表在性リンパ節、腹部 (触診を含む)、外性器及び乳腺、胸部 (心臓及び肺の聴診を含む)、歩行及び姿勢 (肢の触診を含む)、一般行動及び概観

神経症状発生動物数を次表に示す。

検査 時期	症状	性別/投与量 (mg/kg)							
		雄				雌			
		0	0.2	2.0 ¹	5.0 ²	0	0.2	2.0	5.0
12 週	緊張/過敏				1			1	
	歩行硬直				1				
	知覚過敏				1				
	興奮								1
24 週	緊張/過敏			1	2			1	1
	歩行硬直			1					
	鬱縮				2				
36 週	緊張/過敏			2	2			1	2
	興奮								1
48 週	緊張/過敏			3	3			2	2
	後肢後方伸展				1				1
異常を示した動物数				3	6			2	3

¹: 1 例を投与 11 週に切迫殺した。

²: 2 例を投与 31 及び 34 週に切迫殺した。

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

5.0 及び 2.0 mg/kg 群で投与に起因すると考えられる異常所見とし緊張、過敏、興奮行動及び後肢の歩行硬直あるいは後方伸展、顔面筋攣縮、知覚過敏が認められた。

0.2 mg/kg 群では投与に起因する変化は認められなかった。

神経機能検査：投与 6 日前、投与 13、25、39、51 週に以下の神経機能検査を行った。

脳神経反射：瞳孔対光反射、共感性対光反射、眼瞼まばたき及び角膜反射、催吐反射、その他の脳神経を評価するための頭部の一般的検査

分節反射：交差性伸筋反射、屈筋反射(撤去反射)、膝蓋腱反射、

姿勢反応：踏み直し反応(視覚性及び触覚性)、姿勢性突伸反応、立ち直り反応(視覚性及び前庭性)、緊張性頸反応、跳び直り反応

一般的観察：行動変化(攻撃的、鎮静)、歩行と姿勢の異常(筋緊張を含む)、振戦あるいは他の運動障害の有無

機能異常のみられた動物数を次表に示す。

症状	検査時期	性別/投与量 (mg/kg)							
		雄				雌			
		0	0.2	2.0	5.0	0	0.2	2.0	5.0
緊張	13 週				3/6			1/6	3/6
	25 週	2/6	1/6	2/5	2/6		1/6	2/6	3/6
	39 週	2/6		3/5	2/4		1/6	2/6	2/6
	51 週			2/5	1/4	1/6	1/6	2/6	3/6
	0-51 週	2/6	1/6	3/6	5/6	1/6	1/6	2/6	4/6
姿勢異常	13 週		1/6						1/6
	25 週				2/6				2/6
	39 週				2/4				4/6
	51 週				1/4				4/6
	0-51 週		1/6		3/6				4/6
異常歩行	13 週				1/6				
	25 週				1/6				
	0-51 週				1/6				
跳び上り 反射過剰	13 週				1/6				
	25 週								2/6
	39 週				1/4				2/6
	51 週				1/4				
	0-51 週				1/6				2/6
催吐反射 過剰	39 週		1/6						
	51 週						1/6		3/6
	0-51 週		1/6				1/6		3/6
0-51 週に異常を示した動物数	2/6	3/6	3/6	5/6	1/6	1/6	2/6	5/6	

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

緊張、歩行と姿勢異常(後肢の後方伸展/開脚、円背位)、催吐反射過剰が 5.0mg/kg 群の雌雄 5 例、2.0mg/kg 群の雄 3 例、雌 2 例にみられた。

緊張は雄において散発的に認められたが、対照群でも 2 例で認められていることから投与との関連性は明らかでなかった。雌では 5.0mg/kg 群で 4 例及び 2.0mg/kg 群で 2 例にみられた。

異常姿勢(後肢の後方伸展/開脚)は 5 mg/kg群の雄 3 例、雌 4 例で観察され、足すべり検査をしたところ、反応低下が認められた。その他の例で蹲り、円背位がみられた。

跳び上り反射過剰は、5.0 mg/kg 群の雄 1 例、雌 2 例で観察された。

催吐反射過剰は、5.0mg/kg 群の雌 3 例で過剰な反応が認められた。

血液学的検査：投与前、投与 13、25、51 週に、一晚絶食した動物の頸静脈から採取した血液を用いて、以下の項目の測定を行った。

ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、赤血球数、網状赤血球数、総白血球数、白血球像(好中球、リンパ球、好酸球、好塩基球、単球、非染色巨大細胞)、血液塗抹、血小板数、平均赤血球血色素量、平均赤血球容積、平均赤血球血色素濃度、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間

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	検査項目	性別/投与量 (mg/kg)					
		雄			雌		
		0.2	2.0	5.0	0.2	2.0	5.0
13 週	リンパ球		79↓				68↓
25 週	ヘモグロビン						107↑
	プロトロンビン時間				106↑	106↑	
51 週	ヘマトクリット					109↑	111↑
	ヘモグロビン					109↑	110↑
	赤血球数					109↑	110↑
	平均赤血球ヘモグロビン濃度				97↓		
	総白血球数			132↑			
	好中球数			134↑			
	リンパ球			128↑			
	プロトロンビン時間					96↓	

統計手法：Student t 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。

2.0 及び 5.0 mg/kg 群の雌で、投与開始後 51 週には、ヘマトクリット、ヘモグロビン濃度及び赤血球数が対照群に比べてやや高い値を示した。この時点では、5 mg/kg/日群の雄 1 頭でもこれら項目がやや高い値を示した。又、5.0mg/kg 群の雄では好中球及びリンパ球数の増加に起因する白血球数の増加がみられた。

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

5.0 mg/kg 群の雄 2 頭の切迫屠殺例で、屠殺前に測定したヘマトクリット、ヘモグロビン濃度及び赤血球数がそれら動物の投与前値に比べてやや高い値を示したが、13 及び 25 週の検査時の投与群と対照群の動物間に差がなかったため、投与によるものではないと考えられた。

血液生化学的検査：血液学的検査で使用了血液と同時に採取した血液から得られた血漿を用いて、以下の項目の測定を行った。

アルカリホスファターゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、クレアチンホスホキナーゼ、尿素、クレアチニン、グルコース、総ビリルビン、総コレステロール、総蛋白、蛋白分画、ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン

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	検査項目	性別/投与量 (mg/kg)					
		雄			雌		
		0.2	2.0	5.0	0.2	2.0	5.0
13 週	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ			87↓			
	尿素濃度		81↓	85↓			
	クレアチニン濃度				93↓		
	グルコース濃度					150↑	
	ビリルビン濃度						
	アルブミン		90↓				
	α ₁ -グロブリン	75↓					75↓
	α ₂ -グロブリン	117↑	133↑	117↑			
	A/G 比		83↓				101↑
	塩素濃度 (Cl)		102↑				
無機リン濃度 (P)			91↓				
25 週	グルコース濃度	94↓					
	α ₁ -グロブリン	67↓					
	γ-グロブリン						133
	A/G 比	118↑					
51 週	アルカリホスファターゼ 活性		241↑				
	アラニンアミノトランスフェラーゼ 活性						164↑
	クレアチンホスホキナーゼ 活性	84↓					
	アルブミン		94↓				
	α ₁ -グロブリン			150↑			
	α ₂ -グロブリン		133↑				
	γ-グロブリン						133↑
	A/G 比		85↓				
	ナトリウム濃度 (Na)		101↑		99↓		
	カリウム濃度 (K)						
塩素濃度 (Cl)		102↑				102↑	

統計手法: Student t 検定 ↑↓: p<0.05 ↓↓: p<0.01 ↑↑: p<0.001

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。

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

表のように対照群に比べて統計学的有意差のある群間差がいくつか認められたが、これらの変化は軽微で、一般に傾向がみられず、一過性の所見であるため、毒性学的意義はないと考えられた。

切迫殺例で、投与前値に比べて、5.0 mg/kg 群雄 2 例でアラニンアミノトランスフェラーゼ及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性の軽度亢進が、2.0 mg/kg 群雄 1 例で尿素濃度、総ビリルビン濃度及びコレステロール濃度の軽微上昇が認められた。

尿検査：投与 6 日前、投与 12、24 及び 49 週に採取した一夜尿について、以下の項目を検査した。

外観、尿量、pH、比重、蛋白、総還元物質、グルコース、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン、亜硝酸塩、潜血、沈渣

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。

検査項目	検査時期	性別/投与量 (mg/kg)										
		雄				雌						
		0	0.2	2.0	5.0	0	0.2	2.0	5.0			
尿量 (%)	24 週			53↓								
比重	投与前	1.047	1.043	1.055	1.045							
	24 週	1.037	1.042	1.042	1.047↑							
pH	投与前					5.9	5.7	5.5↓	5.8			
	12 週					5.6	5.8	5.7	5.9↑			
	49 週					6.2	5.8	5.7	5.6↓			

統計学的手法：Student t 検定 ↑↓：p<0.05 ↑↓：p<0.01 矢印のない数値は有意差なし。

表中の尿量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。

24 週の検査で、5.0mg/kg 群雄で比重の高値、2.0mg/kg 群で尿量の減少がみられた。12 及び 49 週の検査で、5.0mg/kg 群雌の pH(5.6)が低値あるいは高値を示した。いずれの所見も投与前値と同等あるいは用量関連性がなく、検体投与に関連があるとは考えられなかった。

切迫殺例の屠殺後に採尿した試料にも、有意な所見はみられなかった。

眼科学的検査：投与 5 日前、投与後 12、24、50 週後に全生存動物を対象として検査した。

眼瞼及びその周辺、結膜、角膜及び強膜、前眼房及び虹彩、水晶体及び硝子体、眼底

投与に起因すると考えられる特記すべき所見は認められなかった。

臓器重量：試験終了時に灌流固定法以外で屠殺した動物を対象(各群雌雄各 4 頭)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、下垂体、脳、前立腺及び尿道、心臓、脾臓、腎臓、精巣、肝臓、胸腺、肺、甲状腺と上皮小体卵巣、子宮及び頸部

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

臓器重量に群間差はほとんどなく、投与に直接関連があると考えられた所見はなかった。

2.0 及び 5.0 mg/kg 群雌で心臓の対体重比が対照群に比べて有意な軽度高値を示したが、絶対重量に影響はみられなかったため、直接、投与に関連があるとは考えられなかった。

5.0 mg/kg 群雌 1 例で脾臓重量が高値を示したため、平均脾臓重量が軽度高値を示した。また、5.0 mg/kg 群雄 1 例で甲状腺及び肝臓重量が高値を示したが、他の動物にこのような変化はみられなかったため、これらは投与に関連があるとは考えられなかった。

切迫殺動物のうち、2.0 mg/kg 群雄 1 例及び 5.0 mg/kg 群雄 1 例で脾臓重量が高値を示した。

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。

臓器		性別/投与量 (mg/kg)					
		雄			雌		
		0.2	2.0	5.0	0.2	2.0	5.0
心臓	対体重比				107	119	119↑
下垂体	対体重比				140↑		
脾臓	重量				106	81	148

統計学的手法 : Dunnett 検定 ↑↓: 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。

臓器重量に群間差はほとんどなく、投与に直接関連があると考えられた所見はなかった。

2.0 及び 5.0 mg/kg 群雌で心臓の対体重比が対照群に比べて有意な軽度高値を示したが、絶対重量に影響はみられなかったため、直接、投与に関連があるとは考えられなかった。

5.0 mg/kg 群雌 1 例で脾臓重量が高値を示したため、平均脾臓重量が軽度高値を示したが、5.0 mg/kg 群雄 1 例で甲状腺及び肝臓重量が高値を示したが、他の動物にこのような変化はみられなかったため、投与に関連があるとは考えられなかった。

切迫殺動物のうち、2.0 mg/kg 群雄 1 例及び 5.0 mg/kg 群雄 1 例で脾臓重量が高値を示した。

肉眼的病理検査 : 投与終了時の全生存動物及び途中死亡動物について剖検を行った。

検体投与に関連があると考えられる肉眼的所見はみられなかった。

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

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・エオジン染色して病理標本を作成し、検鏡した。

乳腺、リンパ節(気管支、腸間膜、下顎)、大動脈、唾液腺(左顎下腺)、大腿骨、胸骨及び骨髄、胸腺、気管、肺、心臓、甲状腺、上皮小体、食道、胃、小腸(十二指腸、空腸、回腸)、大腸(盲腸、結腸、直腸)、肝臓、胆嚢、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、前立腺及び尿道、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、膣、脳、下垂体、坐骨神経(左)、骨格筋(大腿)、脊髄、眼球(視神経を含む)、皮膚、全ての肉眼的病変部

投与に関連した病理組織学所見は認められなかった。

以上の結果から、本剤の犬に対する 52 週間混餌投与による慢性毒性試験における影響として、5.0 及び 2.0 mg/kg 群で、間欠的に神経障害を示唆する各種筋肉の痙攣、硬直、攣縮及び振戦、過敏性行動及び歩行や姿勢異常、知覚過敏が発現し、これらのうち、5.0mg/kg 群の雄 2 例は健康状態不良、視覚障害が、又、2.0 mg/kg 群でも雄 1 例で体重減少と食欲不振を含む著明な健康状態不良を示したため切迫殺した。5.0 及び 2.0 mg/kg 群の雌ではヘマトクリット、ヘモグロビン濃度及び赤血球数が高値を示し、5 mg/kg群の雄では白血球数の増加がみられた。病理組織学的に投与に関連した所見は認められなかった。

0.2 mg/kg 群では投与による明らかな影響は認められなかった。

従って、無毒性量は (NOAEL) は雌雄とも 0.2 mg/kg/日と考えられた。

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。

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) ビーグル犬を用いた 52 週間経口投与慢性毒性試験

(資料 20)

試験機関:

(GLP)

報告書作成年:

検体純度:

供試動物: 純系ビーグル犬、21-24 週齢、体重雄 9.4~11.6; 雌 7.3~10.0kg、1 群雌雄各 5 匹

試験期間: 52 週間 (12 月 30 日 ~ 1 月 7 日)

投与方法: 検体を直接、用量 0、0.075、0.3、1.0、3.0/2.0* (*死亡があったので、6 週以降 2.0mg/kg/日に減量; 以降この群は 2.0mg/kg 群と記載する) mg/kg となるように飼料に混入し、52 週間にわたって随時摂取させた。飼料中の濃度は最初の 4 週間は毎週、それ以降は 4 週間おきに各群雌雄別に検体濃度を調節し、必要な用量を投与した。1 日 2 回 3.5 時間以上の間隔を開け給餌した。検体を混入した飼料は毎週調製した。

投与量設定根拠: 同研究所で同系統の動物を用い、0、0.2、2.0、5.0mg/kg の用量で実施した 52 週間カプセル投与試験(資料 19)で 2.0 及び 5.0mg/kg 群で死亡が認められたことから、最高用量は 3.0mg/kg とし、0、0.075、0.3、1.0、3.0mg/kg を設定し開始した。しかし、3.0mg/kg 群の雌 1 例で、重篤な健康不良のため投与 32 日に切迫殺し 6 週の 3 日から 2.0mg/kg に減量した。

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。

死亡: 2.0mg/kg 群雌の 1 頭を切迫屠殺した。この動物には投与 10~11 日に振戦、活動低下、痙攣がみられ、さらに屠殺前日から虚脱、緩徐呼吸等重篤な健康不良のため投与 32 日に切迫殺した。屠殺前の検査で長時間立てず、瞳孔収縮、軽度消瘦等がみられ、さらに視覚性踏み直し反射の欠如、威嚇行動低下、驚愕反射、異常歩行等の神経障害がみられた。

一般症状: 死亡例を除く神経症状発生動物数を次表に示す。

2.0mg/kg 群では、上記の切迫殺例の他にも、雌 1 頭、雄 3 頭、1.0mg/kg 群で雌 2 頭で点頭、痙攣、四肢伸展強直、筋攣縮あるいは振戦が散発的にみられた。これら以外に投与と関連性のある症状はみられなかった。

0.3mg/kg、0.075mg/kg 群には影響が認められなかった。

神経症状発生动物数 (2.0mg/kg 群雌1頭の死亡例を除く)

症状*	性別/投与量 (mg/kg)									
	雄					雌				
	0	0.075	0.3	1.0	2.0	0	0.075	0.3	1.0	2.0
検査動物数	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4
痙攣/全身攣縮					1 ^a					1 ^b
四肢の伸展強直			1 ^c		1 ^d				1 ^e	1 ^f
鼻面、耳介、顔面筋の攣縮/振戦					3 ^g					1 ^h
運動失調			2 ⁱ		1 ^j	1 ^k	1 ^l	1 ^m		1 ⁿ

空欄は当該所見の発生なし。

*は該当神経症状の認められた週は ^a: 6 及び 45 週 ^b: 6 及び 5 週 ^c: 52 週 ^d: 20~25 週

^e: 20 週 ^f: 20~35、41、42 週 ^g: 4 週/5 および 20 週/1-20 週 (各1個体) ^h: 2 週

ⁱ: 46 週/52 週 (各1個体) ^j: 4~5 及び 6 週 ^k: 8、10 及び 27~28 週

^l: 7 及び 10 週 ^m: 8 週 ⁿ: 2 週

体重変化: 馴化期間を含め試験期間中、週1回、全ての生存動物の体重を測定した。

投与終了時の体重及び体重増加を次表に示す。

体重/体重増加 (kg)		性別/投与量 (mg/kg)									
		雄					雌				
		0	0.075	0.3	1.0	2.0	0	0.075	0.3	1.0	2.0
検査動物数		5	5	5	5	5	5	5	5	5	4(5)
体重	52 週時	14.4	14.7	14.3	13.8	14.3	12.7	12.7	12.4	12.7	12.8
体重増加	0-26 週	3.6	3.7	3.5	3.1	3.2	3.5	3.5	3.3	3.2	2.9
	26-39 週	0.4	0.4	0.3	0.3	0.4	0.0	0.5	0.3	0.4	0.5
	39-52 週	0.2	0.3	0.1	0.2	0.4	0.4	0.5	0.1	0.5	0.5
	0~52 週	4.2	4.4	3.9	3.5	3.9	4.0	4.6	3.7	4.1	3.9

1.0mg/kg 群雄及び 2.0mg/kg 群雌雄とも 0~26 週までの平均体重増加が対照群よりわずかに低かったが、試験期間中の累積体重増加及び投与終了時の体重に対照群との差はなかった。1.0mg/kg 群雄の差は1頭の体重増加が低いためであった。したがって、上記の差は偶発的で、全ての群とも生存動物に投与による体重への影響はなかったと判断された。

摂餌量: 全動物の摂餌量は毎日飼料残量を測定して算出した。

総摂餌量の対照群に対する比率%を次表に示す。

性別	雄				雌			
用量 mg/kg	0.075	0.3	1.0	2.0	0.075	0.3	1.0	2.0
総摂餌量	100.0	100.0	100.0	100.0	99.7	99.0	100.0	100.1

いずれの群とも総摂餌量にはほとんど対照群との差がなかった。

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

切迫殺動物では屠殺前数日間摂餌量が低下したが、その他の動物では、1.0mg/kg 群で1頭、0.3mg/kg 群で2頭、0.075mg/kg 群で1頭の摂餌量が時々食欲不振を示し、摂餌量が軽度に低下した。これらの期間は健康不良の徴候、又は発情周期異常のみられた期間と一致しており、偶発的に発現し、投与による影響とは認められなかった。

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。

性別	雄				雌			
	用量 mg/kg	0.075	0.3	1.0	2.0	0.075	0.3	1.0
検体摂取量 (mg/kg)	0.074	0.299	0.998	2.840* /1.999	0.074	0.295	0.996	2.822* /1.995

* 3.0mg/kg を投与した切迫殺までの平均値。

獣医学的検査：投与開始前並びに投与 12、24、36 及び 48 週に、以下の項目について検査した。

歯及び歯肉、粘膜及び皮膚、耳、眼、表在性リンパ節、腹部(触診を含む)、外性器及び乳腺、胸部(心臓及び肺の聴診を含む)、歩行及び姿勢(肢の触診を含む)、一般行動及び概観

投与に関連した所見は認められなかった。

神経機能検査：投与 2 週前、13、25、38、51 週に以下の神経機能検査を行った。

脳神経反射：瞳孔対光反射、共感性対光反射、眼瞼まばたき及び角膜反射、催吐反射、威嚇、その他の脳神経を評価するための頭部の一般的検査

分節反射：交差性伸筋反射、屈筋反射(撤去反射)、膝蓋腱反射、伸筋緊張反射、浅頭筋反射(cutaneous trunci)

姿勢反応：踏み直し反応(視覚性及び触覚性)、姿勢性突伸反応、立ち直り反応(視覚性及び前庭性)、緊張性頸反応、跳び直り反応

一般的観察：行動変化(攻撃的、鎮静)、歩行と姿勢の異常(筋緊張を含む)、振戦あるいは他の運動障害の有無

反射機能に異常のみられた動物数を次表に示す。

2.0mg/kg 群の別の雄1頭で屈筋反射亢進(投与 13、25、51 週)が認められたが、散発的な発生であり、投与との関連性は恐らくないであろう。

その他に認められた症状も散発的に発生し、又用量依存性も認められないことから、投与によるもので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

反射機能に異常のみられた動物数(2.0mg/kg 群雌 1例の死亡例を除く)

症状	検査時期(週)	性別/投与量(mg/kg)									
		雄					雌				
		0	0.075	0.3	1	2	0	0.075	0.3	1	2
屈筋反射亢進	13					1					
	25			1		1					
	38			1							
	51			1		1					
緊張性頸反射亢進	13					1					
	51		1								
眼瞼まばたき反射亢進	25	1		1		1				1	
	38	1									
眼瞼角膜反射亢進	-2	1		1						1	
	25	1	1			1				1	
催吐反射	-2		1	1					1	1	
	13		1			1					
	25		1	1		1				1	
	51			1		1					
威嚇	-2						1				
	25	1								1	
膝蓋腱反射	38			1							
交差性伸筋反射低下	13	2	1	1		1		1	1		
	25	1		1		1		1	2		
	38			1							
	51	2						1			
浅頭筋反射低下	-2								1		
	13								1		
	25	2					1	2			
	38	1	1		1						
	51	2				1	1	1	1		
非協調性視覚性踏み直し反応	-2								1		
	25								1		
	38						1				
触覚性踏み直し反応低下(非協調性)	-2	1	1	1					(1)	2	
	13		1	1		1	1	2	(1)	2	
	25					(1)			1(1)		
	38					(1)			(2)		
	51	(1)				(1)			1		
伸筋緊張反射亢進	25								1		
視覚性立ち直り反応低下(非協調性)	-2	(1)					(1)			(1)	
	13				1						
非協調性立ち直り反応前庭性	13									1	
跳び直り反応亢進(非協調性)	13						1				
	25						1		1		
	38		(1)				(1)				
驚愕反応	38		1			1			1		

空欄は当該所見の発生なし。

血液学的検査：投与前、投与 13、25、51 週に、一晚絶食した動物の頸静脈から採取した血液を用いて、以下の項目の測定を行った。

ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、赤血球数、網状赤血球数、総白血球数、白血球像(好中球、リンパ球、好酸球、好塩基球、単球、非染色巨大細胞)、血液塗抹、

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

血小板数、平均赤血球血色素量、平均赤血球容積、平均赤血球血色素濃度、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (PTTK)

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。

性別		雄				雌			
用量 (mg/kg)		0.075	0.3	1.0	2.0	0.075	0.3	1.0	2.0
検査動物数		5	5	5	5	5	5	5	4
25 週	PT		106↑				109↑		
	好中球							145↑	
	PTTK						88↓		84↓
51 週	PTTK						86↓		83↓

統計学的方法: Student t-test ↑↓: 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。

0.3 および 2.0mg/kg 群雌で 25 及び 51 週時に PTTK の有意な短縮がみられたが、採血時の組織液の混入等により短縮することがあり、短縮であることから毒性学的意義はないと考えられる。その他に表のような変動がみられたが、用量関連性がないことから投与とは無関係と考えられた。

死亡例を投与前値と比較したとき、ヘマトクリット、ヘモグロビン及び赤血球数が高値を示した。

血液生化学的検査: 血液学的検査で使用了血液と同時に採血した血液から得られた血漿を用いて、以下の項目の測定を行った。

アルカリホスファターゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、クレアチンホスホキナーゼ、尿素、クレアチニン、グルコース、総ビリルビン、総コレステロール、総蛋白、蛋白画分、アルブミン/グロブリン (A/G) 比、ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン

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。

上表のように対照群に比し有意に変動した項目もあったが、用量関連性もなく、生物学的変動の範囲内で投与とは無関係と考えられた。

血液生化学的検査値の対照群に対する比率%

性別		雄				雌			
用量 (mg/kg)		0.075	0.3	1.0	2.0	0.075	0.3	1.0	2.0
検査動物数		5	5	5	5	5	5	5	4
13 週	A/G 比			118↑					
	α ₂ -グロブリン					89↓			
	グルコース						108↑	109↑	
	総コレステロール			80↓					
	無機リン							116↑	
	ナトリウム								101↑
25 週	ALT	145↑							
	ビリルビン					50↓	50↓		
	A/G 比						85↓		
	α ₂ -グロブリン						114↑		
	β-グロブリン	117↑							
	ナトリウム					99↓	99↓	99↓	
51 週	A/G 比						85↓		
	α ₂ -グロブリン						114↑	129↑	
	総コレステロール							141↑	

統計学的手法：Student t 検定 ↑↓：p<0.05 ↑↓：p<0.01 ↑：p<0.001

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。

甲状腺ホルモン T3、T4 の測定；投与 1 及び 2 週間前、投与 2 及び 14 週後に同様に採血し、血漿を用いて、トリヨードチロニン (T3) 及びチロキシン (T4) を測定した。

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。

性別		雄				雌			
用量 mg/kg		0.075	0.3	1.0	2.0	0.075	0.3	1.0	2.0
検査動物数		5	5	5	5	5	5	5	5(4)
トリヨードチロニン活性									
投与 2 週前									
投与 1 週前									
投与 2 週			76↓			93↓			
投与 14 週							119↑		
チロキシン活性									
投与 2 週前	123↑								
投与 1 週前						68↓	70↓	77↓	
投与 2 週			72↓						
投与 14 週									

統計学的手法：Student' s t 検定 ↑↓：p<0.05 ↑↓：p<0.01 ↓：p<0.001

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。

上表のように対照群に比し有意な変動がみられたが、用量関連性がなく、投与との関連は認められなかった。

血漿中の代謝物の分析；投与 1、13、24、38、50 週に各動物のその日の給餌前に採血し、分離した血漿を用いて、フィプロニル (親化合物) 及び主要代謝物である代謝物 B () を分析した。

分析値の平均値を次表に示す。

性別	フィプロニル(親化合物) (ng/ml)				代謝物 B (ng/ml)				
	用量 mg/kg	0.075	0.3	1.0	2.0	0.075	0.3	1.0	2.0
検査動物数	5	5	5	5	5	5	5	5	5(4 ^a)
雄									
1 週	<23	64	251	543	38	254	858	2255	
13 週	<26	85	282	448	63	491	1297	2338	
24 週	28	88	290	495	60	475	1155	2007	
38 週	<29	101	326	557	69	510	1195	2244	
50 週後	31	105	328	525	43 ^b	424	1006	1903	
雌									
1 週	<24	74	208	655	<33	120	461	1925	
13 週	27	95	292	616*	69	222	844	*1986	
24 週	27	101	280	595*	<71	244	815	*1842	
38 週	32	123	334	703*	82	274	927	*2187	
50 週	33	101	303	538*	<69	221	822	*1686	

*: 4 頭

^a: 1 例は投与 32 日に切迫屠殺した。

^b: ピークに近接した妨害物による異常値のために平均値から 1 例を除いた。

フィプロニル(親化合物)と主要代謝物 (代謝物 B) が認められた。

各物質の血漿中濃度は明らかな用量依存性を示した。いずれの場合も代謝物が親化合物より高かった。血漿中濃度に性差も、蓄積も認められなかった。

尿検査: 投与前、投与 12、24 及び 50 週に採取した一夜尿について、以下の項目を検査した。

外観、尿量、pH、比重、蛋白、総還元物質、グルコース、ケトン、ビリルビン、ウロビリノーゲン、亜硝酸塩、潜血、沈渣

投与 24 週検査で 0.075mg/kg 群雄の尿量が有意に低下(対照群の 24.2%; p<0.01)し、尿比重(対照群 1.028、0.075mg/kg 群 1.036; p<0.05)が有意に高かったが、投与による影響は認められなかった(Student's t-検定)。

眼科学的検査: 投与前、投与 13、25、51 週に全生存動物を対象として検査した。

眼瞼及びその周辺、結膜、角膜及び強膜、前眼房及び虹彩、水晶体及び硝子体、眼底

投与に起因すると考えられる特記すべき所見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

臓器重量；試験終了時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。

肝臓、腎臓、肺(主気管支を含む)、副腎、下垂体、脳、心臓、脾臓、胸腺、甲状腺及び上皮小体、精巣、前立腺及び尿道、卵巣、子宮

対照群と比べ統計学的に有意差の認められた臓器及び有意ではなかったが肉眼的に腫大の認められた臓器について下表に示す。

性別		雄				雌			
用量 (mg/kg)		0.075	0.3	1.0	2.0	0.075	0.3	1.0	2.0
検査動物数		5	5	5	5	5	5	5	4
脾臓	重量			91↓	98				
	対体重比	109	95	105	124	93	98	77	79

統計学的手法：Dunnett 検定 ↑↓: p<0.05 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。

脳重量が 1mg/kg 群雄で有意に低かったが、投与との関連性は認められなかった。
2.0mg/kg 群雄で脾臓の重量及び相対重量が高い傾向に、又雌では 1.0mg/kg 以上の群で逆に低い傾向にあったが、いずれも統計学的に有意ではなく、偶発的と考えられた。

肉眼的病理検査；投与終了時の全生存動物及び途中死亡動物について剖検を行った。

認められた主要な所見を次表に示す。

性別		雄					雌				
用量 mg/kg		0	0.075	0.3	1.0	2.0	0	0.075	0.3	1.0	2.0
検査動物数		5	5	5	5	5	5	5	5	5	4
脾臓	腫大	1	1	1	1	3	1	0	1	0	0
	大型	0	0	1	1	2	1	0	0	0	0

統計学的手法：Fisher 直接確立検定 有意差なし。

2.0mg/kg 群雄の脾臓の腫大又は大型の発現率が対照群よりやや高かったが、対照群に比し有意差はなく、他の投与群、あるいは雌では認められなかったので、投与による影響ではないと考えられた。

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・エオジン染色して病理標本を作成し、検鏡した。

乳腺、リンパ節(気管支、腸間膜、下顎)、大動脈、唾液腺(左顎下腺)、大腿骨及び骨髓、胸骨及び骨髓、胸腺、気管、肺、心臓、甲状腺、上皮小体、食道、胃、小腸(十二指腸、空腸、回腸)、大腸(盲腸、結腸、直腸)、肝臓、胆嚢、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、前立腺及び尿道、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、膈、脳、下垂体、坐骨神経(左)、骨格筋(大腿)、脊髄、眼球(視神経を含む)、皮膚、全ての肉眼的病変部

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

認められた主要な組織学的所見を次表に示す。

生存動物において、2.0mg/kg 群の雄で赤脾髄過形成が対照群に比較して多かった。これは赤血球像に影響が認められなかったことから、これは瀉血の程度差を反映したもので、投与の影響ではないと考えられた。中枢神経系にはなんら変化を認めなかった。

切迫殺例においても特記すべき変化は認められなかった。

主要な組織学的所見

性別		雄					雌				
用量 mg/kg		0	0.075	0.3	1.0	2.0	0	0.075	0.3	1.0	2.0
検査動物数		5	5	5	5	5	5	5	5	5	4
脾臓	赤脾髄過形成	1	1	1	1	3	1	1	1	0	0
腎臓	乳頭管鈣質沈着	4	5	5	5	5	4	4	5	5	3
	集合管空胞形成	0	0	0	0	0	2	3	1	2	1

統計学的手法：Fisher 直接確立検定 有意差なし。

以上の結果から、本剤の犬に対する 52 週間混餌投与による慢性毒性試験における影響として、3.0mg/kg 群では振戦、痙攣、四肢伸展強直、筋攣縮等の神経症状が散発的にみられた。雌 1 例ではこれらの症状が非常に著明で、屠殺前の検査で神経障害(長時間立てず、瞳孔収縮、軽度消瘦、視覚性踏み直し反射の欠如、威嚇行動低下、驚愕反射、異常歩行等)がみられ、健康状態不良のため投与 32 日に切迫殺した。投与 6 週目から投与量を 2.0mg/kg に減量した後もこれらの神経症状は散発的に認められた。組織学的検査で中枢神経系に病変は認められなかった。

1.0mg/kg 群では雌 2 例に筋痙攣及び四肢伸展強直がみられたのみであった。

症状は用量依存性に認められた。親化合物及び主要代謝物 B の血漿中濃度は用量依存性で、性差や、蓄積作用は認められず、投与期間中ほぼ一定であった。

以上の結果から、フィプロニルのビーグル犬に対する無作用量(NOEL)は 0.3 mg/kg/日(雄 0.299mg/kg/日、雌 0.295mg/kg/日)と判断した。

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と無毒性量について)：

2.0 mg/kg 群雄で、投与 1 週～投与 20 週にかけて鼻面、耳介、顔面筋の攣縮/振戦が認められた。片姓かつ 1/5 例のみの変化であったが、投与後 1 日から継続して認められ、投与初期ではないが同群別個体でも認められた所見であることから、単回経口投与等によっても生じ得るものと判断した。2.0 mg/kg 群雌では異常は認められなかった。従って無毒性量は、雄 1.0 mg/kg、雌 2.0 mg/kg 以上と考えられた。

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

(2) ラットを用いた 52 週間反復投与慢性毒性/発がん性併合試験

(資料 21)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:

検体純度:

供試動物: SD(CD)系ラット、開始時 5~6 週齢、体重: 雄 155~231g、雌 129~195g、

1 群当り動物数: 発がん性群: 雌雄各 50 匹、慢性毒性群: 雌雄各 15 匹、回復群: 雌雄各 15 匹

試験期間: 発がん性群: 雄 89 週、雌 91 週(1 月 2 日~ 10 月 9 日)

慢性毒性群: 52 週(1 月 2 日~ 1 月 7 日)

回復群: 52 週投与+13 週回復(1 月 2 日~ 4 月 6 日)

投与方法: 検体を 0、0.5、1.5、30 及び 300ppm 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。発がん性群は 104 週間投与の予定であったが生存率が 25%になった時点でガイドラインの規定に従い予定の 104 週間満了を待たずに屠殺した^{申請者注}。群の構成及び投与期間は以下のとおりである。

用量 (ppm)	慢性毒性群					回復群					発がん性群				
	0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300
1 群雌雄動物数	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	50	50	50	50	50
投与期間	52 週間					52 週間					雄 89 週間、雌 91 週間				
回復期間	-					13 週間					-				

申請者注(動物の早期屠殺について):

残留農薬安全性評価委員会から、ラットを用いた慢性毒性/発がん性併合試験における「試験の早期終了の妥当性を説明すること」のコメントがあり、下記のように回答した。

回答の要旨

ラットを用いた慢性毒性/発がん性併合試験で生存率は 18 ヶ月時では 50%以上であったが、それ以降に低下した。最終屠殺時に 25%の生存率を確保するために、雄では 89 週間、雌では 91 週間投与後に屠殺を開始した。但し、最終屠殺時の生存率に統計学的に有意な群間差は認められなかった。この生存率の低下は検体投与に起因するものではなく、使用したチャールズ・リバー社/UK 供給の CD ラット自体の短命化に起因すると考えられた。当該試験機関の生存率に関する同時期の背景データとも一致していた。本試験に関して、この系統のラットの短命化を考慮すれば、ほぼ生涯に亘り投与されていること、死亡動物は的確に処理され、自己融解及び共食いによる臓器の損失が少なかったこと、最終屠殺の時点で老化指標の一つとされる下垂体腫瘍及び乳腺線維腺腫の発生が自然発生率に近く、投与がほぼ生涯に亘っていたことが示唆されたこと、本剤のラットに対する標的臓器である甲状腺に最高用量で濾胞細胞腺腫の発生が認められ、本試験の目的である発がん性の評価は充分可能であると考えられることから、被験を早期に終了したが、慢性毒性/発がん性の評価をする上で妥当性に問題は無いものと判断する。

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

投与量設定根拠：同研究所で同系統の動物を用いて行った亜急性毒性試験及び途中で中止した発がん性試験に基づき選択した。

亜急性毒性試験では用量 1、5、30 及び 300ppm で行い、最大耐量は 300ppm をやや上回り、無作用量は 1ppm と考えられた。5ppm と 30ppm では、軽度の適応反応が認められた。そのため、発がん性試験では 0.5、1.5、30 及び 400ppm を選択したが、最高濃度群で死亡と痙攣の発現が多数みられ、試験は 8 週後に中止した。この結果に基づき、0.5、1.5、30 及び 300ppm 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：主要な一般状態の変化を次表に示す。

症状	用量 (ppm) / 性別									
	雄					雌				
	0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300
慢性毒性群										
供試動物数	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
痙攣	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
興奮	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1
攻撃的行動	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1
回復群										
供試動物数	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
痙攣	0	0	0	0	2	0	0	0	1(1)	1(1)
興奮	0	0	1	1	0	0	0	0	0	5
活動亢進	0	0	0	0	1	0	0	0	2(1)	3
発声	0	0	0	1	0	0	0	1	1	5(1)
攻撃的行動	0	0	0	1	1	0	0	0	0	4
発がん性群										
供試動物数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
痙攣	0	0	3	1	5(3)	0	0	0	2	11
興奮	3	4	3	4	6(2)	2	2	5	6	18
活動亢進	0	0	0	0	1(1)	0	0	1	0	3
発声	4	9	3	6	10	4	2	11	7	19
流涎	0	0	1	0	1	0	0	0	2	8
攻撃的行動	0	3	2	1	4(2)	0	0	4	2	9
肥満	9	8	6	4	0	4	5	4	2	0
削瘦	14	8	12	14	22	9	11	13	18	9

()内の数値は申請者が追記した。投与 1 週にも発現が認められた個体数を表す。また、これらの個体ではいずれの所見も投与 2 週以降は認められず、一過的であった。

最高 25 分間持続する痙攣が全供試動物 80 匹の内、300ppm 群の雄 8 匹及び雌 12 匹、30ppm 群の雄 1 匹及び雌 3 匹、1.5ppm 群の雄 3 匹で認められた。この痙攣の発現は投与開始後の数週間に最も高頻度で、その後も数匹に認められた。300ppm 群の雄 4 匹及び雌 3 匹、30ppm 群の雌 1 匹、1.5ppm 群の雄 1 匹は痙攣発現後に死亡した。

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

300ppm 群では興奮、活動亢進、発声、流涎及び攻撃的行動が、雌で多くみられた。1.5ppm 及び 30ppm 群の雌も軽度なこれらの症状を示した。

300ppm 群の雄では消瘦動物数が対照群に比べて多かった。

投与期間中に認められた神経学的変化は、回復期間中は認められなかった。神経組織に病理組織学的変化はなく、この変化は可逆的であった。

死亡率：死亡率を次表に示す。

発がん性群は 104 週間投与の予定であったが、全群で死亡が多かったため、雄では 300ppm 群、雌では 30ppm 群で生存動物数が 13 匹になった時点で全動物を屠殺した。

性別		雄					雌				
投与群 (ppm)		0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300
発がん性群	動物数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	死亡数	30	36	28	30	38	27	29	29	37	28
慢性毒性群	動物数	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	死亡数	3	1	1	0	3	1	1	1	1	2
回復群	動物数	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	死亡数	2	0	2	2	5	2	2	4	0	5

統計学的方法：Kaplan-Meier、Cox's 検定及び Tarone's 検定で統計学的有意差なし。

300ppm 群では投与開始後、最初の数週間に痙攣により死亡した動物を反映して、試験の初期に死亡/切迫殺動物が対照群より多かった。

発がん性試験群の雌では 30ppm 群雌で死亡率が対照群より多かったが、300ppm 群雌では対照群と同様の死亡率であることから、この死亡は偶発的と考えられた。死亡率(死亡+切迫殺)に統計学的に有意な群間差は認められなかった。

回復期間中の群別死亡数分布と検体投与との相関は認められなかった。

なお、本試験の生存率は、当研究所で同時期に CD ラットを用いて行った数試験の生存率と大差はなく、他の研究機関で近年報告されている CD ラットの寿命低下(老化の早期進行)を反映したものであった(White, 1993)。

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及び回復群の最終屠殺時の体重を次表に示す。

体重の変化

性別	雄				雌				
	0.5	1.5	30	300	0.5	1.5	30	300	
投与量 (ppm)									
体重増加 ^a	0~1週			94↓	42↓			89↓	46↓
	1~52週				90↓				85↓
	0~52週				85↓				82↓
	0~88週				82↓	-	-	-	-
	0~90週	-	-	-	-			77↓	75↓
回復群の 体重	52週時			96	84			102	78
	64週時			97	80			100	78

統計学的手法：^a Behrens-Fisher または Dunnett 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。

試験 1 週に、300ppm 群の体重増加が対照群に比べて顕著に抑制され、それ以後、対照群に比べて有意な低値を示した。30ppm 群において、雄は体重増加が試験 1 週のみ有意に抑制された。雌は試験 52 週までは対照群と差がなかったが、以後は抑制され、投与終了時には有意に抑制された。この抑制はこの期間中に認められた高い死亡率と関連があると考えられた。

回復期間中も、300ppm 群雌雄とも体重に明らかな改善はみられなかった。

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。

試験に供した全生存動物の摂餌量及び食餌効率の対照群に対する比率を次表に示す。

	投与後週	用量 (ppm) / 性別									
		雄					雌				
		0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300
摂餌量	1週				98	74				98	78
	2週				98	89				101	97
	1~89/90週		99	98	103	97		101	101	101	98
	回復期間 53~65週		99	94	90	97		101	94	102	101
食餌 効率	1週					56					56
	2週					100					96
	1~14週		98	99	99	97		102	99	101	97

統計学的解析は実施していない

摂餌量は投与 1 週に、300ppm 群雌雄で対照群より少なく、雄ではこの減少が投与 2 週も持続していた。しかし、総摂餌量はいずれの投与群とも対照群とほぼ同等であった。回復期間中の摂餌量にも投与の影響はなかった。

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

食餌効率は投与 1 週に、300ppm 群雌雄で対照群に比べて著明に低下したが、それ以降は差がなかった。

他の投与群の飼料効率は投与 14 週後まで対照群と差がなかった。

検体摂取量：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。

投与群 (ppm)	0.5	1.5	30	300
雄 (mg/kg/日)	0.019	0.059	1.27	12.68
雌 (mg/kg/日)	0.025	0.078	1.61	16.75

血液学的検査：次表に示す時期に各群雌雄各 10 匹を対象として 24 時間絶食後、眼窩後静脈叢から採取し、以下の項目の測定を行った。回復群は*印の項目のみ検査した。

	検査時期	検査動物数
慢性毒性群	投与 25 及び 51 週	雌雄各 10 匹
発がん性群	投与 77 及び 89 (雄) あるいは 91 (雌) 週	
回復群	回復 13 週	

赤血球数*、白血球数、血液像 [好中球、リンパ球、好酸球、好塩基球、単球及び非染色巨大細胞]、血小板数、ヘモグロビン量*、ヘマトクリット値*、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)*、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、網状赤血球数、プロトロンビン時間*、血液塗末

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。

300ppm 群は、雌雄とも対照群に比べて一般にヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度及び赤血球数の減少、時に平均赤血球血色素量 (MCH) 及び平均赤血球容積 (MCV) の減少も認められた。30ppm 群でもより軽度で同様の影響がみられ、1.5ppm 群も時に同じ傾向を示す場合がみられた。回復 13 週ではこれらの影響は認められず、回復が認められた。これら検査値の低下は、チロキシン低下により貧血が発現することがあるので、甲状腺ホルモンの低下に関連した所見と考えられた (Ganong, 1989)。プロトロンビン時間が 300ppm 群の雌では対照群に比べて一般に軽度に短縮した。この影響は、30ppm 群の雌でも数回、明らかに認められたが、77 週では用量関連性のある著明な群間差は認められず、91 週では対照群と差が認められなかった。又、回復 13 週も対照群に比べて短いままであった。0.5 及び 1.5ppm 群で 77 週に有意な減少が認められたが、用量関連性もなく、51 及び 91 週で対照群と差が認められなかったことから、投与に関連のない偶発的な変動と考えられた。

300ppm 群と 30ppm 群の雄で血小板数の増加傾向が 77 及び 89 週に認められた。

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

群間差が認められた項目は他にもあったが、検査時点間で一貫性がなかったり、発現がいずれかの性に偏っていたり、傾向や用量に関連した変化が認められなかったため、投与関連性はないと考えられた。

血液塗末標本の検査で、投与関連性の異常は認められなかった。

血液学的検査値の対照群に対する比率%

群	経過週	性別 用量 (ppm)	雄				雌			
			0.5	1.5	30	300	0.5	1.5	30	300
慢性 毒性 群	25 週	ヘマトクリット値				93↓				93↓
		ヘモグロビン濃度				93↓				95↓
		赤血球数		96↓	96↓	95↓				
		MCV								94↓
		MCH								95↓
		総白血球数		84↓						
		好中球数					60↓	67↓		
		プロトロンビン時間	104↑			96↓	103↑	97↓	95↓	
	51 週	ヘマトクリット値				91↓		96↓	93↓	89↓
		ヘモグロビン濃度				93↓			96↓	90↓
		赤血球数				95↓				
		MCHC							103↑	
		MCV					96↓	96↓	91↓	
		MCH							90↓	
好中球数	67↓									
プロトロンビン時間								90↓		
回復 群	回復 13 週	ヘマトクリット値					104↑			
		ヘモグロビン濃度					105↑			
		プロトロンビン時間	106↑						96↓	95↓
発がん 性群	77 週	ヘマトクリット値		89↓	87↓	89↓				91↓
		ヘモグロビン濃度			86↓	89↓				91↓
		赤血球数			88↓					
		MCV				94↓				
		MCH				94↓				
		好中球数							232↑	
		リンパ球			125↑	129↑				
		血小板数			124↑	120↑	124↑			140↑
	プロトロンビン時間					92↓	95↓	91↓	90↓	
	89/91 週	ヘマトクリット値				89↓				
		ヘモグロビン濃度				88↓				
		MCHC		97↓						97↓
		リンパ球		135↑		137↑				
		血小板数			129↑	146↑	123↑			
プロトロンビン時間		108↑	107↑							

統計学的手法: Student t 検定 ↑↓: p<0.05 ↑↓: p<0.01 ↑↓: p<0.001

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。

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

血液生化学的検査：血液学的検査で使用了血液と同時に採血した血液から得られた血漿を用いて、以下の項目の測定を行った。回復群は*印の項目のみ検査した。

アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT/GPT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST/GOT)、アルカリホスファターゼ (ALP)、クレアチンホスホキナーゼ活性 (CPK)、総蛋白*、蛋白分画*、グルコース、コレステロール*、ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、電解質* (ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン)

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。

血液生化学的検査値の対照群に対する比率%

群	経過週	性別 用量 (ppm)	雄				雌				
			0.5	1.5	30	300	0.5	1.5	30	300	
慢性毒性群	25週	AST CPK 尿素 グルコース クレアチニン ビリルビン* コレステロール 総蛋白 アルブミン α ₁ -グロブリン α ₂ -グロブリン β-グロブリン δ-グロブリン* A/G 比 ナトリウム 塩素 カルシウム 無機リン	81↓		118↑	70↓		50↓	86↓ 50↓	86↓ 50↓	67↓
	51週	AIP ALT AST 尿素 クレアチニン ビリルビン* コレステロール 総蛋白 α ₁ -グロブリン α ₂ -グロブリン β-グロブリン A/G 比 ナトリウム 塩素 無機リン カリウム カルシウム	83↓	44↓ 101↑	45↓ 101↑	44↓ 104↑	154↑ 106↑	125↑ 125↑	125↑ 120↑ 108↑	125↑ 120↑ 136↑	61↓ 203↑ 111↑ 150↑ 160↑ 80↓ 97↓ 88↓ 88↓ 91↓ 104↑
回復群	回復 13週	コレステロール 総蛋白 アルブミン α ₁ -グロブリン α ₂ -グロブリン β-グロブリン δ-グロブリン A/G 比 塩素 カルシウム			86↓ 119↑			83↓	81↓	198↑ 105↑ 164↑ 133↑ 81↓ 67↓ 97↓ 104↑	

統計学的手法: Student t 検定。ただし、*印は Mann-Whitney U-検定

↑↓: p<0.05 ↑↓: p<0.01 ↑↓: p<0.001

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。

血液生化学的検査値の対照群に対する比率 (つづき)

群	投与群 (ppm)		雄				雌			
			0.5	1.5	30	300	0.5	1.5	30	300
発がん性群	77 週	AIP					65↓		71↓	59↓
		ALT		56↓	51↓	53↓	64↓			47↓
		AST			74↓	69↓			61↓	52↓
		CPK					72↓	60↓		72↓
		尿素								180↑
		グルコース					85↓			
		コレステロール				143↑	178↑		178↑	240↑
		総蛋白								113↑
		アルブミン	86↓	86↓	86↓	83↓				86↓
		α ₁ -グロブリン	121↑	121↑	136↑	136↑				154↑
		α ₂ -グロブリン			125↑	150↑			120↑	140↑
		β-グロブリン								125↑
		δ-グロブリン		67↓	67↓	67↓				
		A/G 比	86↓	86↓	86↓	71↓				67↓
	ナトリウム	101↑			101↑					
	塩素		103↑			95↓			96↓	
	カリウム						91↓	91↓	91↓	
	カルシウム			108↑					107↑	
	89/91 週	AIP					57↓		57↓	68↓
		ALT				36↓				
		CPK	44↓							156↑
		尿素			271↑					138↑
クレアチニン				233↑					140↑	
ビリルビン					50↓					
コレステロール								162↑	161↑	
総蛋白									106↑	
アルブミン			87↓	77↓	74↓			79↓	79↓	
α ₁ -グロブリン				124↑	135↑		136↑	164↑	150↑	
α ₂ -グロブリン					120↑			114↑	129↑	
β-グロブリン									116↑	
δ-グロブリン		200↑								
A/G 比			86↓	71↓	71↓		78↓	67↓	67↓	
ナトリウム				102↑						
塩素		102↑				96↓	96↓			
無機リン			120↑	127↑						
カリウム						82↓	85↓			
カルシウム								104↑		

統計学的手法: Student t 検定 ↑↓: p<0.05 ↑↓: p<0.01 ↑↓: p<0.001
 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。

毒性学的に意義があると考えられる変化として、特に雌でコレステロール、カルシウム及び総蛋白の上昇、アルブミンの低下とグロブリン上昇に伴う A/G 比の低下が認められた。

300ppm 群は雌雄ともにほとんどの検査時点でこれら変化が全て認められた。

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

30ppm 群では、コレステロールに時に影響がみられ、カルシウムは 25 週にのみ影響が認められた。また、300ppm 群で認められた所見と同様の蛋白の変化が投与期間中に認められた。

1.5ppm 群では、変化の程度は軽いが 300ppm 群で認められた蛋白の変化が 77 及び 89 週に認められた。

0.5ppm 群の雄も 77 週に同様の蛋白の変化を示したが、他の検査時点では認められなかったため、投与関連性はないと考えられた。

他に、アルカリフォスファターゼ(雌)、アミノトランスフェラーゼ(雌雄)活性の一般的な軽度低下、ビリルビン(雄)の低下、77 及び 91 週の雌の尿素の上昇及び電解質濃度のわずかな変動などの各種変化が認められたが、毒性学的意義はないと考えられた。

回復群において、300ppm 群の雌では、回復 13 週でもコレステロール及びカルシウムの上昇、 α -グロブリン上昇及びそれに伴う総蛋白の上昇と A/G 比の低下が認められた。それ以外の投与群では、同様の所見は認められなかった。

甲状腺ホルモンの測定：投与 2、5、13、25 及び 51 週及び回復 3、5、8 及び 12 週に雌雄各 10 匹の後眼窩洞から採血し、以下の項目について測定した。

トリヨードチロニン濃度(T_3)、チロキシン濃度(T_4)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)

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。

300ppm 群雌雄及び 30ppm 群雄では、甲状腺重量増加を伴い血中甲状腺刺激ホルモン(TSH)濃度の上昇が認められた。全投与群でチロキシン(T_4)濃度の低下が用量関連性をもって認められ、300ppm 群雌雄の 2 週では T_4 が検出されなかった。 T_4 よりも生理活性が強いトリヨードチロニン(T_3)濃度に影響がみられたのは 300ppm 群の雄の投与 2 週のみで、その他の 1.5 あるいは 30ppm 群の増加は用量関連性もなく投与の影響はないと考えられた。これら変化は投与により誘発された肝薬物代謝酵素活性亢進により甲状腺ホルモン代謝が二次的に亢進したためと考えられた。その結果、血中ホルモン濃度が低下したため下垂体フィードバック機序により、血中への TSH 放出量が持続的に増加し、甲状腺酵素活性亢進に至ったと考えられた。

1.5 及び 0.5ppm 群では T_3 及び TSH の有意な上昇は認められなかった。0.5ppm 群において、 T_4 は投与 5 及び 25 週の雄、5 及び 13 週の雌で有意な低下が認められたのみで、散発的かつ可逆的であり、対照群の変動が大きかったために生じた変動であると考えられた。

投与中止後、300ppm 群の雌及び 30ppm 群の雄では TSH 濃度が直ちに回復した。回復期間中に、TSH 濃度と甲状腺ホルモン濃度はいずれの群でも正常に回復したが、300ppm 群の雄の TSH 濃度は回復途上にあった。

甲状腺ホルモンの測定値の対照群に対する比率

用量 (ppm)			雄				雌				
			0.5	1.5	30	300	0.5	1.5	30	300	
回復群	投与期間	2週	T ₃ T ₄ TSH		76↓ 151	40↓ 251↑	87↓ 0↓ 432↑			54↓ 103	0↓ 217↑
		5週	T ₃ T ₄ TSH	86↓	82↓ 125	59↓ 215↑	12↓ 440↑	82↓	78↓ 87	48↓ 103	26↓ 197↑
		13週	T ₃ T ₄ TSH		76↓ 102	120↑ 68↓ 107	24↓ 323↑	79↓	79 ↓ 85	57↓ 103	30↓ 256↑
		25週	T ₃ T ₄ TSH	83↓	73 ↓ 96	53↓ 119	17↓ 292↑		122↑		51↓ 206↑
		51週	T ₃ T ₄ TSH		120↑ 81↓ 95	117↑ 66↓ 205↑	35↓ 441↑			62↓ 98	42↓ 218↑
	回復期間	3週	T ₃ T ₄ TSH			77↓	64↓ 176↑				
		5週	T ₃ T ₄ TSH	84↓	68↓	64↓	78↓ 193↑				128↑
		8週	T ₃ T ₄ TSH		77↓	70↓	154↑		79↓	121↑	131↑
		12週	T ₃ T ₄ TSH				221↑	122.0↑		127↑ 124↑	148↑

統計学的手法: Student t 検定 ↑↓: p<0.05 ↓↑: p<0.01 ↑↓: p<0.001

* 300ppm 群雌雄で標準偏差が0であったので、Mann-Whitney U-検定で比較した。

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。

尿検査: 次表に示す時期に各群雌雄各 10 匹を対象として採取した尿について、以下の項目を検査した。回復群は*印の項目のみ検査した。

	検査時期	検査動物数
慢性毒性群	投与 24 及び 50 週	雌雄各 10 匹
発がん性群	投与 76 及び 87 (雄) あるいは 90 (雌) 週	
回復群	回復 7 及び 12 週	

外観*、比重、尿量*、pH*、蛋白*、グルコース、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン、潜血、沈渣、総還元物質、亜硝酸塩

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	投与群 (ppm)		雄				雌			
			0.5	1.5	30	300	0.5	1.5	30	300
慢性 毒性 群	24 週	pH								97↓
		比重			102↑					
	50 週	pH						95↓		94↓
		蛋白			175	330				250↑
発がん性 群	76 週	尿量							156↑	
		pH	94↓		94↓	95↓				
	87 週	尿量			184↑	174↑				
		pH			95↓	95↓				
		比重			99↓	99↓				
	90 週	蛋白								143↑
回復 群	7 週	pH			94↓	92↓				95↓
		蛋白						339↑	339↑	
	12 週	pH	97↓		92↓	94↓				95↓

統計学的手法: Student

t検定 ↑↓: p<0.05 ↑↓: p<0.01 ↓: p<0.001

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。

300ppm 群の尿 pH は投与期間中、対照群に比べて軽度低値(わずかに酸性)を示した。30ppm 群雄も試験後半に pH 低下を示した。特に、投与期間の前半ではほとんどの場合、300ppm 群の雌雄で蛋白濃度が対照群に比べて高い傾向を示した。同様の蛋白濃度上昇傾向は 30ppm 群の雄でも認められた。30 及び 300ppm 群の雄では、投与 88 週後に尿量増加を伴う比重低下が認められた。

30ppm 群の雄と 300ppm 群の雌雄では、投与中止後も依然として尿 pH 低下が、これらの群の雌雄とも、対照群に比べて多数の動物で尿蛋白濃度の上昇が認められた。

眼科学的検査: 投与開始前は全動物、投与 51 週に慢性毒性群及び回復群の対照群と 300ppm 群について、又発がん性群の対照群と 300ppm 群について雄は 88 週、雌は 91 週に以下について検査した。

眼瞼及びその周辺、結膜、角膜及び強膜、前眼房及び虹彩、水晶体及び硝子体、眼底

投与に起因すると考えられる特記すべき所見は認められなかった。

臓器重量: 試験終了時(慢性毒性群:投与 52 週、回復群:回復 13 週後、発がん性群:雄 89 週、雌 91 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、下垂体、胸腺、甲状腺(上皮小体を含む)、脳、立腺、心臓、脾臓、腎臓、肝臓、肺(主気管支を含む)、精巣、卵巢、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。

臓器重量の対照群に対する比率%

群	臓器		性別/投与群 (ppm)							
			雄				雌			
			0.5	1.5	30	300	0.5	1.5	30	300
慢性毒性群	体重				95	91			96	93
	心臓	対体重比								113↑
	肝臓	重量				137↑				143↑
		対体重比			122↑	149↑			121↑	154↑
	卵巣	重量							69↓	
	前立腺	対体重比				142↑				
	子宮	対体重比								128↑
	甲状腺	重量				144↑				167↑
対体重比				123↑	155↑			124↑	181↑	
回復群	体重					77↓				78
	脳	重量								96↓
	副腎	対体重比								132↑
	心臓	対体重比				118↑				120↑
	腎臓	対体重比								140↑
	肝臓	重量				130↑			111↑	137↑
		対体重比								
	肺	重量				92↓				
		対体重比								123↑
	前立腺	重量		133↑						
	脾臓	対体重比			129↑				84↓	
	精巣	対体重比				130↑				
甲状腺	対体重比				149↑				136↑	
発がん性群	体重		117↑	110	94	85↓				83↓
	脳	対体重比	84↓			114↑			123↑	131↑
	副腎	重量				147↑				
		対体重比			144↑	180↑			139↑	159↑
	心臓	重量	116↑			119↑	123↑			124↑
		対体重比			119↑	123↑			124↑	134↑
	腎臓	重量			135↑	156↑				
		対体重比			155↑	184↑	116↑		169↑	156↑
	肝臓	重量			120	139↑				121↑
		対体重比			133↑	164↑			132↑	158↑
	肺	対体重比	87↓			119↑			123↑	133↑
	脾臓	重量	158↑	126↑		127↑				
対体重比					150↑	124↑		131↑	133↑	
甲状腺	重量	121↑	126↑	150↑	224↑			122	200↑	
	対体重比	106	114	167↑	263↑			150↑	260↑	
胸腺	重量								66↓	
子宮	重量								125↑	
	対体重比								159↑	

統計学的方法: Behrens-Fisher または Dunnett 検定 ↑↓: p<0.05 ↓↓: p<0.01

数字は対照群に対する変動率(%)

慢性毒性及び発がん性群において、300ppm 群の雌雄は肝臓及び甲状腺の重量及び対体重比が対照群に比べて統計学的に有意に増加した。30ppm 群でもこれらの臓器は同様の傾向にあったが、重量では統計学的有意差を示さない場合もあった。

発がん性群において、30 及び 300ppm 群では、腎臓、副腎及び脾臓の重量あるいは対体重比が対照群に比べて高値を示したが、脾臓の 30ppm 群雄は対照群と差は認められ

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

なかった。脾臓及び副腎重量増加には関連する組織学的所見がみられず、毒性学的に意義はないと考えられた。

他の変化は時に対照群に比べて統計学的有意差を示す場合もあったが、いずれも群間における体重差を反映した結果であると考えられた。

回復群において、300ppm 群の雌雄で多くの臓器で対体重比の有意な増加が認められたが、体重が対照群より低値であることに起因していると考えられた。

肉眼的病理検査：途中死亡、切迫屠殺、中間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。

慢性毒性群における主要な肉眼的所見を次表に示す。

慢性毒性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	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300
死亡/切迫殺例											
検査動物数		3	1	1	0	3	1	1	1	1	2
腎臓	肥大					2			1		
肝臓	肥大	2				3					
最終屠殺例											
検査動物数		12	14	14	15	12	14	14	14	14	13
腎臓	肥大	1		3	1						
肝臓	肥大					4					1
	腫大	1		3	3	2	1	1			2
甲状腺	肥大				1	1					

空欄は所見なし

52 週後に屠殺した慢性毒性群において、肝臓肥大が 300ppm 群の死亡/切迫殺 3/3 例、最終屠殺例の雄 4/12 例と雌 1/13 例で認められた。甲状腺肥大は 30 及び 300ppm 群の雄で各 1 例のみ最終屠殺例で認められた。これら以外に慢性毒性群において用量増に伴う変化と考えられる肉眼的異常はなかった。

回復群における主要な肉眼的所見を次表に示す。

回復期間後の検査では、腎臓肥大が 30ppm 群雄で 3/13 例、300ppm 群で 2/10 例に、
肝臓の肥大が 300ppm 群雄で 2/10 例に認められたものの、それまでの検体投与の影響
と考えられる明らかな肉眼的所見は認められなかった。

回復群における主要な肉眼的所見 (空欄は所見なし)

臓器	所見	性別/用量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300
投与期間中の死亡切迫殺例											
検査動物数		0	0	0	1	2	1	2	0	0	1
肝臓	肥大				1	1					
	腫大				1		1				
回復期間中の死亡切迫殺例											
検査動物数		2	0	2	1	3	1	0	4	0	4
腎臓	肥大					1					
	腫大					1					
肝臓	肥大					1					
	腫大			1	1						
回復期間後の最終屠殺											
検査動物数		13	15	13	13	10	13	13	11	15	10
腎臓	肥大			1	3	2					
	腫大					2					
肝臓	肥大		1			2					1
	腫大	1	3	3				1		1	
甲状腺	肥大				1						

発がん性群における主要な肉眼的所見を次表に示す。

発がん性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	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300
死亡/切迫殺例											
検査動物数		30	36	28	30	38	27	29	29	37	28
副腎	肥大	5	8	8	8	20↑	14	16	13	15	18
	腫大										
腎臓	蒼白化	8	7	4	7	20↑	3	2	5	11	4
	顆粒化	10	10	8	13	20	5	6	6	17↑	6
	肥大	14	16	9	16	28↑	2	4	4	12↑	4
肝臓	肥大	4	9	5	11	16↑	2	3	3	1	7
	腫大	16	18	11	11	15	10	10	9	13	13
上皮小体	肥大	6	7	6	11	15	2	1	3	8	3
下垂体	腫瘤	6	9	10	6	15	17	22	21	24	14
皮膚	中度脱毛	14	9	13	13	14	22	17	22	25	15↓
	顔面汚染	14	23	20	18	28↑	14	20	16	26	13
甲状腺	肥大	2	3	1		11↑	1			1	1
子宮	腫瘤						4	2	0↓	1	1
その他	削瘦	8	5	8	5	13	8	9	11	16	1↓

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

臓器	所見	性別/用量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300
最終屠殺例											
検査動物数		20	14	22	20	12	23	21	21	13	22
副腎	肥大	2	1	2	3	4	7	12	12	8	10
腎臓	蒼白化		1	3	8↑	7↑		2		4↑	4↑
	顆粒化	2	1	4	8	8↑		1		4	4
	肥大	3	2	6	11↑	10↑		2		5↑	2
肝臓	肥大	1			3	6↑	1	1			3
	腫大	5	6	8	6	5	12	8	2↓	6	13
上皮小体	肥大				1					1	1
下垂体	腫瘤	7	3	6	9	3	14	14	14	8	11
皮膚	中度脱毛						17	12	12	5	12
	顔面汚染	4	7	13↑	7	6	3	3	3	2	6
	非特異的汚染	8	7	14	15	10↑	16	15	12	11	12
甲状腺	肥大			1	3	5↑	1			1	3
子宮	腫瘤							1	3	1	
腋下リンパ節	暗調化	1		1		1	5	2	1	1	0↓
その他	削瘦	1		1	4	2	1	1	1	1	3

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

発がん性群において、300ppm 群の雄では死亡/切迫殺及び最終屠殺共に対照群に比べて、腎臓の肥大、顆粒化及び(あるいは)蒼白化、ならびに肝臓、副腎及び甲状腺の肥大の増加が認められた。雌では死亡/切迫殺で肝臓の肥大及び甲状腺肥大が多い傾向にあった。30ppm 群では雄の最終屠殺で腎臓の肥大、顆粒化及び(あるいは)蒼白化が雄では最終屠殺で、雌では死亡/切迫殺及び最終屠殺共にこれらの所見が対照群に比べて高い発現率を示した。

他の所見はこの年齢と系統の動物において予想されたものであった。

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、さらに心臓、肝臓、腎臓はズダン染色して病理標本を作成し、以下のとおり検鏡した。

- i) 慢性毒性群及び発がん性群の対照群及び 300ppm 群の生存動物の全例及び全ての投与群の途中死亡動物の全例の臓器/組織。
- ii) 慢性毒性群及び発がん性群の 0.5、1.5 及び 30ppm 群の生存動物及び回復期間終了後の全生存動物の腎臓、肝臓、肺及び甲状腺並びに肉眼的異常部位。

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)、大腿骨及び骨髓、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、膺、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

非腫瘍性変化

認められた主要な非腫瘍性病変を表 1(慢性毒性群)、表 2(回復群)及び表 3(発がん性群)に示す。

毒性学的意義があると考えられる所見は腎臓の進行性(加齢性)腎症(次表)のみであった。その他の所見はこの年齢と系統の動物において普通に認められるものであった。

この腎症の発現率と程度は、慢性毒性群の 300ppm 群雌雄及び発がん性群の 30ppm 群及び 300ppm 群の雌雄で、対照群を上回り、特に雄で著明で重篤化していた。13 週間の回復期間後では 30 及び 300ppm 群の雌で対照群に比べて高く、1.5ppm 及びそれ以上の投与群では重篤化がみられた。

腎臓の進行性(加齢性)腎症の程度別発生頻度

群	所見	性別/用量(ppm)									
		雄					雌				
		0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300
慢性毒性群	検査動物数	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	軽微	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
	軽度	4	1	1	3	7	2	4	2	2	4
	中等度	1	1	3	4	3	1	1	1	4	3
	高度	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	重度	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
	合計	6	3	5	7	11	4	6	4	6	8
回復群	検査動物数	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	軽微	4	4	3	1	2	4	3	3	3	3
	軽度	4	2	2	1	3	0	1	2	4	3
	中等度	0	1	3	4	4	1	0	1	4	3
	高度	0	0	1	1	0	0	0	1	0	2
	重度	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	合計	8	7	9	8	9	5	4	7	11	13↑
発がん性群	検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	軽微	2	2	1	2	0	0	5	1	2	4
	軽度	8	10	12	10	10	7	6	5	5	8
	中等度	7	8	11	10	10	2	7	8	10	5
	高度	7	10	8	19	19	5	3	3	13	7
	重度	0	0	0	1	5	0	0	0	1	0
	合計	26	28	32	42↑	44↑	14	21	17	31↑	24

統計学的手法: Fisher 直接確率検定 ↑: p<0.01 ↑↑: p<0.001

腫瘍性変化

認められた主要な腫瘍性病変を表 4(慢性毒性群)、表 5(回復群)及び表 6(発がん性群)に示す。

投与関連性と考えられる腫瘍性所見は甲状腺濾胞細胞腫瘍のみであった。この病変の本試験における発生率と歴史的背景データとの比較を次表に示す。

甲状腺濾胞細胞腫瘍の発現率

投与群 (ppm)	雄					雌				
	0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300
発がん性群										
検査動物数	49	48	50	50	50	50	50	50	50	50
濾胞細胞癌(悪性)	0	0	0	0	5↑	0	1	0	1	2
濾胞細胞腺腫(良性)	0	1	5↑	3	12↑	0	0	0	0	8↑
濾胞細胞腫瘍総数	0	1	5↑	3	17↑	0	1	0	1	10↑
歴史的背景データ (1987年6月～1989年9月までの7試験)										
検査動物数	359					365				
濾胞細胞癌(悪性)	4(平均 1.1%; 範囲 0.0～6.0%)					6(平均 1.6%; 範囲 0.0～10.0%)				
濾胞細胞腺腫(良性)	22(平均 6.1%; 範囲 2.0～10.0%)					5(平均 1.4%; 範囲 0.0～4.0%)				
濾胞細胞腫瘍総数	26(平均 7.2%; 範囲 3.6～16.0%)					10(平均 2.7%; 範囲 0.0～12.0%)				

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

発がん性群において、300ppm 群雌雄で良性濾胞細胞腺腫が、また 300ppm 群雄では悪性濾胞細胞癌が対照群に比べて統計学的に有意に高い発生率を示した。1.5ppm 群の雄でも濾胞細胞腫瘍の発生が有意に高かったが、その発生率は濾胞細胞腫瘍総数を含め歴史的背景データの範囲内にあった。この甲状腺濾胞細胞腫瘍の発生は高濃度の TSH による連続刺激のためと考えられた。

この他に投与に関連すると考えられる腫瘍の発生はなかった。

慢性毒性群では、投与に関連すると考えられる腫瘍の発生はなかった。

以上の結果から、本剤のラットに対する混餌投与による慢性毒性(52 週間)及び発がん性併合試験を行った結果、78 週時の生存率は 50%以上であったが、それ以降、急速に生存率が低下したので、雄は 89 週、雌は 91 週時に最終屠殺した。最終屠殺時の生存率に有意な群間差は認められなかった。

300ppm 群では特に投与 1 週に摂餌量及び食餌効率の低下を伴い顕著な体重の低下が認められた。中枢神経系への関与が示唆される痙攣、興奮、発声、攻撃的行動及び流涎が認められたが、神経組織に病理組織学的変化はみられなかった。

30ppm 群でも初期の体重の抑制が認められ、雌では試験終了時の体重にも抑制がみられた。又、300ppm 群より軽度の一般状態の変化が同様に認められた。

1.5ppm 群でも痙攣、興奮、発声等の軽度の一般状態の変化が認められた。

300ppm 群は、雌雄とも一般にヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度及び赤血球数の減少、時に平均赤血球血色素量(MCH)及び平均赤血球容積(MCV)の減少も認められた。血中蛋白の変動(蛋白の増加、アルブミンの減少、グロブリンの増加を伴い A/G 比の低下)、コレステロールの増加がみられ、用量に関連した肝臓の重量増加及び肥大がみられ、肝機能障害が示唆された。さらに、雌ではプロトロンビン時間が軽度に短縮した。30ppm 群ではより軽度で同様

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

の影響がみられ、1.5ppm 群も時に同じ傾向を示す場合(蛋白の変動)がみられた。これら肝臓の変化は生体異物に対して一般にみられる代謝的適応反応と判断される。

30ppm 群及び 300ppm 群の動物では腎臓の重量増加、肉眼的肥大及び蒼白化が認められ、慢性進行性腎症の発生率の増加及び症状の増悪、尿蛋白排泄増加、及び尿 pH 低下もみられた。

30ppm 群及び 300ppm 群では、血中甲状腺刺激ホルモン(TSH)濃度上昇を伴った甲状腺重量増加が認められた。1.5ppm 以上の群でチロキシン(T_4)濃度の低下が認められた。300ppm 群雄の投与1週間後のみトリヨードチロニン(T_3)濃度に影響がみられた。これら変化は投与により誘発された肝薬物代謝酵素活性亢進により甲状腺ホルモン代謝が二次的に亢進し、血中ホルモン濃度が低下したため下垂体に対するフィードバック機序により、血中への TSH 放出量が持続的に増加し、甲状腺活性亢進に至り、濾胞細胞腫瘍の増加がみられた^{申請者注}。

52 週間投与後、13 週間回復期間中に、300ppm を除く群では投与の影響は回復したが、300ppm 群では体重の抑制(雌雄)、プロトンピン時間の短縮(雌)、蛋白の変動(雌)、TSH 濃度(雄)は回復途上にあった。

したがって、フィプロニルを 300ppm までの混餌濃度でラットに投与した結果、無毒性量は(NOEL)は 0.5ppm(雄 0.02 mg/kg/日、雌 0.03 mg/kg/日)と判断する。300ppm 群で甲状腺濾胞細胞腫瘍が認められ、これは甲状腺刺激ホルモン濃度上昇による二次的な非遺伝毒性的機序であると判断される。なお、ヒト甲状腺に比べてラットの甲状腺は甲状腺ホルモン障害に対して特に感受性が高いので、本試験で認められた甲状腺に対するこれら作用と、高濃度群における濾胞細胞腫瘍の発現率増加は、ヒトがこの物質に暴露した場合の危険性を意味するものではないと判断される。

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、雌雄とも投与1週で体重増加量の抑制、ならびに数個体で痙攣や活動亢進などの神経症状が認められた。30 ppm 群でも同様に、投与1週で雌雄に体重増加量の抑制、また雌のみで痙攣および発声が認められたが、一般症状については雌 1/80 例かつ投与1週のみの変化であり、体重増加量についても軽微な変化であった。加えて、別途実施した2つの急性神経毒性試験(資料 12 および 13)では、総合的な無毒性量が 2.5 mg/kg と判断されることから、30 ppm(雄 1.3 mg/kg、雌 1.6 mg/kg)で認められたこれらの変化は、単回経口投与等により生じる可能性はないものと考えられる。従って無毒性量は、雌雄とも 30 ppm(雄 1.3 mg/kg、雌 1.6 mg/kg)と判断された。

また、甲状腺ホルモンの変動が投与初期に認められたが、2 週間反復投与の結果であり、加えて、甲状腺に対するこれらの影響はラットにおいてより感受性が高く、ヒトへの外挿性に乏しいメカニズムであると示唆されることから、これら甲状腺ホルモン単独の変動を急性参照用量(ARfD)設定のエンドポイントとすることは適切でないと判断する。

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(甲状腺ホルモンへの影響について) :

残留農薬安全性評価委員会から、「ラットを用いた慢性毒性/発がん性併合試験及び 28 日間混餌投与試験を合わせた甲状腺ホルモンへの影響の考察」のコメントがあり、下記のように回答した。

回答の要旨

ラット併合試験の回復試験群で測定した甲状腺ホルモン T4 の変動について考察した。Student t 検定及び Mann-Whitney 検定の両検定で有意な低下が認められたのは最低用量の 0.5ppm 群では雄で投与 4 週目、雌では投与 12 週目のみであり、その程度もわずかであり ($p < 0.05$)、散発的かつ可逆的であった。投与量と甲状腺ホルモン変動を解析した結果、0.5ppm 群と対照群の T4 値の変動幅がほぼ重なり、0.5ppm 付近を閾値とみなすことが出来ると考えられる。

次に、この甲状腺ホルモンへの無影響量を確認するため、ラットを用いた 4 週間反復投与試験結果 (資料 42) を考察した。甲状腺ホルモンの血中濃度は日内変動を受けやすく、特に午前中の変動は大きいことが知られていたため、T4 の測定は照明点灯 8 時間目の午後に変更されている。このことから、本剤の甲状腺ホルモンに及ぼす影響を把握し、その閾値を求めるのに適切な試験であると考えられた。その結果、1.0ppm が甲状腺ホルモンへの無影響量であることが示された。

なお、JMPR 1993 の報告によれば、他の農薬 (プロピネブ) について、甲状腺機能の無影響量を求める短期試験の妥当性が報告されている。

以上より、併合試験における T4 無影響量は 0.5ppm 付近であること、4 週間の反復投与試験の T4 の無影響量は 1.0ppm であることを考慮すれば、本併合試験 (資料 21) の無作用量 (抄録では無毒性量と記載) は 0.5ppm とみなすことが出来るものと考えられる。

また、T4 の変動に関する作用機序が解明されていること (資料 40-43)、かつ本機序がラットに特異的であることを考慮すれば、ラットでの T4 の低下が直ちにヒトへの危険性を意味するものではないと考えられる。

表1 慢性毒性群における主要な非腫瘍性所見

臓器	所見	性別/用量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300
死亡/切迫殺例											
	検査例数	3	1	1	0	3	1	1	1	1	2
腎臓	進行性(加齢性)腎症	1				2		1	1		1
肝臓	小葉周辺性肝細胞肥大 小葉周辺性肝細胞脂肪 性空胞化	1									1
上皮小体	過形成	1		1		1	1		1		
甲状腺	コルク 鈣質沈着 濾胞囊胞/生育異常 濾胞過形成	1				1		1			
最終屠殺例											
	検査例数	12	14	14	15	12	14	14	14	14	13
腎臓	進行性(加齢性)腎症	5	3	5	7	9	4	5	3	6	7
肝臓	小葉周辺性肝細胞肥大 小葉周辺性肝細胞脂肪 性空胞化	1		1	1	4	1				1
		1	1		3	4			1		
上皮小体	過形成	4	1	0↓	0↓	2	2				2
甲状腺	コルク 鈣質沈着 濾胞肥大 濾胞囊胞/生育異常 濾胞過形成	5 1 3	0↓	1 3	2 4	6 1 2 1				1	3 2 2
合計											
	検査例数	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
腎臓	進行性(加齢性)腎症	6	3	5	7	11	4	6	4	6	8
肝臓	小葉周辺性肝細胞肥大 小葉周辺性肝細胞脂肪 性空胞化	1 2		1	1 3	4 4	1		1		2
上皮小体	過形成	5	1	1	0	3	3		1		2
甲状腺	コルク 鈣質沈着 濾胞肥大 濾胞囊胞/生育異常 濾胞過形成	5 1 3	0	1 3	2 4	7 1 3 1			1		3 2 2

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

表 2 回復群における主要な非腫瘍性所見

臓器	所見	性別/用量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300
死亡/切迫殺例											
	検査例数	0	0	0	1	2	1	2	0	0	1
副腎	皮質出血性変性							1			
肝臓	汎細葉性肝細胞脂肪性空胞化				1						
肺	肺胞マクロファージ集簇				1						
回復期間中の死亡/切迫殺例											
	検査例数	2	0	2	1	3	1	0	4	0	4
副腎	皮質出血性変性						1	0	3	0	2
腎臓	進行性(加齢性)腎症	1		2		3			2		4
肝臓	汎細葉性肝細胞脂肪性空胞化			1		2	1				2
肺	肺胞マクロファージ集簇	1		1		1					2
回復 13 週後最終屠殺例											
	検査例数	13	15	13	13	10	13	13	11	15	10
腎臓	進行性(加齢性)腎症	7	7	7	8	6	5	4	5	11	9†
肝臓	小葉周辺性肝細胞脂肪性空胞化	2	1	2	1	4				1	1
肺	肺胞マクロファージ集簇			1	3	1				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供試動物数と同じ。空欄は発生なし。

統計学的方法：Fisher の直接確率検定： †: p<0.05

表 3-1 発がん性群における主要な非腫瘍性所見

臓器	所見	性別/用量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300
死亡/切迫殺例/検査例数		30	36	28	30	38	27	29	29	37	28
副腎	皮質脂肪性空胞化	5	5	6	8	7	2	2	3	8	2
	皮質出血性変性	3		3		3	19	18	20	20	19
	限局性髄質過形成	3	2	4	1	5	2	3	1	1	
大動脈	鉍質沈着	2	5	4	5	11↑	1	2	2	5	1
脳	下垂体肥大による圧迫	4	2	2	1	3	3	9	12↑	5	6
腎臓	進行性(加齢性)腎症	18	17	15	25	33↑	8	9	12	22↑	12
肝臓	小葉周辺性肝細胞肥大		1					1			1
	小葉周辺性肝細胞脂肪性空胞化	4	7	1	6	3	1	1	1		1
	小葉中心性肝細胞脂肪性空胞化	3	3	1	2	2	6	8	13	8	11
	限局性嚢胞性変性	4	6	5	3	9	1		1	1	2
	好塩基性肝細胞変性	2	1		1	2			2	3	2
肺	肺泡マクロファージ集簇	1	3	2	2	3	2	2	4	3	5
乳腺	乳瘤						2	5	3	3	2
卵巣	濾胞嚢胞						1	8↑	6	5	4
脾臓	動脈炎	1	8↑	2	3	7	1		2	8	
	間質脂肪浸潤	2	3	4	1	1		3	4	1	
上皮小体	過形成	6	8	7	7	15	2	2	2	6	4
下垂体	限局性過形成 4	4	4		2	1	1	3	3		4
脾臓	ヘミンリン沈着	1	3	2	3	3	4	4	9	12	6
精巣	精細管上皮変性	6	7	7	5	10					
	硝子様変性随伴動脈炎	5	7	3	8	15					
	精細管鉍質沈着	4	1	4	5	7					
甲状腺	コイト鉍質沈着	1									
	濾胞肥大		1							1	
	濾胞嚢胞/生育異常	2	2		2	4				3	3
	限局性傍濾胞細胞過形成		2	1	1		1	1		3	
	濾胞過形成					2					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。

統計学的方法：Fisher の直接確率検定： ↑： p<0.05

表 3-2 発がん性群における主要な非腫瘍性所見

臓器	所見	性別/用量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300
最終層殺例											
副腎	検査動物数	20	1	3	4	12	23	13	15	11	22
	皮質脂肪性空胞化	2			1	2	1	3	4		3
	皮質出血性変性	3					14	13	14	9	9
	限局性髓質過形成				1			1		1	
大動脈	検査動物数	20	0	0	1	12	0	0	0	0	0
	鉍質沈着				1						
脳	検査動物数	20	0	2	3	12	23	5	7	2	22
	下垂体肥大による圧迫	1		1	2		3	1	2	2	
腎臓	検査動物数	20	14	22	20	12	23	21	21	13	22
	進行性(加齢性)腎症	8	11↑	17↑	17↑	11↑	6	12	5	9↑	12
肝臓	検査動物数	20	14	22	20	12	23	21	21	13	22
	小葉周辺性肝細胞脂肪性空胞化	1	2	2	1	1	3		1	2	
	小葉中心性肝細胞脂肪性空胞化		2	1		1	8	3	7	1	6
	限局性嚢胞性変性	2	3	5	4	5			1		1
	好塩基性肝細胞変性			2	2	1	1	2	1	4↑	
肺	検査動物数	20	14	22	20	12	23	21	21	13	22
	肺泡マクロファージ集簇		1	8↑	7↑	1		2	1	2	4↑
乳腺	検査動物数						23	9	9	5	22
	乳瘤							8	4	3	4↑
卵巣	検査動物数						23	8	7	3	22
	濾胞嚢胞						3	1	2	3	7
脾臓	検査動物数	20	0	1	1	12	23	0	0	0	22
	動脈炎 間質脂肪浸潤				1 1	3↑					1
上皮小体	検査動物数	19	14	20	19	12	21	19	18	12	18
	過形成		5↑	5↑	7↑		1	4	2	4↑	3
下垂体	検査動物数	19	3	8	11	12	23	14	15	9	22
	限局性過形成	2	1		1	1	7		2		5
脾臓	検査動物数	20	3	5	5	12	23	3	1	1	22
	ヘモンリン沈着	1		2			1	1			3
精巣	検査動物数	20	2	3	7	12					
	精細管上皮変性	3		2	3	5					
	硝子様変性随伴動脈炎	3			3	2					
	精細管鉍質沈着			1	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。

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

表 3-3 発がん性群における主要な非腫瘍性所見

臓器	所見	性別/用量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300
最終屠殺例 (つづき)											
甲状腺	検査動物数	20	14	22	20	12	23	21	21	13	22
	濾胞嚢胞/生育異常		1		1					3↑	3
	限局性傍濾胞細胞過形成	1	2	1	2		1	2	2	2	5
	濾胞過形成				1						
全動物(死亡/切迫殺+最終屠殺)											
	検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
副腎	検査動物数	50	37	31	34	50	50	42	44	48	50
	皮質脂肪性空胞化	7	5	6	9	9	3	5	7	8	5
	皮質出血性変性	3		3		3	33	31	34	29	28
	限局性髓質過形成	3	2	4	2	5	2	4	1	2	
大動脈	検査動物数	50	36	27	31	50	50	28	29	37	50
	鈣質沈着	2	5	4	6	11↑	1	2	2	5	1
脳	検査動物数	50	36	30	33	50	50	34	36	39	50
	下垂体肥大による圧迫	5	2	3	3	3	6	10	14	7	6
腎臓	検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	進行性(加齢性)腎症	26	28	32	42↑	44↑	14	21	17	31↑	24
肝臓	検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	小葉周辺性肝細胞脂肪性空胞化	5	9	3	7	4	2	2	4	1	1
	小葉中心性肝細胞脂肪性空胞化	3	5	2	2	3	14	11	20	9	17
	限局性嚢胞性変性	6	9	10	7	14	1		2	1	3
	好塩基性肝細胞変性	2	1	2	3	3	1	2	3	7	2
肺	検査動物数	50	50	50	50	50	50	49	50	50	50
	肺泡マクロファージ集簇	1	4	10↑	9↑	4	2	4	5	5	9
乳腺	検査動物数	50	36	29	31	50	50	37	36	40	50
	乳瘤					1	2	13	7	6	6
卵巣	検査動物数						50	28	29	37	50
	濾胞嚢胞						4	9	8	8	11
脾臓	検査動物数	50	36	29	31	50	50	29	29	37	50
	動脈炎	1	8	2	4	7	1		2	8	1
	間質脂肪浸潤	2	3	4	2	4		3	4	1	
上皮小体	検査動物数	48	48	48	49	48	47	46	44	48	46
	過形成	6	13	12	14	15↑	3	6	4	10	7
下垂体	検査動物数	49	39	36	41	50	50	43	44	46	50
	限局性過形成	6	5		3	2	8	3	5		9
脾臓	検査動物数	50	39	33	35	50	50	32	30	38	50
	ヘモンリン沈着	2	3	2	5	3	5	5	9	12	9

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

表 3-4 発がん性群における主要な非腫瘍性所見

臓器	所見	性別/用量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300
全動物(死亡/切迫殺+最終屠殺)(つづき)											
精巣	検査動物数	50	38	31	37	50					
	精細管上皮変性	9	7	9	10	13					
	硝子様変性随伴動脈炎	8	7	3	11	17					
	精細管鉍質沈着	4	1	5	6	8					
甲状腺	検査動物数	49	48	50	50	50	50	50	50	50	50
	濾胞嚢胞/生育異常	2	3		3	4				6†	6†
	限局性傍濾胞細胞過形成	1	4	2	3		2	3	2	5	5
	濾胞過形成				1	2					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。

統計学的方法：Fisher の直接確率検定： †： p<0.05

表 4 慢性毒性群における腫瘍性病変

臓器	所見	性別/用量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300
途中死亡											
	検査例数	3	1	1	0	3	1	1	1	1	2
脳下垂体	腺腫(B)	1	0	0	-	0	0	1	0	0	0
脾臓	血管腫(B)	0	0	0	-	0	0	0	0	0	1
甲状腺	傍濾胞細胞腺腫(B)	0	0	0	-	1	0	0	0	0	0
造血組織	悪性リンパ腫(M)	1	0	0	-	0	0	0	0	0	0
乳腺	検査動物数	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	線維腺腫(B)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
骨格筋	検査動物数	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	骨肉腫(M)	0	-	-	-	-	1	-	-	-	-
皮膚	検査動物数	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	毛嚢上皮腫(B)	0	-	-	-	1	-	-	-	-	-
最終屠殺											
	検査例数	12	14	14	15	12	14	14	14	14	13
上皮小体	検査動物数	12	13	14	14	10	13	14	13	13	13
	腺腫(B)					1					
脳下垂体	検査動物数	12	1	1	1	12	14	6	2	2	13
	腺腫(B)	1	1	1	1		1	3	2†	1	
甲状腺	検査動物数	12	14	14	15	12	14	14	14	14	13
	濾胞細胞癌(M) 傍濾胞細胞腺腫(B)				1		1				
膀胱	検査動物数	12	0	0	0	12	14	0	0	0	13
	移行上皮乳頭腫(B)	1									
造血組織	検査動物数	12	0	0	0	12	14	0	0	0	13
	悪性リンパ腫(M)					1					
乳腺	検査動物数	0	0	1	0	0	1	3	2	2	0
	腺癌(M) 線維腺腫(B)						1	2	1	1	
皮膚	検査動物数	1	0	3	3	2	1	3	2	3	1
	乳頭腫(B)					1					

表 4 慢性毒性群における腫瘍性病変 (つづき)

臓器	所見	性別/用量 (ppm)										
		雄					雌					
		0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300	
全動物												
	検査例数	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	
上皮小体	検査動物数	12	13	14	14	10	13	14	13	13	13	
	腺腫 (B)					1						
脳下垂体	検査動物数	15	2	2	1	15	15	7	3	3	15	
	腺腫 (B)	2	1	1	1		1	4	2	1	0	
脾臓	検査動物数	15	1	1	0	15	15	1	1	1	15	
	血管腫 (B)										1	
甲状腺	検査動物数	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	
	濾胞細胞癌 (M) 傍濾胞細胞腺腫 (B)				1	1	1					
膀胱	検査動物数	15	0	0	0	15	15	0	0	0	15	
	移行上皮乳頭腫 (B)	1										
造血組織	検査動物数	15	1	1	0	15	15	1	1	0	15	
	悪性リンパ腫 (M)	1				1						
乳腺	検査動物数	1	0	1	0	0	2	3	2	2	0	
	腺癌 (M) 線維腺腫 (B)	1					1	2	1	1		
皮膚	検査動物数	2	0	3	3	3	1	3	2	3	1	
	乳頭腫 (B) 毛嚢上皮腫 (B)					1						
骨格筋	検査動物数	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
	骨肉腫 (M)						1					
検査動物数		15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	
合計	腫瘍数	良性	4	1	1	1	4	3	6	3	1	1
		悪性	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0
		腫瘍総数	5	1	0	2	5	4	6	4	2	1
	担腫瘍動物数	良性	4	1	1	1	3	3	5	3	1	1
		悪性	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0
		動物総数	5	1	0	1	4	4	5	4	2	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。(B)：良性 (M)：悪性
空欄は発生なし。

統計学的方法：Fisher の直接確率検定： †: p<0.05

表 5 回復群における腫瘍性病変

臓器	所見	性別/用量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300
投与期間中途中死亡											
	検査例数	0	0	0	1	2	1	2	0	0	1
脳下垂体	腺腫 (B)				1		0	0			
乳腺	線維腺腫 (B)						1	2			
皮膚	検査動物数	0	0	0	1	0	1	2	0	0	0
	線維肉腫 (M)				1						

表5 回復群における腫瘍性病変 (つづき)

臓器	所見	性別/用量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300
回復期間中死亡											
	検査例数	2	0	2	1	3	1	0	4	0	4
副腎	髄質褐色細胞腫 (B)	2									
脳下垂体	腺腫 (B)					1			1		
甲状腺	検査動物数	2	0	2	1	2	1	0	4	0	4
	濾胞細胞腺腫 (B)										1
子宮	検査動物数						1	0	4	0	4
	平滑筋腫 (B)										1
乳腺	検査動物数	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	腺癌 (M)								1		
その他	検査動物数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	癌 (M)										1
皮膚	検査動物数	1	0	0	0	2	0	0	2	0	1
	肉腫 (M)										1
回復期間終了後最終屠殺											
	検査例数	13	15	13	13	10	13	13	11	15	10
副腎	検査動物数	1	1	0	2	0	2	3	3	3	1
	皮質腺腫 (B)							1	1		
	髄質褐色細胞腫 (M)							1			
	髄質褐色細胞腫 (B)	0	1		1						
肝臓	肝細胞癌 (M)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
乳腺尾部	検査動物数	0	0	0	0	0	1	4	1	0	1
	線維腺腫 (B)							1			1
上皮小体	検査動物数	12	15	13	12	10	13	13	10	15	9
	腺腫 (B)						1				
脳下垂体	検査動物数	2	2	1	2	0	6	8	3	4	2
	腺腫 (B)	2	2	1	1		5	5	2	2	2
甲状腺	濾胞細胞癌 (M)				1	1					
	濾胞細胞腺腫 (B)					1			1		1
	傍濾胞細胞腺腫 (B)									1	
乳腺	検査動物数	0	1	0	1	0	3	3	3	3	0
	線維腺腫 (B)		1				1	2	3	3	
皮膚	検査動物数	3	2	2	6	4	4	3	3	4	0
	神経鞘腫 (M)			1		1					
	角化棘細胞腫 (B)			1	1						
	乳頭腫 (B)				1						
	線維腫 (B)	1			2						

表5 回復群における腫瘍性病変 (つづき)

臓器	所見	性別/用量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300

全動物

検査例数		15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
副腎	皮質腺腫 (B)							1	1			
	髓質褐色細胞腫 (M)							1				
	髓質褐色細胞腫 (B)	2	1		1							
肝臓	肝細胞癌 (M)		1									
乳腺尾部	線維腺腫 (B)							1				1
上皮小体	腺腫 (B)						1					
脳下垂体	腺腫 (B)	2	2	1	3	1	5	5	3	2	2	
甲状腺	濾胞細胞癌 (M)				1	1						
	濾胞細胞腺腫 (B)					1			1		2	
	傍濾胞細胞腺腫 (B)									1		
子宮	平滑筋腫 (B)											1
乳腺	腺癌 (M)								1			
	線維腺腫 (B)		1				2	4	3	3		
皮膚	線維肉腫 (M)				1							
	神経鞘腫 (M)			1		1						
	肉腫 (M)											1
	角化棘細胞腫 (B)			1	1							
	乳頭腫 (B)				1							
	線維腫 (B)	1			2							
その他	扁平上皮癌 (M)											1
合計	腫瘍数	良性	5	4	2	8	2	8	12	8	6	6
		悪性	0	1	1	2	2	0	1	1	0	2
		腫瘍総数	5	5	3	10	4	8	13	9	6	8
	担腫瘍動物数	良性	5	4	2	7	2	7	8	7	6	6
		悪性	0	1	1	2	2	0	1	1	0	2
		動物総数	5	4	3	8	4	7	9	8	6	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。(B)：良性 (M)：悪性
空欄は発生なし。

統計学的方法：Fisher の直接確率検定：有意差なし。

表 6-1 発がん性群における腫瘍性病変

臓器	所見	性別/用量 (ppm)												
		雄					雌							
		0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300			
死亡/切迫殺例														
	検査例数	30	36	28	30	38	27	29	29	37	28			
副腎	皮質腺腫 (M)							1						
	皮質腺腫 (B)								1					1
	髄質褐色細胞腫 (B)	2	1	2	1	1				1				
脳	稀突起膠細胞腫 (M)			1										
	星状膠細胞腫 (M)			1	1	2	2	1						
空腸	癌 (M)				1									
腎臓	腎腺腫 (B)	1	2		1		1							
肝臓	肝細胞癌 (M)					1								
	肝細胞腺腫 (B)													
乳腺尾部	線維腺腫 (B)								1					
脾臓	島細胞癌 (M)		1											
	島細胞腺腫 (B)	1		1					1					
	外分泌細胞腺腫 (B)			1										
上皮小体	検査動物数	29	34	28	30	38	26	27	26	36	28			
	腺腫 (B)					1					1			
脳下垂体	癌 (M)								1	1				
	腺腫 (B)	9	11	9	8	18	15	20	20	23	14			
脊髓中枢	脊索腫 (M)					1								
精巣	間細胞腫瘍 (B)	2	1	1										
甲状腺	検査動物数	29	34	28	30	38	27	29	29	37	28			
	濾胞細胞癌 (M)					3				1	1			
	濾胞細胞腺腫 (B)			4		8↑								6↑
	傍濾胞細胞腺腫 (B)	1	1		1		1	2	1	1	1			
子宮	検査動物数						27	29	29	36	28			
	腺癌 (M)						1							
陰核腺	検査動物数						1							
	癌 (M)						1							
造血組織	悪性リンパ腫 (M)		3	2	2			1	2					
	組織球性肉腫 (M)							1		1				
乳腺頭部	検査動物数	1	1	1	2	1	2	8	7	10	7			
	線維腺腫 (B)								2	1				
乳腺	検査動物数	4	0	1	2	1	18	19	22	26	14			
	腺癌 (M)						1	3	6	5				
	線維上皮腫瘍 (M)						1	2	2	2	1			
	線維腺腫 (B)						17	15	18	22	14			
骨格筋	検査動物数	0	1	0	1	2	0	0	0	0	1			
	肉腫 (M)				1									
	骨肉腫 (M)		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死亡/切迫殺例数と同じ。

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

(B)：良性 (M)：悪性

表 6-2 発がん性群における腫瘍性病変

臓器	所見	性別/用量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300
死亡/切迫殺例 (つづき)											
皮膚	検査動物数	10	15	11	6	14	22	21	22	28	18
	肉腫 (M)		2		2	1	1			1	1
	癌 (M)							1			
	ジンバル腺腫瘍 (M)							1			
	角化棘細胞腫 (B)	2	3	1							
	基底細胞腫瘍 (B)			1							
	毛囊上皮腫 (B)	1									1
	線維腫 (B)		2	2		1	1	1			2
複雑性歯牙腫 (B)						1					
ジンバル腺腫瘍 (B)			1		2						
尾	検査動物数	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0
	線維上皮腫瘍 (B)					1					
舌	検査動物数	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
	乳頭腫 (B)										1
最終屠殺											
	検査例数	20	14	22	20	12	23	21	21	13	22
副腎	検査動物数	20	1	3	4	12	23	13	15	11	22
	髓質混合型褐色細胞腫 (B)							1	1		
	髓質褐色細胞腫 (B)			1		1					
空腸	検査動物数	20	0	0	0	12	23	0	0	0	22
	癌 (M)	1					1				
肝臓	肝細胞癌 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	肝細胞腺腫 (B)	1		2		3			1		
肺	肺腺腫 (B)	1									
脾臓	検査動物数	20	0	1	1	12	23	0	0	0	22
	島細胞癌 (M)			1							
	島細胞腺腫 (B)	2				1					
上皮小体	検査動物数	19	14	20	19	12	21	19	18	12	18
	腺腫 (B)	1			1			2			
脳下垂体	検査動物数	19	3	8	11	12	23	14	15	9	22
	腺腫 (B)	9	2	6	10	2	10	12	12	7	10
	癌 (M)							2			
精巣	検査動物数	20	2	3	7	12	-	-	-	-	-
	間細胞腫瘍 (B)	1	22	1	4	0					
胸腺	検査動物数	20	0	1	0	12	23	0	0	0	22
	胸腺腫 (M)			1							
甲状腺	濾胞細胞癌 (M)					2		1			1
	濾胞細胞腺腫 (B)		1	1	3	4†					2
	傍濾胞細胞腺腫 (B)	1	2	2	3	2	2	1	1	1	4
造血組織	検査動物数	20	0	0	1	12	0	0	0	0	0
	悪性リンパ腫 (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死亡/切迫殺例数と同じ。

空欄は発生なし。統計学的方法：Fisher の直接確率検定： †: p<0.05

(B)：良性 (M)：悪性

表 6-3 発がん性群における腫瘍性病変

臓器	所見	性別/用量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300
最終屠殺 (つづき)											
腸間膜	検査動物数	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	中皮腫 (M)					1					
卵巣	検査動物数	-	-	-	-	-	23	8	7	3	22
	腺癌 (M)										1
膀胱	検査動物数	20	0	0	0	12	23	0	0	2	22
	移行上皮乳頭腫 (B)									1	
子宮頸部	検査動物数	-	-	-	-	-	23	1	0	0	22
	肉腫 (M)							1			
乳腺尾部	検査動物数	-	-	-	-	-	23	9	9	5	22
	線維腺腫 (B)						1		2		2
乳腺頭部	検査動物数	-	-	-	-	-	4	9	9	5	9
	線維腺腫 (B)										3
乳腺	検査動物数	0	0	2	0	1	15	15	15	10	8
	腺癌 (M)							4			1
	線維上皮腫瘍 (M)						2	2	2		1
	線維腺腫 (B)			1		1	15	11	15	9	5
皮膚	検査動物数	7	10	9	7	5	17	16	17	10	10
	肉腫 (M)						1	1			
	血管肉腫 (M)		1								
	角化棘細胞腫 (B)	1		2							
	乳頭腫 (B)		1								
	基底細胞腫瘍 (B)	1			1			1			
	毛嚢上皮腫 (B)			1							
線維腫 (B)	1	2	3	2	1	2	2			2	
全動物											
	検査例数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
副腎	検査動物数	50	37	31	34	50	50	42	44	48	50
	皮質腺癌 (M)							1			
	皮質腺腫 (B)						1				1
	髄質褐色細胞腫 (B)	2	1	3	1	2			1		
	髄質混合型褐色細胞腫 (B)							1	1		
脳	検査動物数	50	36	30	33	50	50	34	36	39	50
	稀突起膠細胞腫 (M)			1							
	星状膠細胞腫 (M)			1	1	2	2	1			
空腸	検査動物数	50	36	28	30	48	50	29	29	37	49
	癌 (M)	1			1		1				
腎臓	尿細管腺腫 (B)						1				

統計学的方法: Fisher の直接確率検定: 有意差なし。

(B): 良性 (M): 悪性

表 6-4 発がん性群における腫瘍性病変

臓器	所見	性別/用量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300
全動物 (つづき)											
肝臓	肝細胞癌 (M)	2	2		1				0	0	0
	肝細胞腺腫 (B)	1		2		4			1		
肺	肺腺腫 (B)	1									
乳腺尾部	検査動物数	50	36	29	31	50	50	37	38	42	50
	線維腺腫 (B)						1	1	2		2
卵巣	検査動物数	-	-	-	-	-	50	37	36	40	50
	腺癌 (M)										1
膵臓	検査動物数	50	36	29	31	50	50	29	29	37	50
	島細胞癌 (M)		1	1							
	島細胞腺腫 (B)	1		1		1		1			
	外分泌細胞腺腫 (B)			1							
上皮小体	検査動物数	48	48	48	49	48	47	46	44	48	46
	腺腫 (B)	1			1	1		2			1
脳下垂体	検査動物数	49	39	36	41	50	50	43	44	46	50
	癌 (M)							2	1	1	
脊髄中枢	検査動物数	50	36	28	30	50	50	29	29	37	50
	脊索腫 (M)					1					
精巣	検査動物数	50	38	31	37	50	-	-	-	-	-
	間細胞腫 (B)	3	2	2	5						
胸腺	検査動物数	50	36	29	30	50	50	30	29	37	50
甲状腺	検査動物数	49	48	50	50	50	50	50	50	50	50
	濾胞細胞癌 (M)					5↑		1		1	2
	濾胞細胞腺腫 (B)		1	5↑	3	12↑					8↑
	傍濾胞細胞腺腫 (B)	2	3	2	4	2	3	3	2	2	5
膀胱	検査動物数	50	36	28	31	50	50	29	29	39	50
	移行上皮乳頭腫 (B)									1	
子宮頸部	検査動物数	-	-	-	-	-	50	30	29	36	50
子宮	肉腫 (M)							1			
	検査動物数	-	-	-	-	-	50	33	38	41	50
陰核腺	腺癌 (M)						1	0	0	0	0
	検査動物数	-	-	-	-	-	1				
造血組織	検査動物数	50	36	28	31	50	50	29	29	37	50
	悪性リンパ腫 (M)	1	3	2	3		3	1	2		
	組織球性肉腫 (M)							1		1	
乳腺頭部	検査動物数	1	1	3	3	1	6	17	16	15	15
	線維腺腫 (B)							2	1	1	3

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

(B): 良性 (M): 悪性

表 6-5 発がん性群における腫瘍性病変

臓器	所見	性別/用量 (ppm)										
		雄					雌					
		0	0.5	1.5	30	300	0	0.5	1.5	30	300	
全動物 (つづき)												
乳腺	検査動物数	4	0	3	2	2	33	34	37	36	22	
	腺癌 (M)						1	7	6	5	1	
	線維上皮腫瘍 (M)						3	4	4	2	2	
	線維腺腫 (B)	4		2	1	1	32	26	33	31	19	
腸間膜	検査動物数	1	1	0	2	2	0	0	0	2	1	
	内皮腫 (M)					1						
骨格筋	検査動物数	0	1	0	1	2	0	0	0	0	1	
	肉腫 (M)				1							
	骨肉腫 (M)	-	1									
皮膚	検査動物数	17	25	20	13	19	39	37	39	38	28	
	肉腫 (M)		2		2	1	2	1			1	
	癌 (M)									1		
	ジンバル腺腺腫 (M)							1				
	血管肉腫 (M)		1									
	角化棘細胞腫 (B)	3	3	3								
	乳頭腫 (B)		1									
	基底細胞腫瘍 (B)	1		1	1			1				
	毛嚢上皮腫 (B)	1		1							1	
	線維腫 (B)	1	4	5	2	2	3	3			4	
尾	検査動物数	0	1	1	0	2	0	0	0	0	0	
	線維上皮腫瘍 (M)					1						
舌	検査動物数	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	
	乳頭腫 (B)										1	
検査動物数		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
合計	腫瘍数	良性	39	28	44	38	49	68	70	76	65	71
		悪性	4	10	6	9	10	14	21	13	11	7
		腫瘍総数	43	38	50	47	59	82	91	89	76	78
	担腫瘍動物数	良性	30	24	31	25	34	43	45	42	42	38
		悪性	4	10	6	8	9	11	18	11	10	6
		動物総数	33	31	36	30	6	47	47	44	45	39

統計学的方法: Fisher の直接確率検定: 有意差なし。

(B): 良性 (M): 悪性

参考資料

有意差検定の追加実施

検定対象：資料 20/ラット併合試験での甲状腺ホルモンの濃度測定結果

実施目的：原文では Student t 検定のみ実施されているので、他の検定方法を用いて実施した。

実施者：

報告年月日： 9 月 25 日

検定方法：Bartlett 法により投与群の無処理群に対する分散の均一性を検定した。

Bartlett 法で均一性が認められた場合 Dunnett 法で有意差検定を実施した。また均一性が認められない場合は、Kruskal-Wallis 法により検定を実施し、有意の場合 Mann-Whitney 法により有意差検定を実施した。

本検定は SAS プログラムを使用して実施した。

検定結果：結果は次ページの表 1 及び表 2 に示した。

Student t 検定の結果(原文より引用)と概ね同じであったが、Mann-Whitney 法による結果は以下の箇所で異なった。

(投与期間)

- 1) 雌/T4/0.5、1.5ppm 群/4 週後で有意差が無くなった。
- 2) 雄/T4/0.5ppm 群/24 週後で有意差が無くなった。
- 3) 雄/TSH/0.5ppm 群/1、4 週後、雌/TSH/1.5ppm 群/12 週で有意差が付いた。

(回復期間)

- 4) 雄/T4/0.5ppm 群/4 週後で有意差が無くなった。
- 5) その他に、雄 (T4/1.5ppm/7 週、TSH/2-11 週/) 及び雌 (T3/30ppm 群/7 週、T4/1.5ppm 群/7 週、T4/0.5 及び 30ppm 群/7 週) で有意差が消えた。

結論： T4 の濃度変動に関しては特に 0.5ppm 群で有意差が無くなる傾向を示した(投与期間中の雄/4 週及び雌/12 週のみ有意差あり)。

TSH の濃度変動に関しては雄/0.5ppm 群/1、4 週で新たに有意差が付いたが、同時期の 1.5ppm 群では何れの検定方法でも無いことから意義はないものと考えられた。また、雌/1.5ppm 群/12 週で新たに有意差が付いたが用量関連性もないことから意義はないものと考えられた。

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

従って、0.5ppm 群での T4 及び TSH の変動は無処理群と比較して有意であるとは考えられず、原文での考察をさらに支持する結果となった。

表 1

Student T 検定

		(ppm)	雄				雌				
			0.5	1.5	30	300	0.5	1.5	30	300	
			回復試験群	投与期間	2週	T ₃	96.7	100.0	95.1	86.9↓	96.2
T ₄	103.1	76.1↓				39.6↓	0.0↓	80.2	111.2	54.3↓	0.0↓
TSH	151.1	131.9				251.1↑	431.9↑	100.0	91.4	102.9	217.1↑
5週	T ₃	110.7			113.3	112.0	96.0	107.8	97.4	90.0	105.2
	T ₄	86.0↓			81.5↓	58.6↓	12.4↓	81.8↓	77.9↓	48.2↓	26.1↓
	TSH	153.8			125.0	215.4↑	440.4↑	102.6	86.8	102.6	197.4↑
13週	T ₃	98.9		103.3	119.6↑	109.8	100.0	94.9	88.0	100.0	
	T ₄	91.5		76.4↓	67.6↓	23.6↓	78.7↓	79.3↓	56.6↓	30.4↓	
	TSH	126.3		101.8	107.0	322.8↑	100.0	85.3	102.3	255.9↑	
25週	T ₃	105.8		107.2	101.4	92.8	98.9	90.3	88.2	90.3	
	T ₄	83.2↓		73.1↓	53.1↓	16.6↓	108.4	122.5↑	104.6	51.2↓	
	TSH	138.9		95.8	119.4	291.7↑	115.6	100.0	121.9	206.3↑	
51週	T ₃	95.7		120.0↑	117.1↑	98.6	101.1	95.4	96.6	100.0	
	T ₄	92.6		81.2↓	65.5↓	34.8↓	104.5	90.6	62.2↓	41.7↓	
	TSH	131.5		95.4	204.6↑	440.8↑	129.0	88.7	98.4	217.7↑	
回復期間	3週	T ₃		90.6	100.0	107.8	96.9	88.8	96.9	90.8	112.2
		T ₄		93.5	86.9	76.8↓	64.5↓	101.8	76.0	83.2	95.2
		TSH		98.6	79.2	102.8	176.4↑	102.9	100.0	100.0	108.6
	5週	T ₃	84.3	97.1	105.7	110.0	103.4	100.0	108.0	128.4↑	
		T ₄	84.1↓	68.0↓	64.4↓	78.3↓	99.6	80.7	80.3	87.0	
		TSH	114.3	107.1	130.4	192.9↑	94.6	97.3	89.2	100.0	
	8週	T ₃	96.3	97.5	101.3	111.3	113.2	95.6	120.9↑	130.8↑	
		T ₄	87.1	77.4↓	70.0↓	82.1	104.5	79.2↓	94.4	85.6	
		TSH	106.8	74.6	88.1	154.2↑	106.7	103.3	90.0	103.3↑	
	12週	T ₃	92.9	105.4	110.7	114.3	108.0	110.7	126.7↑	148.0↑	
		T ₄	96.8	87.8	88.9	95.1	122.0↑	110.8	123.7↑	104.7	
		TSH	121.1	121.1	134.2	221.1↑	114.8	107.4	100.0	114.8	

↑↓: p<0.05 ↑↓: p<0.01 ↑↓: p<0.001 で有意差あり

数字は対照群に対する変動率(%)

出典: CDラットを用いた52週投与後13週間回復群を含む発がん性/慢性毒性併合試験 (Pharmaco LSR:)

表 2

Dunnett 検定または Man-Whitney の検定

		(ppm)	雄				雌				
			0.5	1.5	30	300	0.5	1.5	30	300	
			回復群	投与期間	2週	T ₃	96.7	100.0	95.1	86.9	96.2
T ₄	103.1	76.1↓				39.6↓	0.0↓	80.2	111.2	54.3↓	0.0↓
TSH	151.1↑	131.9				251.1↑	431.9↑	100.0	91.4	102.9	217.1↑
5週	T ₃	110.7			113.3	112.0	96.0	107.8	97.4	90.9	105.2
	T ₄	86.0↓			81.5↓	58.6↓	12.4↓	81.8	77.9	48.2↓	26.1↓
	TSH	153.8↑			125.0	215.4↑	440.4↑	102.6	86.8	102.6	197.4↑
13週	T ₃	98.9		103.3	119.6↑	109.8	100.0	94.9	88.0	100.0	
	T ₄	91.5		76.4↓	67.6↓	23.6↓	78.7↓	79.3↓	56.6↓	30.4↓	
	TSH	126.3		101.8	107.0	322.8↑	100.0	85.3↓	102.3	255.9↑	
25週	T ₃	105.8		107.2	101.4	92.8	98.9	90.3	88.2	90.3	
	T ₄	83.2		73.1↓	53.1↓	16.6↓	108.4	122.5↑	104.6	51.2↓	
	TSH	138.9		95.8	119.4	291.7↑	115.6	100.0	121.9	206.3↑	
51週	T ₃	95.7	120.0	117.1	98.6	101.1	95.4	96.6	100.0		
	T ₄	92.6	81.2↓	65.5↓	34.8↓	104.5	90.6	62.2↓	41.7↓		
	TSH	131.5	95.4	204.6↑	440.8↑	129.0	88.7	98.4	217.7↑		
回復期間	3週	T ₃	90.6	100.0	107.8	96.9	88.8	96.9	90.8	112.2	
		T ₄	93.5	86.9	76.8↓	64.5↓	101.8	76.0	83.2	95.2	
		TSH	98.6	79.2	102.8	176.4	102.9	100.0	100.0	108.6	
	5週	T ₃	84.3	97.1	105.7	110.0	103.4	100.0	108.0	128.4↑	
		T ₄	84.1	68.0↓	64.4↓	78.3↓	99.6	80.7	80.3	87.0	
		TSH	114.3	107.1	130.4	192.9	94.6	97.3	89.2	100.0	
	8週	T ₃	96.3	97.5	101.3	111.3	113.2	95.6	120.9	130.8↑	
		T ₄	87.1	77.4	70.0↓	82.1	104.5	79.2	94.4	85.6	
		TSH	106.8	74.6	88.1	154.2	106.7	103.3	90.0	103.3	
	12週	T ₃	92.9	105.4	110.7	114.3	108.0	110.7	126.7↑	148.0↑	
		T ₄	96.8	87.8	88.9	95.1	122.0	110.8	123.7	104.7	
		TSH	121.1	121.1	134.2	221.1	114.8	107.4	100.0	114.8	

↑↓: p<0.05 ↑↓: p<0.01 で有意差あり 数字は対照群に対する変動率(%)

出典: CD ラットを用いた 52 週投与後 13 週間回復群を含む発がん性/慢性毒性併合試験