

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

10-1-5. 代謝物 F : のラットにおける催奇形性試験 (資料 51)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作製年:

検体純度: (代謝物 F)

供試動物: Sprague-Dawley 系妊娠ラット (CrI: CD (SD) BR)、妊娠 6 日体重範囲: 雌 260~347g、
1 群 25 匹

投与期間: 器官形成期間の 10 日間 (7 月 8 日 ~ 7 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、0.2、1.0 及び 2.5mg/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。
投与容量は直近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。

用量設定根拠: 同試験機関において、同系統ラットを用いた用量設定のための予備試験を
行った。検体を 0.5%メチルセルロースに懸濁させ、0、0.2、1.0、2.5 及び 5.0mg/kg
で妊娠 6-15 日まで 10 日間、毎日強制経口投与を行った。その結果、各群において以
下のような症状が認められた。

5.0mg/kg/day : 強い体重抑制が認められ、半数以上の個体が死亡した。

2.5mg/kg/day : 体重増加および摂食量の抑制が認められ、着床数および胎児重量がわ
ずかに低下した。

1.0mg/kg/day : 投与初期に、わずかな体重増加抑制が認められ、着床数および胎児重
量に低下が認められた。

0.2mg/kg/day : 投与に関する変化は一切認められなかった。

以上の結果から、本試験での最高用量を 2.5mg/kg/day とした。

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、妊娠 6~16 日は毎日及び妊娠
20 日に測定した。摂餌量は妊娠 0~6 日をまとめて、6~15 日は毎日及び妊娠 16~20
日をまとめて測定した。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、胎盤重量を検査した。又、母動物の臓器の肉眼的病理学的変化を検査し
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

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を作製し、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)及び 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認められなかった。全ての群で時々痂皮形成を伴い脱毛が肢、脇腹、腹部及び胸部等に認められたが、2.5mg/kg 群では発生頻度及びその程度が対照群より高く、投与による影響と考えられた。

2.5mg/kg 群において、投与期間中(妊娠 6~15 日)体重増加が抑制され、妊娠子宮重量を除く補正体重増加も有意に抑制され、摂餌量の減少(妊娠 9~16 日)を伴っていた。

1.0mg/kg 群では妊娠 9~12 日の体重増加のみ有意に抑制された。

着床後損失率が投与群で僅かに高かったが、用量関連性も統計学的有意差もなく、背景対照データの範囲内(平均値 7.1%、範囲 3.5~12.4%； に実施の 15 試験 183 腹の検査結果)であり、投与の影響ではなかった。その他の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	0.2	1.0	2.5	
群当り動物数		25	25	25	25	
未妊娠雌数		1	1	0	1	
死亡雌数		0	0	0	0	
生存児を有する腹数		24	24	25	24	
妊娠率 (%)		96	96	100	96	
動 親 物	一般症状:脱毛/痂皮		1/1	1/2	2/1	7/3
	体重増加 [*] (%)	妊娠 6~9 日				28↓
		妊娠 9~12 日			80↓	28↓
		妊娠 12~16 日			100	90
		妊娠 16~20 日			100	103
		妊娠 6~16 日			96	58↓
	補正体重増加					78↓
	摂餌量 [*] (%)	妊娠 6~9 日				
		妊娠 9~12 日				83↓
		妊娠 12~16 日				84↓
		妊娠 16~20 日				
	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)	黄体数	18.0	17.3	17.4	17.6
		着床数	16.0	15.8	16.1	16.3
着床前損失率 (%)		10.8	8.1	6.9	7.2	
早期吸収胚数		0.67	0.96	1.16	1.04	
後期吸収胚数		0.08	0.04	0.16	0.04	
死亡胚数		0.00	0.00	0.00	0.00	
着床後損失率 (%)		4.6	7.0	8.3	6.5	
生存胎仔数	15.2	14.8	14.8	15.2		

*: 変動の目安として対照群に対する比率%を示す。

統計学的方法: DUNNETT 検定及び MANN-WHITNEY 検定 ↓: $p \leq 0.05$, ↓: $p \leq 0.01$

表 2. 胎児の成績

投与量 (mg/kg)		0		0.2		1.0		2.5	
生存児を有する腹数		24		24		25		24	
胎児数	合計	365		355		369		365	
	雄	153		171		187		177	
	雌	212		184		182		188	
腹当り児数	合計	15.2		14.8		14.8		15.2	
	雄	6.4		7.1		7.5		7.4	
	雌	8.8		7.7		7.3		7.8	
性比(雄の割合%)		42		48		51		48	
胎盤重量 (g)	雄	0.638		0.654		0.630		0.637	
	雌	0.616		0.633†		0.623		0.606	
平均胎児体重 (g)	雄	3.64		3.57		3.62		3.55↓	
	雌	3.43		3.44		3.47		3.35↓	
		児数	腹数	児数	腹数	児数	腹数	児数	腹数
外表異常									
奇形	検査胎仔数	365	24	355	24	369	25	365	24
	後肢第 3, 4 指一部癒合							1(0.3)	1(4.2)
	矮小児	3(0.8)	3(12.5)			2(0.5)	1(4.0)	4(1.1)	4(16.7)
内臓異常									
変異	検査児数	178	24	173	24	177	25	179	24
	胸腺腫大	6(3.4)	5(20.8)	3(1.7)	3(12.5)	2(1.1)	2(8.0)	3(1.7)	3(12.5)
	尿管拡張	10(5.6)	8(33.3)	13(7.5)	7(29.2)	12(6.8)	7(28.0)	4(2.2)	3(12.5)
	尿管	18(10.1)	11(45.8)	29(16.8)	16(66.7)	20(11.3)	12(48.0)	15(8.4)	9(37.5)
骨格異常									
奇形	検査児数	187	24	182	24	192	25	186	24
	1-4 胸骨分節未骨化	2(1.1)	2(8.3)			3(1.6)	2(8.0)	2(1.1)	2(8.3)
	第 1 を除き、3 以下の胸椎体未骨化					1(0.5)	1(4.0)		
	恥骨未骨化					2(1.0)	1(4.0)		
	中足骨未骨化	2(1.1)	2(8.3)			2(1.0)	1(4.0)	3(1.6)	3(12.5)
異常	舌骨体未骨化	3(1.6)	2(8.3)	4(2.2)	4(16.7)	12(6.3)	9(36.0)	8(4.3)	4(16.7)
	恥骨不完全骨化	3(1.6)	3(12.5)	3(1.6)	3(12.5)	2(1.0)	2(8.0)	6(3.2)	5(20.8)
	尾椎 5 以下	2(1.1)	2(8.3)			3(1.6)	2(8.0)	8(4.3)	6(25.0)
変異	5/6 胸骨分節未骨化	54 (28.9)	21 (87.5)	66 (36.3)	18 (75.0)	73 (38.0)	24 (96.0)	82 [†] (44.1)	21 (87.5)
	5/6 胸骨分節不完全骨化	169 (90.4)	24 (100)	152 (83.5)	23 (95.8)	158 (82.3)	25 (100)	149 (80.1)	24 (100)

胎児検査の () 内の数値は所見の発生率%

統計学的方法: Fisher 直接確率検定 †: $p \leq 0.05$, ††: $p \leq 0.01$

胎児動物(表 2) :

雌雄の平均胎児体重が 2.5mg/kg 群で有意に低かったが、胎盤重量に影響はなかった。
0.2mg/kg 群の胎盤重量が有意に高かったが、偶発的と考えられた。

生存胎児数及び性比に投与の影響は認められなかった。

外表異常として、2.5mg/kg 群で 1 例の胎児に後肢の指の一部癒合がみられたが、骨格検査で骨化の異常は全く認められなかった。矮小児(体重<2.7g)が対照群、1.0 及び 2.5mg/kg 群で認められたが、投与関連性の増加は認められなかった。

内臓異常はいずれの群においても検体の投与に起因する悪影響は認められなかった。

骨格検査で、胸骨分節、恥骨、胸椎体及び中足骨未骨化に関連する奇形がみられたが、対照群及び投与群の間にランダムに分布しており、投与の影響は認められなかった。また、普通に観察される 5/6 胸骨分節未骨化が 2.5mg/kg 群で有意に増加していたが、背景データの範囲内(平均値 42.1%、範囲 26.0~62.2% ; 1992~1995 年に実施の 12 試験 156 腹 1281 胎児の検査結果)にあり、投与の影響ではないと考えられる。

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 2.5mg/kg 群で脱毛の発生頻度及びその程度の増加、投与期間中の体重増加の抑制、摂餌量の低下が認められた。1.0mg/kg 群では一時的な体重増加の抑制(妊娠 9~12 日)が認められた。

胎児に対して、2.5mg/kg 群では胎児体重の低下が認められ、軽度の骨化遅延に関連していた。

従って、無毒性量は親動物に対して 0.2 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 2.5 mg/kg/日でも認められなかった。

10-1-6. 代謝物 F : の変異原性試験

(1) 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 52)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作製年:

検体純度: (代謝物 F)

方 法: ヒステジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella tryphimurium*, 5 菌株 (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538) を用い、ラットの肝臓から調製した代謝酵素系 (S-9 mix) 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。検体を溶解させるため、ジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。

検体を DMSO に溶解し、S-9 mix の存在下及び非存在下とも 10~250 μ g/プレートの範囲の 5 用量で、2 回実施した。いずれの試験も 3 連制で行った。

用量設定根拠: TA100 を用いた用量設定試験では、100 及び 250 μ g/プレートにて極僅かな沈澱が認められ、また、S9 mix の不在下において 250 μ g/プレート以上で僅かな細胞毒性が認められた。これより、本試験では 250 μ g/プレートを最大用量とした。

結 果: 結果は次頁の表に示す。

2 回の試験において、100 及び 250 μ g/プレートの検体を含む全てのプレートで沈澱が認められ、また、250 μ g/プレートにおいては菌株に対する生育阻害が認められた。

検体は S9 mix の有無に係らず、いずれの菌株にも復帰変異コロニー数の増加を認めなかった。

一方、陽性対照として用いたアジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、2-ニトロフルオレン、2-アミノアントラセンでは、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。

代謝物 F : の復帰変異試験結果 (3 プレーットの平均値)

	薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 Mix 有無	復帰変異コロニー数/プレート					
				TA98	TA100	TA1535	TA1537	TA1538	
試験 1	溶媒対照 (DMSO)	-	-	32	119	18	14	14	
	検体	10	-	32	124	17	11	14	
		25	-	30	129	26	96	17	
		50	-	30	137	22	10	13	
		100	-	30p	117p	17p	10p	16p	
		250	-	30ph	129ph	19ph	12ps	17ps	
	溶媒対照 (DMSO)	-	+	32	113	15	14	24	
	検体	10	+	33	113	18	14	25	
		25	+	34	114	17	14	18	
		50	+	32	110	18	11	27	
		100	+	34p	1409p	15p	12p	19p	
		250	+	29ph	120ph	18ps	16ps	26ph	
	陽性対照	7ジ ⁺ 化ナトリウム	1	-		699	489		
		9-アミノアクリジン	50	-				219	
2-ニトロフォルオレン		1	-	314				355	
2-アミノアントラセン		2	+	2228	2248	311	228	1947	
試験 2	溶媒対照 (DMSO)	-	-	30	113	19	12	12	
	検体	10	-	28	128	17	11	11	
		25	-	35	129	21	13	14	
		50	-	32	126	16	14	16	
		100	-	35p	107p	17p	12p	14p	
		250	-	27ps	95ps	21ps	13ps	16ps	
	溶媒対照 (DMSO)	-	+	41	121	20	15	24	
	検体	10	+	47	123	17	13	28	
		25	+	48	994	16	12	30	
		50	+	46	120	18	15	25	
		100	+	39p	101p	17p	16p	27p	
		250	+	39ps	121ps	16ps	15ps	21ps	
	陽性対照	7ジ ⁺ 化ナトリウム	1	-		641	444		
		9-アミノアクリジン	50	-				334	
2-ニトロフォルオレン		1	-	404				419	
2-アミノアントラセン		2	+	2104	2155	236	237	1973	

p: 沈殿、s: 背景ローンの阻害、h: 強い細胞毒性

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) 哺乳動物細胞を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異性試験

(資料53)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作製年:

検体純度: (代謝物F)

試験方法: チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-K1-BH₄)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、陰性(溶媒)対照とした。

処理濃度は以下のとおりとした。

試験 1: S-9 mix 非存在下: 5、10、15、30、60、80、100、125 $\mu\text{g/mL}$

S-9 mix 存在下: 15、30、60、80、100、125、250、625 $\mu\text{g/mL}$

試験 2: S-9 mix 非存在下: 5、10、15、30、60、80、100、125 $\mu\text{g/mL}$

S-9 mix 存在下: 30、60、80、100、125、175、250、625 $\mu\text{g/mL}$

陽性対照: S-9 mix 非存在下: エチルメタンスルホネート(EMS) 250 $\mu\text{g/mL}$ 、

S-9 mix 存在下: 20-メチルコラントレン(MC) 5 $\mu\text{g/mL}$

細胞を H5 培地(牛胎児血清添加培地)に浮遊し(7.5×10^5 個/mL)、その 10mL をフラスコに採り、少なくとも 20 時間培養した。培養後、H0 培地(L-グルタミン及びゲンタマイシン添加 Ham's F12 培地)を加え、代謝活性化系の非存在下及び存在下で、検体を添加して 4 時間培養した。ついで、細胞を収穫、洗浄し、細胞は H5 培地を入れた組織培養シャーレに 200 細胞/シャーレを播種した。さらに、細胞毒性評価用に生存細胞 10^6 を播種し、突然変異発現時間の 7 日間に 1 回継代培養した。継代培養時に、H5 培地に 200 細胞、及び選択培地(6-チオグアニン添加 H5 培地)に約 10^5 細胞/シャーレを播種し、さらに 7 日間培養して固定・染色し、変異コロニー数を計測した。

用量設定根拠: DMSO に対する検体の溶解度は 500mg/mL であったが、培地を加えると多量の沈殿が生じ、最終濃度 625 $\mu\text{g/mL}$ では僅かに沈殿を生じたので、これを最高濃度として最終濃度を 5、10、15、30、60、125、250、500、625 $\mu\text{g/mL}$ で S-9 Mix の存在下及び非存在下で予備試験を実施した。この結果 125 $\mu\text{g/mL}$ 以上では沈殿が観察され、細胞生存率は S-9 mix 非存在下で 9~0%、S-9 mix 存在下で 32~0% であったので、試験 1 では上記の濃度を選定した。

結果: 結果を次表に示す。

細胞毒性は、S-9 Mix の有無に係らず全ての試験で、検体処理後認められた。

検体処理区における突然変異の発現頻度はS-9 Mixの非存在下及び存在下とも溶媒対照群と差がなく、有意な増加は認められなかった。

一方、陽性対照群(S-9 Mix非存在下のEMS、S-9 Mix存在下のMC)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。

表 細胞毒性及び突然変異発現率

(3プレート/反復、溶媒対照群は4反復、その他は2反復の平均値)

	S-9 Mixの有無		無			有			
	処理	処理量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞毒性 ^a (%)	突然変異率 (/10 ⁶ cell)	平板効率 (%)	細胞毒性 ^a (%)	突然変異率 (/10 ⁶ cell)	平板効率 (%)	
試験1	対照(DMSO)	0	100	1	64	100	9	66	
	検体	5	131	NT	NT	-	-	-	
		10	134	NT	NT	-	-	-	
		15	133	1	56	100	NT	NT	
		30	115	13	62	178	7	59	
		60	80*	10	61	105*	0	61	
		80	48*	1	65	107*	0	59	
		100	24*	1	59	80*	1	59	
		125	9*	NT	NT	77*	4	56	
		250	-	-	-	18*	NT	NT	
		625	-	-	-	18*	2	36	
	陽性対照	EMS 250		92	215↑	55	-	-	-
MC 5			-	-	-	132	230↑	55	
試験2	対照(DMSO)	0	100	7	71	100	4	68	
	検体	5	104	1	66	-	-	-	
		10	75	3	60	-	-	-	
		15	76	3	56	-	-	-	
		30	74	2	51	111	7	68	
		60	3*	NT	NT	71	8	68	
		80	0*	NT	NT	89	6	60	
		100	0*	NT	NT	88	7	50	
		125	0*	NT	NT	54*	NT	NT	
		175	-	-	-	0*	NT	NT	
		250	-	-	-	0*	NT	NT	
		625	-	-	-	0*	NT	NT	
		陽性対照	EMS 250		64	504↑	39	-	-
	MC 5			-	-	-	103	188↑	54

-: 試験せず。

NT : 検査せず。

*: 沈殿を認めた。

^a: 溶媒対照に対する平均生存率%

陽性対照: EMS: エチルメタンサルホネート MC: 20-メチルコラントレン

統計学的方法: 重み付け分散分析+Arlettらの方法(1989) ↑: 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

(3) ヒトリンパ球を用いる *in vitro* 染色体異常試験

(資料 54)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作製年：

検体純度： (代謝物 F)

試験方法：男性から採血し、遠心分離して得たリンパ球を組織培養液に再浮遊し、20%牛胎児血清を加え、さらにフィトヘマグルチニン(最終濃度 175 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を添加して、細胞密度を 1×10^6 細胞/mL とした。この浮遊液を約 48 時間培養して用いた。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 に溶解して試験した。検体処理区及び陽性対照区は 2 反復、溶媒対照区は 4 反復で行った。

試験 1：DMSO に対する検体の溶解度は 500mg/mL であったが、培地を加えると多量の沈殿が生じ、最終濃度 625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では僅かに沈殿を生じたので、これを最高濃度とし、S-9 Mix の存在下及び非存在下とも 5、15、30、60、125、250、500 及び 625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の試験濃度とした。

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

S-9 Mix の非存在下では検体含有培地で細胞を 18 時間培養した。S-9 Mix の存在下では細胞を 3 時間処理後、遠心分離し、細胞ペレットを新鮮培地に再浮遊し、さらに 15 時間培養した。培養終了 2 時間前にコルヒチン 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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、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溶媒対照の 50%まで低下、かつ染色体の形態が良好である用量を最高評価用量として、5、15 及び 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を選定して評価した。評価は各培養の 100 個(50 x スライド 2 枚)の分裂中期像を観察して行った。染色体異常はギャップ、切断、交換、その他(10 以上の異常、細粉化)に分類した。

試験 2：培養時間は 18 及び 32 時間とし、試験方法は下記の点を除いて試験 1 と同条件で行った。

培養 18 時間の場合：

試験濃度

S-9 Mix の非存在下 - 1、2.5、5、10、15、25、30、50 及び 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$

S-9 Mix の非存在下 - 5、10、15、30、40、60、75 及び 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

評価濃度：

S-9 Mix の非存在下 - 5、10 及び 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$

S-9 Mix の存在下 - 15、30、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$

培養 32 時間の場合：S-9 Mix の存在下では新鮮培地に交換後 29 時間培養。

試験濃度

S-9 Mix の非存在下 - 1、2.5、5、10、15、25 及び 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$

S-9 Mix の存在下 - 15、30、40、60、75 及び 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

評価濃度：

S-9 Mix の非存在下 - 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

S-9 Mix の存在下 - 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$

結果：染色体異常の観察結果を表 1、細胞毒性の結果を表 2 及び背景データを表 3 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ず、歴史的対照データの範囲内であった。

一方、陽性対照群ではエチルメタンサルホネート及びシクロホスファミドとも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。

表 1 染色体異常の観察結果 (検体処理区及び陽性対照区は 2、溶媒対照区は 4 プレートの合計値)

薬物	濃度 μg/ml	S-9 Mix 有無	観察 細胞 数	染色体異常数						異常細胞数 (%)			
				キヤ ップ	染色分体		染色体		その 他*	キヤップを含む		キヤップを除く	
					切断	交換	切断	交換		細胞数	平均%	細胞数	平均%
試験 1 18 時間培養													
溶媒対照 (DMSO)		-	400		1		4			5	1.25	5	1.25
検体	5	-	200				2			2	1.0	2	1.0
	15	-	200		2		4			4	2.0	4	2.0
	30	-	200		7		3			7	3.5	7	3.5
陽性対照 (EMS ^b)	500	-	200		13	1	23			28	14.0 [†]	28	14.0 [†]
溶媒対照 (DMSO)		+	400	1	10		2			10	2.5	10	2.5
検体	5	+	200		1		3			3	1.5	3	1.5
	15	+	200		2					2	1.0	2	1.0
	30	+	200	1	6		1			6	3.0	6	3.0
陽性対照 (CPA ^c)	10	+	200	1	64	2	23		3	43	21.5 [†]	43	21.5 [†]
試験 2 18 時間培養													
溶媒対照 (DMSO)		-	400				3			3	0.75	3	0.75
検体	5	-	200		1		4			3	1.5	3	1.5
	10	-	200		1		6			5	2.5	5	2.5
	15	-	200				1			1	0.5	1	0.5
陽性対照 (EMS ^b)	500	-	200		16		14			26	13.0 [†]	26	13.0 [†]
溶媒対照 (DMSO)		+	400		9					9	2.3	9	2.3
検体	15	+	200		4					4	2.0	4	2.0
	30	+	200		9		1			9	4.5	9	4.5
	40	+	200		8		2			9	4.5	9	4.5
陽性対照 (CPA ^c)	10	+	197	1	42	3	3			41	20.8 [†]	41	20.8 [†]
試験 2 32 時間培養													
溶媒対照 (DMSO)		-	400		1		2			3	0.75	3	0.75
検体	10	-	200	1	6		2			8	4.0	7	3.5
陽性対照 (EMS ^b)	250	-	200		17	2	24			33	16.5 [†]	33	16.5 [†]
溶媒対照 (DMSO)		+	400		8		3			11	2.75	11	2.75
検体	60	+	200		6		3			8	4.0	8	4.0
陽性対照 (CPA ^c)	5	+	200	1	28	3	29			42	21.0 [†]	42	21.0 [†]

* : 10 以上の異常、細粉化等

^b : エチルメタンサルホネート (EMS)

^c : シクロホスファミド (CPA)

統計学的方法 : Fisher 検定 †: P<0.001

表 2 細胞毒性一分裂指数(反復当たり 1000 細胞を観察)

薬物	S-9 Mix の有無	試験 1			試験 2					
		18 時間培養			18 時間培養			32 時間培養		
		濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	平均分裂 指数%	相対分裂 指数%	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	平均分裂 指数%	相対分裂 指数%	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	平均分裂 指数%	相対分裂 指数%
溶媒対 照 DMSO	-	10 μL	5.2	100	10 μL	2.4	100	10 μL	4.4	100
検体	-	5	5.1	98	1	3.0	125	1	4.5	102
	-	15	2.3	44	2.5	2.3	96	2.5	4.5	102
	-	30	1.5	29	5	2.8	117	5	3.2	73
	-	60	1.0b	19	10	2.9	121	10	3.0	68
	-	125	—b		15	1.5	63	15	1.1	25
	-	250	—b		25	1.0	42	25	0.5c	11
	-	500	—ab		30	1.4	58	50	0.1c	2
	-	625	—ab		50	1.8	75			
	-	75			75					
溶媒対 照 DMSO	+	10 μL	5.3	100	10 μL	4.7	100	10 μL	5.9	100
検体	+	5	4.9	92	5	4.6	98	15	5.0	85
	+	15	4.4	83	10	4.8	102	30	5.0	85
	+	30	4.9	92	15	3.6	77	40	3.2	54
	+	60	1.8	34	30	2.7	57	60	3.6	61
	+	125	1.1b	21	40	3.0	64	75	0.7	12
	+	250	—b		60	0.9	19	100	0.9	15
	+	500	—ab		75	1.6	34			
	+	625	—ab		100	0.4	9			

—: 細胞の生育なし。

a: 検体を添加時に沈殿を観察した。

b: コルヒチン添加時に沈殿を観察した。

c: 細胞を採取時に沈殿を観察した。

表 3 ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験の溶媒対照の背景データ(1983~1995 年に実施した試験)

S-9 Mix の有無	検査細 胞総数	キヤブを含む			キヤブを除く		
		染色体異 常細胞数	平均%	平均の範囲%	染色体異 常細胞数	平均%	平均の範囲%
-	213321	2553	1.20	0~6.5	2180	1.02	0~5.25
+	232897	2798	1.20	0~6.25	2293	0.98	0~5.25

(4) マウスを用いた小核試験

(資料 55)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作製年:

検体純度: (代謝物F)

試験動物: CD-1系マウス(6週齢)、1群雌雄各15匹(8mg/kg群は死亡時の代替用として各5匹を追加、陽性対照群は5匹)、5週齢で入手時の体重範囲 22~24g

試験期間: 投与後72時間

試験方法: 検体をコーンオイルに懸濁して10mL/kgの容量で一晩絶食させた動物に強制経口投与した。投与2時間後に給餌を再開した。なお、試験1及び2では高用量の連続希釈で低用量を調製したが、実測値との差が大きかったため、試験3以降の試験では検体を直接コーンオイルに懸濁した。

用量選定のために、1群雌雄各2匹を用い予備試験(観察期間72時間)を3回行った。死亡率は次表のとおりであった。この結果から本試験の最大耐用量として8mg/kgを選定した。

	投与量 (mg/kg)		死亡動物数		
	設定用量	実測用量	雄	雌	合計
試験1	8	5.8	1/2	0/2	1/4
	20	14.0	0/2	1/2	1/4
	50	41.6	2/2	2/2	0/4
	125	132.0	2/2	2/2	0/4
試験2	4.1	3.0	0/2	0/2	0/4
	5.12	4.9	0/2	0/2	0/4
	6.4	5.1	0/2	0/2	0/4
	8	8.6	0/2	0/2	0/4
試験3	4.05	3.9	0/2	0/2	0/4
	5.4	4.9	0/2	0/2	0/4
	7.2	6.8	0/2	1/2	1/4
	9.6	8.4	0/2	0/2	0/4
	12.8	13.0	0/2	0/2	0/4

本試験の用量は2、4及び8mg/kgとし、対照群には溶媒(陰性)及びマイトマイシンC 12mg/kg(陽性)を同様に投与した。

本試験の結果、8mg/kg群で死亡はまったく認められず、最大耐用量である明確な示唆がなかったため、追加試験として16mg/kgを用い同様に再度試験した。

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、さらに 48 及び 72 時間後に陰性及び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、各大腿骨から塗抹をスライドガラス上に 1 枚ずつ作製して固定後、10%ギムザを用いて染色し、骨髓標本を作製した。

各標本について、細胞毒性を調べるために、動物当たり 1000 個の赤血球を観察し、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。

結果：次表に結果を示す。

死亡率：本試験での一般症状は円背位及び立毛の軽微な毒性が認められたのみで、8mg/kg でも死亡が認められなかったため、最大耐用量確認のために 16mg/kg で追加試験を実施した。その結果、毒性症状は軽微(立毛)であったが、雄 3/18 例、雌 4/20 例、雌雄合計 7/38 例(18.4%)の死亡が認められた。死亡動物の剖検で誤投与の徴候は認められなかった。

小核誘発性：

いずれの検体投与群のいずれの試料採取時期とも、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正染性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/成熟赤血球比の有意な減少が 16mg/kg 群の投与後 48 及び 72 時間の試料で認められ、骨髓細胞抑制の示唆がみられた。

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 ($p < 0.001$) 増加がみられた。また、多染性赤血球/成熟赤血球比の有意な減少がみられた。

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。

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

	処理区	投与量 ^a (mg/kg)	動物数	処理時間	MNPCE ^b	MNNE ^c	P/M ^d
本試験	溶媒 対照	0 (0)	10	24	0.5	0.5	0.761
				48	1.2	0.4	0.597
				72	1.3	0.5	0.764
	検体	2 (1.9)	10	24	0.5	0.5	0.863
				48	0.7	0.5	0.734
				72	1.2	0.9	0.968
		4 (3.7)	10	24	1.3	0.9	0.844
				48	0.7	0.1	0.621
				72	0.8	0.5	0.821
		8 (7.8)	10	24	1.0	0.0	0.794
				48	0.6	0.3	0.584
				72	0.9	1.0	0.746
	陽性 対照	12	10	24	34.6 \uparrow	1.6	0.514 \downarrow
追加 試験	溶媒 対照	0 (0)	10	24	0.4	0.0	0.796
				48	0.6	0.5	0.822
				72	0.5	1.1	0.777
	検体	16 (15.7)	10	24	0.4	0.0	0.801
				48	0.7	0.5	0.667 \downarrow
				72	0.2	0.4	0.630 \downarrow
	陽性 対照	12	10	24	31.8 \uparrow	1.2	0.581 \downarrow

^a: ()内の数値は分析した実測値

^b: 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

^c: 正染性赤血球 1000 個あたりの小核を有する正染性赤血球数

^d: 多染性赤血球/正染性赤血球比

統計学的方法: Kruskal-Wallis, Jonckhee, Wilcoxon 検定 \downarrow : $P < 0.01$ \uparrow : $p < 0.001$

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

10-1-7. 代謝物 F : の ^{14}C 標識体を用いたラット体内における代謝試験 (資料 56)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作製年:

供試標識化合物: (以下 ^{14}C -標識体と言う)

構造式:

*: ^{14}C 標識部位

化学名:

コード番号: (植物、土壌中代謝物 F)

比放射能: mCi/mmol

放射化学的純度:

供試動物: Sprague Dawley 系 (Iffa Credo CD) ラット、1 群雌雄各 5 匹 (組織代謝は雄 3 匹)
体重: 次頁の群の構成を参照のこと。

試験方法:

投与:

- 1) 投与液の調製: 高用量は非標識体 () で希釈した ^{14}C -標識体を 0.01% Tween 80 含有 0.5% メチルセルロースに懸濁して投与液を調製した。低用量は ^{14}C -標識体のみを同様に懸濁して調製した。
- 2) 投与: 投与容量 5g/kg で投与し、低用量は 1mg/kg、高用量は 10mg/kg で、標識体の投与前 18 時間絶食させた後、強制経口投与した。投与 1 時間後に給餌を再開した。
用量設定根拠: 急性経口毒性試験の結果 LD_{50} は雄 18mg/kg、雌 15mg/kg であったことより、10mg/kg を高用量として選定し、その 1/10 を低用量とした。

3) 群の構成 :

群	用量 (mg/kg)	回数・経路	動物 数	投与時体重 (g)	検討項目	試料採取時期(時間)
A	低用量 (1)	単回経口	雌雄 各 5 匹	雄 148-178 雌 155-178	排泄/組織 内分布	呼吸: 採取しなかった 尿/糞/ケージ洗液: 24 時間ごとに 168 時間まで採取 組織: 投与終了(168 時間)後に採取 心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓、 膵臓、副腎、血液(心血)、骨/ 骨髄、筋、脳、腹部脂肪、胃 腸管(内容物を含む)、生殖腺、 子宮、甲状腺、皮膚、被毛、 カーカス
B	低用量 (1)	反復経口 (非標識 14 回+ 標識 1 回)		雄 264-280 雌 193-200		
C	高用量 (10)	単回経口		雄 237-266 雌 193-217		
D	低用量 (1)	単回経口		雄 150-182 雌 169-177	血中動態	投与後 0(投与前)、0.5、1、2、3、 4、6、8、24 時間、以降 24 時間ご とに 360 時間(低用量)及び 408 時間 (高用量)後まで、さらに、648 時間 後まで 48-72 時間間隔で採取
E	高用量 (10)			雄 170-185 雌 153-168		
追 加	低用量 (1)	単回経口	雄 3 匹	雄 425-485	組織代謝	B 群の組織と同様に採取

4) 試料の採取: 呼吸は 15mg/kg を用いた試験において、投与 48 時間までの呼吸排泄は 0.1%未満であったので、本試験では呼吸は捕集しなかった。

血中動態用の血液は尾静脈から採血した。

5) 放射能の測定: 液体試料(尿、血漿、ケージ洗液、溶媒抽出液、組織溶解液)はシンチレーションカクテルを添加して、LSC で直接、放射能を計測した。糞のメタノール抽出後の残渣はセルロース末を添加後、燃焼した。脂肪、精巢、骨及び骨髄、脾臓、子宮、甲状腺、卵巣及び副腎は細断した試料の一部または全部を直接燃焼した。その他の組織は必要により水を添加して均質化した後、一部試料にセルロース末を添加して燃焼した。血液は一部試料を乾燥後、直接燃焼した。これらの燃焼により発生した $^{14}\text{CO}_2$ を捕集してシンチレーションカクテルを添加後 LSC で放射能を計測した。皮膚、被毛及びカーカスは溶解剤に溶解した。

6) 代謝物の同定: 群 A~C から採取した尿、糞(溶媒抽出液及び残渣)、組織(脂肪、肝臓、皮膚及び被毛、ならびに、カーカス)について、代謝物の特質とその量について HPLC で分析した。

尿及び糞は定性的に含有放射能に個体差がないことを HPLC で確認した後、以下のように試料を性別にプールした。

群	用量 (mg/kg)	回数・経路	尿	糞メタノール抽出液	糞抽出残渣
A	低用量 (1)	単回経口	0~24、24~48、 48~72、72~120、 120~168 時間	0~24、24~48、 48~72、72~96、 96~120、120~144、 144~168 時間	0~24、24~48、 48~72、72~96、 96~120、120~144、 144~168 時間
B	低用量 (1)	反復経口	0~48、48~72、 72~96、96~120、 120~144、144~168 時間	0~24、24~48、 48~72、72~96、 96~120、120~144、 144~168 時間	0~48、48~72、 72~96、96~120、 120~144、144~168 時間
		(非標識 14 回 +標識 1 回)			
C	高用量 (10)	単回経口			

尿の抽出：尿試料を固相カートリッジ (RP18) に添加後、メタノールを用いて代謝物を抽出した。溶離液の溶媒を蒸発させた後、メタノールに再懸濁し、HPLC に供した。

糞の抽出：メタノールで抽出後、濃縮して HPLC に供した。残渣は 1) メタノール/水 (75:25 v/v)、2) メタノール/水 (50:50 v/v)、3) 水で順次抽出し、抽出液を合わせ、遠心分離後、上清を採り、減圧濃縮後、残渣をメタノールに再溶解し、HPLC に供した。

組織の抽出：各抽出液は蒸発乾固した後、残渣をメタノールで再溶解後 LC/MS 分析に供した。

皮膚及び被毛：プール試料を液体窒素中で粉碎し、メタノールで抽出後、雌の試料はさらにアセトンで抽出した。

肝臓、脂肪及びカーカス：プール試料をアセトニトリル中で均質化抽出し、上清を分液ロートに入れ、ヘキサンを加え振盪抽出して、アセトニトリル層を分取した。

尿の酵素/酸加水分解：高用量群雌雄の尿試料 (72~96 時間) を用い、 β -グルクロニダーゼあるいはスルファターゼのいずれかを含む 0.2M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5) で、16 時間、37°C でインキュベーションした。また、1M HCl で 4 時間、37°C でインキュベーションした。全ての試料は固相カートリッジ (RP18) に添加後、上記の尿の抽出と同様に処理して、HPLC に注入した。

糞抽出液の酸加水分解：高用量群雌雄の糞抽出液試料 (48~72 時間) を用い、まず、窒素気流下で蒸発させた後、水に再溶解した。これを尿の酸加水分解と同様に処理した。

代謝物の同定は HPLC、LC/MS、GC/MS、NMR を用い標品のスペクトルと比較した。

結果:

回収率: 標識体投与 168 時間後の回収率は表 1 のとおりである。

表 1 投与量に対する 168 時間後の回収率%

試料	A 単回低用量		B 反復低用量 ^a		C 単回高用量	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
尿	6.06 (6.5)	4.43 (4.8)	10.29 (10.7)	10.77 (11.0)	8.80 (8.8)	10.70 (10.7)
糞	60.08 (64.1)	46.36 (50.0)	61.08 (63.5)	53.34 (54.4)	69.55 (69.2)	56.04 (56.1)
ケージ洗液	0.95	0.82	2.37	2.28	2.26	3.20
組織	26.64 (28.4)	41.12 (44.3)	22.45 (23.3)	31.65 (32.3)	19.94 (19.8)	29.96 (30.0)
合計回収率	93.73 (100)	92.73 (100)	96.19 (100)	98.04 (100)	100.55 (100)	99.91 (100)

()内の数値は総回収率を 100 としたときの計算値。

^a: 非標識体を 1 日 1 回 14 日間投与、最終投与 24 時間後に標識体を単回投与。

回収率は 93~101% の範囲にあった。

尿/糞中への排泄: 投与 168 時間後までの累積経時的排泄を表 2 に示す。

表 2 排泄物中の経時的放射能の累積排泄率%

排泄物	時間 (hr)	A 単回低用量		B 反復低用量 ^a		C 単回高用量	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌
尿	0~24	1.05	0.69	0.39	0.65	0.28	0.40
	48	2.26	1.58	1.31	1.92	1.35	2.04
	72	3.31	2.28	2.77	3.59	3.35	4.51
	96	4.13	2.87	4.66	5.51	5.69	7.40
	120	4.89	3.44	7.03	7.65	7.08	8.94
	144	5.52	3.98	8.87	9.45	8.11	9.99
	168	6.06	4.43	10.29	10.77	8.80	10.70
糞	0~24	22.65	16.46	10.97	6.86	15.02	7.92
	48	33.27	24.84	14.33	13.31	17.99	11.74
	72	42.04	31.40	20.28	21.70	26.52	17.93
	96	47.83	35.56	29.31	26.91	38.44	29.43
	120	52.69	39.70	40.09	36.14	54.38	45.18
	144	56.70	43.23	52.74	46.62	63.50	52.42
	168	60.08	46.36	61.08	53.35	69.54	56.04
合計	0~168	66.14 (70.6)	50.79 (54.8)	71.37 (74.2)	64.11 (65.4)	78.35 (77.9)	66.74 (66.8)

()内の数値は総回収率を 100 としたときの計算値。

^a: 非標識体を 1 日 1 回 14 日間投与、最終投与 24 時間後に標識体を単回投与。

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

全ての群とも放射能の排泄は尿(約 5~11%)よりも糞(約 50~70%)経由が多く、尿糞の合計で約 55~78%が排泄された。単回高用量投与で糞中排泄が最も多く、投与放射能に対し雄で 70%、雌で 56%が排泄された。尿中排泄は単回高用量投与及び反復低用量投与群でほぼ同じで、投与放射能の約 10%が排泄され、単回低用量ではそれらの約半分であった。

高及び低用量では、尿は投与後 96 時間までに、糞は 120 時間後までに大部分が排泄された。反復低用量では尿及び糞とも 48 から 168 時間の間に排泄された。

組織内分布：標識体経口投与 168 時間後における組織内分布を表 3 に示す。

表 3 投与 168 時間後における組織内分布 (単位: $\mu\text{g/g}$ 右欄は投与量に対する割合%)

投与量	A 単回低用量				B 反復低用量*				C 単回高用量			
	雄		雌		雄		雌		雄		雌	
	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%
肝臓	0.28	1.97	0.31	2.03	0.57	2.66	0.67	2.71	7.02	2.55	6.66	2.55
腎臓	0.15	0.16	0.24	0.26	0.30	0.23	0.41	0.32	3.37	0.24	3.83	0.27
心臓	0.09	0.05	0.14	0.07	0.20	0.08	0.34	0.12	2.34	0.07	2.91	0.10
肺	0.14	0.10	0.21	0.15	0.33	0.18	0.53	0.31	4.07	0.19	4.70	0.26
脳	0.06	0.07	0.11	0.13	0.12	0.09	0.26	0.27	1.75	0.12	2.15	0.17
脾臓	0.05	0.02	0.08	0.03	0.12	0.02	0.22	0.03	1.65	0.02	1.87	0.03
筋肉	0.09	0.22	0.15	0.58	0.12	0.19	0.21	0.24	1.44	0.17	1.90	0.28
脂肪	1.54	0.53	2.73	1.04	1.97	0.24	3.15	0.44	18.31	0.24	50.83	0.65
生殖腺	0.06	0.12	0.49	0.04	0.28	0.52	0.65	0.04	2.49	0.39	9.74	0.07
腸+内容物	0.19	2.64	0.34	4.51	0.52	4.02	0.58	4.31	4.90	2.99	4.75	3.65
骨+骨髓	0.05	0.05	0.08	0.11	0.13	0.10	0.18	0.18	2.04	0.13	2.31	0.18
副腎	0.30	0.01	0.51	0.02	0.58	0.02	0.85	0.06	6.43	0.02	7.40	0.03
カーカス	0.15	10.99	0.23	17.43	0.15	8.25	0.23	13.92	1.76	8.21	2.43	12.99
血液	0.07	0.24	0.06	0.21	0.17	0.38	0.18	0.32	1.79	0.27	1.52	0.29
血漿	0.12	0.16	0.11	0.12	0.33	0.23	0.29	0.18	2.79	0.18	2.54	0.20
皮膚+被毛	0.34	9.03	0.60	13.83	0.28	5.06	0.43	7.43	2.66	4.03	5.06	7.85
子宮			0.25	0.10			0.42	0.11			10.43	0.30
膵臓	0.22	0.08	0.42	0.16	0.31	0.08	0.61	0.18	3.72	0.05	4.90	0.14
甲状腺	0.20	0.002	0.28	0.003	0.21	0.001	0.38	0.003	2.64	0.002	3.20	0.00
胃+内容物	0.04	0.19	0.07	0.30	0.07	0.15	0.21	0.33	1.25	0.16	2.01	0.19
合計		26.64 (38.4)		41.12 (44.3)		22.45 (23.3)		31.65 (32.3)		19.94 (21.98)		29.96 (30.0)

()内の数値は総回収率を 100 としたときの計算値。

*: 非標識体を 1 日 1 回 14 日間投与、最終投与 24 時間後に標識体を単回投与。

臓器組織内分布は各実験の総回収率を 100%としたとき、投与 168 時間後の投与放射能に対する組織中の残留は低用量単回投与(A 群)では雄で 38%、雌で 44%、低用量反復投与(B 群)では雄で 23%、雌で 32%、単回高用量投与(C 群)では雄で 22%、雌で 30%であった。組織中の濃度($\mu\text{g/g}$)はいずれの群の動物とも脂肪が最も高かった。

単回高用量投与群の組織中の平均濃度 ($\mu\text{g/g}$) は、雄の胃+内容物における $1.25 \mu\text{g/g}$ から雌の脂肪における $50.83 \mu\text{g/g}$ の範囲であった。雄では脂肪 ($18.31 \mu\text{g/g}$) が最も高く、ついで副腎 ($6.43 \mu\text{g/g}$) および肝臓 ($7.02 \mu\text{g/g}$) が高い濃度を示した。雌でも脂肪 ($50.83 \mu\text{g/g}$) が最も高く、ついで子宮 ($10.43 \mu\text{g/g}$)、卵巣 ($9.74 \mu\text{g/g}$)、副腎 ($7.40 \mu\text{g/g}$)、肝臓 ($6.66 \mu\text{g/g}$) が高い濃度を示した。雄より雌において高濃度を示した脂肪、皮膚+被毛および性腺組織 (卵巣および子宮) を除いて、雌雄とも同様の組織内濃度であった。

高用量投与群と比較したとき、低用量投与 2 群における濃度は用量依存性で、単回投与群では反復投与群より濃度が僅かに低かった。これは反復投与により分布レベルの僅かな変化があることを示している。組織内分布は単回高用量群と類似しており、脂肪が最も高濃度 (単回投与群及び反復投与群の雄で各々 1.54 及び $1.97 \mu\text{g/g}$ 、雌で各々 2.73 及び $3.15 \mu\text{g/g}$) であった。ついで、皮膚+被毛、副腎及び肝臓が高く、雌ではさらに卵巣および脾臓等が高かった。

吸収率: 尿中排泄+組織残留の合計として、投与 168 時間後の吸収率を推定し、表 4 に示す。

表 4 吸収率の算定

	A 単回低用量		B 反復低用量 ^a		C 単回高用量	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
吸収率	32.70 (35.9)	45.55 (49.1)	32.74 (34.0)	42.42 (43.3)	28.74 (28.6)	40.66 (40.7)

() 内の数値は総回収率を 100 としたときの計算値。

吸収率は全ての群で雄より雌が高かった。低用量単回投与及び反復投与ともほぼ同じで、雄で約 35%、雌で約 45% 前後であった。単回高用量では雄で約 30%、雌で約 40% であった。

薬物動態 (血中濃度推移): 低用量 (D 群) および高用量 (E 群) を単回投与した場合の血中における放射能の経時的推移を表 5 に、薬動学的パラメーターを表 6 に示す。

単回高用量群において、全血の平均 C_{max} 値は雌雄で各々 $2.31 \mu\text{g/g}$ 及び $2.03 \mu\text{g/g}$ 、 T_{max} 値は 70.52 及び 72.53 時間で、明らかな性差はなかった。消失半減期は雄で 170.10 及び雌で 220.6 時間で、雌雄間に統計学的有意差はなかった。曲線下面積 ($AUC_{0-648 \text{時間}}$) は雄 ($503.40 \mu\text{g}\cdot\text{hr/g}$) および雌 ($539.86 \mu\text{g}\cdot\text{hr/g}$) で同等のバイオアベイラビリティであった。

単回低用量群において、平均 C_{max} 値は単回高用量群での値より低かったが、その低下は用量と直接比例していなかった。 C_{max} 値は雄及び雌でそれぞれ $0.14 \mu\text{g/g}$ 及び $0.15 \mu\text{g/g}$ で、対応する T_{max} 値は各々 45.93 および 60.65 時間であった。従って、平均 T_{max}

値に僅かな性差があった。消失半減期は雄 156.26 および雌 209.90 時間であった。曲線下面積 (AUC_{0-648時間}) は雄 (33.18 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{g}$) 及び雌 (49.45 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{g}$) で、バイオアベイラビリティが雄で僅かに低かった。

表 5 単回投与後の血中における放射能の経時的推移

投与後時間 (hr)	D 単回低用量		E 単回高用量	
	雄	雌	雄	雌
0.5	0.027	0.035	0.25	0.22
1	0.059	0.052	0.35	0.27
2	0.084	0.072	0.63	0.59
3	0.092	0.084	0.60	0.50
4	0.098	0.094	0.66	0.56
6			0.73	0.67
8	0.112	0.103	0.75	0.73
24	0.133	0.129	1.34	1.53
48	0.138	0.151	1.80	2.05
72	0.128	0.142	2.01	2.28
96	0.115	0.142	1.86	1.99
120	0.098	0.125	1.61	1.69
144	0.092	0.114	1.47	1.49
168	0.079	0.103	1.17	1.17
192	0.073	0.094	1.12	1.02
216	0.061	0.081	0.99	0.93
240	0.048	0.074	0.91	0.76
264	0.042	0.070	0.67	0.60
288	0.039	0.062	0.55	0.52
312	0.035	0.057	0.49	0.47
336	0.029	0.052	0.46	0.45
360	0.026	0.049	0.39	0.31
384			0.44	0.41
408			0.31	0.33
432	0.020	0.036		
480	0.015	0.027	0.24	0.25
528	0.012	0.026	0.19	0.22
576			0.16	0.19
600	0.010	0.021		
648	0.008	0.019	0.12	0.16

空欄は試料を採取せず。

表 6 薬動態力学パラメーター

投与量	性別	T max (時間)	C max (μ g/g)	T 1/2 (時間)	AUC ₀₋₆₄₈ (μ g·hr/g)
低用量 1mg/kg	雄	45.93	0.14	156.26	33.18
	雌	60.65	0.15	209.9	49.45
高用量 10mg/kg	雄	72.53	2.03	170.1	503.40
	雌	70.52	2.31	220.6	539.86

Tmax: 最高血中濃度到達時間 Cmax: 最高血中濃度 T1/2: 血中濃度半減期
AUC₀₋₆₄₈: 血中濃度/時間(0~648h)曲線下面積

代謝物: 尿・糞中の代謝物: 表 7 に示す。

投与 168 時間後までに排泄された尿、糞の抽出液中の代謝物として、尿で 17、糞で 13 個の代謝物のピークが認められ、検体は経口投与後、広範に代謝されていることを示していた。(以下、尿中の代謝物ピークおよび糞中の代謝物ピークはそれぞれ UMET/XX および FMET/XX のようにシリアル番号で区別した。)

尿中の親化合物は微量(投与量の 0.01~0.09%)で、UMET/13(投与量の 1.33~5.49%)は尿中の主要代謝物であった。ついで、UMET/15(投与量に対し雌で 0.57~1.83%; 雄は最大 0.05%)、UMET/3(投与量の 0.13~2.35%)、UMET/5(投与量の 0.27~1.46%)、UMET/6(投与量の 0.09~0.74%)、UMET/10(投与量の 0.09~0.76%)、UMET/14(投与量に対し雌で 0.34~0.69%; 雄は最大 0.08%)が比較的多かった。尿中放射能の約 90%(投与量の約 7.8%)が同定された。

糞中の主要な成分は未変化の親化合物(FMET/12)で投与量の 28.53~44.13%を占め、その大部分は投与後 24 時間で排泄されるが、投与 168 時間後まで比較的高いレベルで検出された。ついで、FMET/10(投与量の 3.22~14.19%)、FMET/6(投与量の 1.72~5.19%)、FMET/7(投与量の 0.73~3.81%)、FMET/9(投与量の 1.52~3.32%)が比較的多かった。

表 7 投与 168 時間後までに排泄された尿、糞中の代謝物 (投与量に対する%)

試料	代謝物		A 単回低用量		B 反復低用量 a		C 単回高用量	
	ビーク	帰属	雄	雌	雄	雌	雄	雌
尿	UMET/1		1.00	0.15	0.48	0.36	0.31	0.37
	UMET/2		0.22	0.40	na	na	0.09	na
	UMET/3		0.24	0.13	2.35	2.29	0.60	0.90
	UMET/4		0.26	0.41	0.51	0.47	0.31	0.30
	UMET/5		0.97	0.53	1.46	1.20	0.27	0.89
	UMET/6		0.14	0.29	0.09	0.66	0.74	0.62
	UMET/7		0.30	0.02	na	na	na	0.03
	UMET/8		na	0.03	na	0.03	0.17	0.29
	UMET/9		0.04	0.04	na	na	na	na
	UMET/10		0.35	0.09	0.76	0.41	0.62	0.47
	UMET/11		0.04	na	na	na	na	na
	UMET/12		0.40	na	na	na	na	na
	UMET/13		2.22	1.33	4.61	3.04	5.49	4.23
	UMET/14		0.05	0.34	na	0.66	0.08	0.69
	UMET/15 (=FMET/10)		0.05	0.57	na	1.64	0.04	1.83
	UMET/16		na	0.01	na	na	na	na
	UMET/17		0.06	0.09	0.02	0.01	0.05	0.06
合計			6.07	4.43	10.28	10.77	8.77	10.68
糞	FMET/0		na	na	na	na	1.06	0.28
	FMET/1	未知物質の抱合体	0.52	0.13	4.77	2.23	0.95	2.24
	FMET/2	未知物質の抱合体	0.13	na	1.07	0.26	1.58	0.66
	FMET/3		0.10	0.06	1.04	0.37	1.43	0.66
	FMET/4	未知物質の抱合体	0.24	0.02	1.83	0.62	1.43	0.85
	FMET/5		0.61	0.37	na	na	1.05	0.78
	FMET/6		3.45	1.72	5.19	2.53	5.12	2.85
	FMET/7		1.42	0.73	3.38	2.41	3.81	3.07
	FMET/8		na	0.05	na	na	0.27	0.10
	FMET/9		2.20	1.52	3.08	2.45	3.32	2.77
	FMET/10 (=UMET/15)		7.12	3.22	12.17	7.54	14.19	7.06
	FMET/11		0.18	na	na	na	0.07	0.24
	FMET/12		44.13	38.51	28.53	35.38	43.92	39.55
合計			60.10	46.33	61.06	53.79	79.20	61.11

na : 該当なし

表中の代謝物ビークの記号は本試験における尿 (UMET/ XX) または糞 (FMET/ XX) のシリアル番号である。

酵素/酸加水分解: 単回高用量投与後 72~96 時間プール尿の酵素加水分解結果を表 8、酸加水分解の結果を表 9 に示す。また、単回高用量投与後 48~72 時間プール糞の酸加水分解の結果を表 10 に示す。

尿試料を酸加水分解した結果、UMET/14及びUMET/17は雌雄共わずかに増加し、UMET/3、UMET/4、UMET/6、UMET/15は僅かに減少した。主要代謝物のUMET/13及びUMET/10は雄ではほとんど変化がなく、雌ではわずかに増加した。これらの量は微量であったので、明確にできなかったが、極性の高い代謝物(UMET/3、UMET/4、UMET/6)はUMET/14及びUMET/17の抱合体であると推定された。

表8 単回高用量投与後72~96時間プール尿の酵素加水分解

代謝物 ビーク	雄					雌				
	酵素無処理		酵素処理			酵素無処理		酵素処理		
	4°C	37°C	sul	β -glu	sul+ β -sac	4°C	37°C	sul	β -glu	sul+ β -sac
UMET/1	0.05	0.06	nd	0.04	nd	0.05	0.04	nd	0.04	0.02
UMET/2	0.04	0.03	0.02	0.02	nd	nd	nd	nd	nd	nd
UMET/3	0.12	0.11	0.14	0.12	0.14	0.19	0.17	0.19	0.18	0.20
UMET/4	0.05	0.03	0.03	0.03	0.05	0.03	0.03	0.02	0.02	0.04
UMET/5	nd	nd	nd	nd	nd	0.06	0.05	0.04	0.03	0.07
UMET/6	0.03	0.04	0.05	0.03	0.05	0.09	0.10	0.10	0.11	0.10
UMET/8	nd	0.02	0.03	0.02	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.05
UMET/10	0.25	0.23	0.28	0.24	0.25	0.20	0.19	0.22	0.20	0.20
UMET/11		0.03	0.02	0.01	0.02	0.02	nd	nd	0.03	nd
UMET/13	1.75	1.77	1.78	1.81	1.77	1.46	1.50	1.50	1.48	1.50
UMET/14	0.02	0.01	nd	nd	0.01	0.14	0.12	0.14	0.13	0.12
UMET/15	0.02	0.02	nd	nd	0.02	0.63	0.66	0.65	0.64	0.59
UMET/17	0.01	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd: 検出なし

Sul: スルファターゼ β -glu: β -グルクロニダーゼ

sul+ β -sac: スルファターゼ+ β -サッカロラクトン

表中の代謝物の記号(UMET/XX)は本試験における尿のシリアル番号である。

表9 単回高用量投与後72~96時間プール尿の酸加水分解

試料	代謝物	雄		雌	
		水	1M HCl	水	1M HCl
尿	UMET/3	0.07	0.04	0.06	nd
	UMET/4	0.08	0.01	0.04	nd
	UMET/5	nd	nd	0.18	0.04
	UMET/6	0.14	0.02	0.12	nd
	UMET/8	0.03	0.01	0.05	0.12
	UMET/10	0.23	0.22	0.19	0.27
	UMET/13	1.74	1.74	1.47	1.70
	UMET/14	0.02	0.19	0.16	0.20
	UMET/15	0.01	nd	0.63	0.29
	UMET/17	0.02	0.12	0.01	0.27

nd: 検出なし

表中の代謝物の記号(UMET/XX)は本試験における尿中代謝物のシリアル番号である。

表 10 単回高用量投与後 48~72 時間プール糞の酸加水分解

試料	代謝物	雄		雌	
		水	1M HCl	水	1M HCl
糞	FMET/6	0.46	0.50	0.26	0.23
	FMET/7	0.36	0.21	0.25	0.14
	FMET/9	0.27	nd	0.16	nd
	FMET/10	1.32	0.76	0.79	0.47
	FMET/12	3.74	4.76	2.92	3.52

nd: 検出なし 表中の代謝物の記号 (FMET/XX) は本試験における糞中代謝物のシリアル番号である。

糞試料を酸加水分解した結果、雌雄共 FMET/12 は大きく増加し、FMET/9 及び FMET/10 は減少していることから、後者は FMET/12 の抱合体と推定された。FMET/12 はほとんど変化がないことから抱合体ではないと推定された。FMET/7 は減少したが、明確にできなかった。

投与 168 時間後までに排泄された尿及び糞の抽出液中の代謝物、尿で 17、糞で 13 個のうち、UMET/17 及び FMET/12 は親化合物 ()、UMET/13 及び FMET/6 は、UMET/10 は、FMET/7 は の、FMET/9 及び UMET/14 は の、FMET/10 及び UMET/15 は の、UMET/3 は の、UMET/8 は のとして同定され、尿中放射能の約 90% (投与量の約 7.8%)、また糞中放射能の約 92% (投与量の約 55%) が同定された。

組織 (肝臓、脂肪、皮膚及びカーカス) 中の各抽出液中の唯一の放射性成分は未変化の親化合物で、投与量の約 22% を占めていた。

構造が推定あるいは同定された代謝物は合計で投与量の約 86% であった。

結論として、 $[^{14}\text{C}]$ - を雌雄ラットに 1mg/kg (標識体単回及び非標識体 14 回投与+標識体単回) 及び 10mg/kg (標識体単回) で経口投与した。放射能の排泄は尿 (約 5~11%) よりも糞 (約 50~70%) 経由が多く、尿糞の合計で約 55~78% が排泄された。比較的よく吸収され、低用量では単回投与及び反復投与ともほぼ同じで、雄で約 35%、雌で約 45% 前後が、単回高用量では雄で約 30%、雌で約 40% が吸収された。

組織中の残留は比較的多く、単回低用量投与で 38~44%、反復低用量投与で 23~32%、単回高用量投与で 22~30% が残留し、放射能は組織に広範に分布し、脂肪が最も高く、ついで副腎、肝臓、子宮、卵巣、皮膚+被毛の残留が多かった。

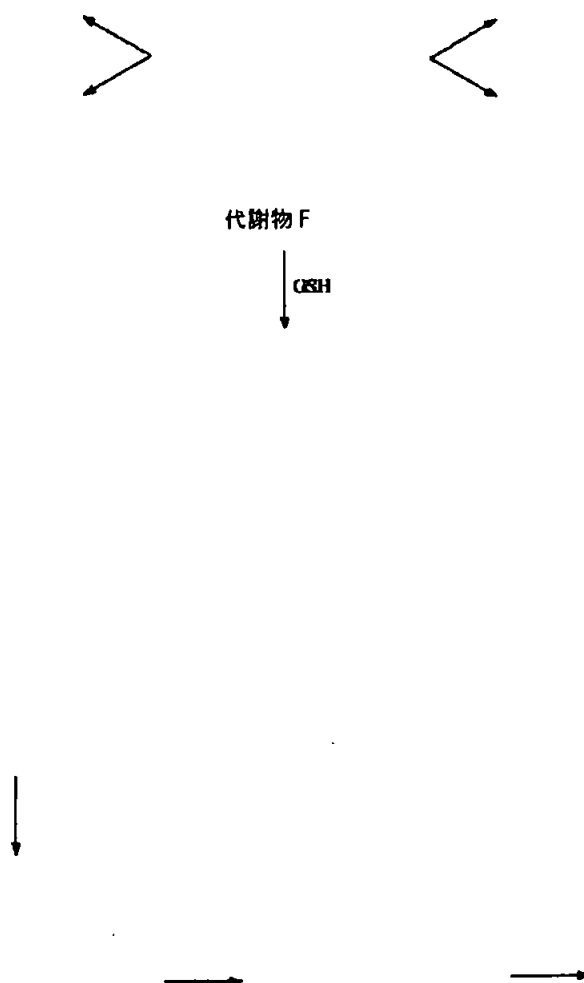
薬動態力学パラメーターに雌雄間の差はなく、排泄は緩慢で消失半減期は 156~220 時間と比較的長かった。

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

尿中放射能の約 90% (投与量の約 7.8%)、
また糞中放射能の約 92% (投与量の約 55%) が同定された。組織 (肝臓、脂肪、皮膚及びカ
ーカス) 中の各抽出液中の唯一の放射性成分は未変化の親化合物で、投与量の約 22% を占
めていた。

想定代謝経路を以下に示す。



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

10-2. 代謝物 B: (動植物、土壌、水中光の代謝/分解物)

10-2-1. 急性毒性試験

(1) ラットにおける急性経口毒性試験 (資料 57)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作製年:

検体純度: ()

試験動物: Cr1: CD(SD)BR 系ラット、4~6 週齢、体重: 雄 110~150g、雌 101~134g、1 群雌雄各 5 匹、但し 160 及び 250mg/kg 群は雌雄各 10 匹

試験期間: 14 日間観察

試験方法: 検体をコーンオイル中に懸濁し、10mL/kg の容量で投与 4 時間前から絶食させた動物に単回強制経口投与した。

試験項目: 中毒症状及び生死を 14 日間毎日観察した。死亡動物及び試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

試験結果:

投与方法	経口		
投与量 (mg/kg)	雄雌 64、100、160、250、400、640		
LD ₅₀ 値 (mg/kg) (95 % 信頼区間)	雄 184 (104~312)	雌 257 (158~490)	雌雄 218 (97~670)
死亡開始及び終了時間	投与後 2 日に開始、投与後 3 日に終了		
症状発現及び消失時期	投与後 2 時間に発現、投与後 5 日に消失		
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	64		

中毒症状として立毛、うずくまり姿勢、よろめき歩行、嗜眠、四肢の蒼白、下痢等が多数例に認められ、呼吸数低下、運動失調、流涎過多及び間代性痙攣が数例に認められた。

死亡例は体重の減少がみられた。

解剖では生存例及び死亡例とも、主要な組織器官に特記すべき肉眼的異常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) ラットにおける急性経皮毒性試験

(資料 58)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作製年:

検体純度: ()

試験動物: Cr1: CD(SD)BR 系ラット、約 7~10 週齢、体重: 204~249g、1 群雌雄各 5 匹

試験期間: 14 日間観察

試験方法: 投与前日に背部の被毛を刈った。検体は、蒸留水で 88.2%w/v の濃度とし、2.27 mL/kg を刈毛部位に塗布して 24 時間閉塞貼付した。被覆除去後、処置部位から検体を除去した。

試験項目: 中毒症状及び生死を 14 日間毎日観察した。試験終了時に全例の適用部位を含む組織の肉眼的病理検査を実施した。

試験結果:

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	雄雌 2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄雌 2000 以上
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2000

中毒症状及び死亡は認められなかった。

剖検所見では、主要な組織器官に特記すべき変化は認められなかった。

また、投与部位の皮膚に刺激性の変化及びその他の異常は認められなかった。

10-2-2. 変異原性試験

(1) 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 59)

試験機関：

報告書作製年：

検体純度： (代謝物 B)

方 法： ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella tryphimurium*, 4 菌株 (TA98, TA100, TA1535, TA1537) 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。検体を溶解させるため、ジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。検体処理区は 3 連制、溶媒及び陽性対照区は 5 連制で行った。

用量設定根拠： TA100 を用いた用量設定試験において、用量 8、40、200、1000、5000 $\mu\text{g}/$ プレートと溶媒対照と陽性対照を用いて実施した。これらの処理により、S-9 mix 非存在下では上の 3 つの用量で、S-9 mix 存在下では最高用量で毒性が認められた。そこで実験 1 では、S-9 mix 非存在下では 200 $\mu\text{g}/$ プレート、非存在下では 500 $\mu\text{g}/$ プレートを最大用量とした。しかし、S-9 mix 非存在下及び存在下とも、実験 1 では最高用量の処理でのみ再び毒性が認められた。そこで、実験 2 では最高用量を、S-9 mix 非存在下で 150 $\mu\text{g}/$ プレート、存在下で 400 $\mu\text{g}/$ プレートに変更し、さらに濃度を狭い間隔で設定した。

結 果： 結果は次頁の表に示す。

検体は代謝活性化系の有無に係わらず、菌株の生育阻害を起こさない最高用量 (S-9 mix 非存在下で 150 $\mu\text{g}/$ プレート、存在下で 400 $\mu\text{g}/$ プレート) においても、いずれの菌株にも復帰変異コロニー数の増加を認めなかった。

一方、陽性対照として用いたアジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、2-ニトロフルオレン、2-アミノアントラセンでは、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。

復帰変異性試験結果（検体処理区は3、溶媒及び陽性対照区は5プレートの平均値）

	薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9Mix 有無	復帰変異コロニー数/プレート				
				塩基置換		フレームシフト		
				TA98	TA100	TA1535	TA1537	
試験 1	溶媒対照 (DMSO)	-	-	23.4	72.0	22.8	10.8	
	検体	0.32	-	24.7	87.0	42.0	16.3	
		1.6	-	22.7	79.0	31.0	6.3	
		8	-	20.0	134.0	29.7	12.0	
		40	-	21.3	96.7	24.0	9.0	
		200	-	19.0	66.5	28.7	7.7	
	溶媒対照 (DMSO)	-	+	35.6	131.4	19.2	10.0	
	検体	0.8	+	21.0	140.3	26.0	8.0	
		4	+	27.7	136.0	20.7	8.7	
		20	+	39.3	127.3	26.7	10.0	
		100	+	26.0	130.7	20.3	13.7	
		500	+	21.7	143.7	19.7	13.7	
	陽性対照	アジ化ナトリウム	2	-		639.2	865.0	
		9-アミノアクリジン	50	-				320.0
		2-ニトロフルオレン	50	-	927.8			
		2-アミノアントラセン	5	+	412.8	806.2		
試験 2	溶媒対照 (DMSO)	-	-	17.8	76.4	17.8	10.4	
	検体	12.5	-	21.3	63.0	14.0	9.7	
		25	-	18.3	84.0	18.7	15.0	
		50	-	21.3	75.3	19.7	18.0	
		100	-	28.0	73.0	15.7	16.0	
		150	-	27.0	68.0	15.7	12.3	
	溶媒対照 (DMSO)	-	+	31.4	107.4	23.0	11.4	
	検体	25	+	23.7	101.7	21.3	10.0	
		50	+	26.0	99.3	24.0	10.7	
		100	+	26.0	102.0	19.0	11.3	
		200	+	33.7	94.7	21.7	8.7	
		400	+	32.3	96.3	16.0	8.7	
	陽性対照	アジ化ナトリウム	2	-		730.8	245.4	
		9-アミノアクリジン	50	-				432.2
		2-ニトロフルオレン	50	-	996.0			
		2-アミノアントラセン	5	+	329.8	410.6		

(2) ヒトリンパ球を用いる *in vitro* 染色体異常試験

(資料 60)

試験機関：

報告書作製年：

検体純度： (代謝物 B)

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、最終濃度 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、25 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。評価は各培養の 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 S-9 Mix 存在下及び非存在下で各々 80 及び 69% 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：次表に示す。

代謝活性化の有無に係らず、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、本試験条件下では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。

表 2 ドナーの各培養の染色体異常出現数の合計値

処理	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	S-9 mix	観察 細胞数	キヤ プ	異常を有する細胞数					異常細胞数(%)			有糸 分裂 指数
					染色体		染色分体		その他	キヤ プ を含む	構造+ 数的 異常	構造 異常	
					欠失	交換	欠失	交換					
DMSO	0	-	200	3	1	0	1	0	4	4.5	3	1	3.4
検体	75		200	5	0	1	0	0	2	4	1.5	0.5	2.7
	150		200	7	0	0	4	0	0	5	2	2	0.9
	300		167	0	0	0	1	0	0	0.6	0.6	0.6	1.1
MMS	100		75	6	6	0	10	8	0	28↑	23↑	23↑	
DMSO	0	+	200	4	1	1	2	0	1	4	2	1.5	3.4
検体	75		200	3	3	1	5	0	1	4.5	3	3	2.9
	150		200	5	1	0	3	0	0	4.5	2	2	2.1
	300		115	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
CPA	25		67	8	10	0	28	7	0	39↑	30↑	30↑	
DMSO#	0	+	200	1	0	0	1	0	0	1	0.5	0.5	4.6
検体#	300		200	12	1	0	4	0	0	9	3	2.5	1.4
CPA#	25		50	30	17	0	29	8	7	68↑	60↑	60↑	

統計学的手法：カイ二乗検定 ↑: $p < 0.001$

MMS:メチルメタンサルホネート CPA:シクロホスファミド

#: 300 $\mu\text{g/l}$ の処理区の観察細胞数が少なかったため再実施

10-3. 代謝物 C: (動植物、土壌中の代謝物、水中光分解物)の毒性試験

10-3-1. 急性毒性試験

(1) ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 61)

試験機関: (英国)

報告書作製年:

検体純度: (代謝物 C)

試験動物: Cr1: CD(SD)BR 系ラット、5~8 週齢、体重: 142~215g、1 群雌雄各 5 匹 但し、176 及び 299mg/kg 投与群は雄のみ

試験期間: 14 日間観察

試験方法: 検体を蒸留水に懸濁させ、投与前日から絶食させた動物に 20mL/kg の容量で単回強制経口投与した。

試験項目: 中毒症状及び生死を 14 日間毎日観察した。死亡動物及び試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

試験結果:

投与方法	経口		
投与量 (mg/kg)	雄雌 176、299、506、865、1471、2500		
LD ₅₀ 値 (mg/kg) (95%信頼区間)	雄 464 (202-850)	雌 732 (314-1225)	雌雄 580 (174-829)
死亡開始及び終了時間	投与後 24 時間内に開始、投与後 4 日に終了		
症状発現及び消失時期	投与後 15 分に発現、投与後 11 日に消失		
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 176 雌<506		

中毒症状として、立毛、被毛の汚染、鼻周囲の汚染が認められた。

剖検所見では、胃粘膜の障害痕 (変色・出血・ガス充満など) および腸管腔内の出血痕がみられた。

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

(2) ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 62)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作製年:

検体純度: (代謝物 C)

試験動物: Sprague Dawley 系ラット、11~12 週齢、体重: 雄 300~378g、雌 207~255g、1 群雌雄各 5 匹

試験期間: 14 日間観察

試験方法: 検体をコーンオイルに懸濁させ、一晚絶食させた動物に 10mL/kg の容量で単回強制経口投与した。

試験項目: 中毒症状及び生死を 14 日間毎日観察した。死亡動物及び試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

試験結果:

投与方法	経口		
投与量 (mg/kg)	雄雌 0、50、65、90、120		
LD ₅₀ 値 (mg/kg) (95%信頼区間)	雄 69 (52~90)	雌 100 (77~129)	雌雄 83 (67~101)
死亡開始及び終了時間	投与当日開始、投与後 7 日に終了		
症状発現及び消失時期	投与当日発現、投与後 14 日に消失		
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 50、雌 65		

中毒症状として、過剰な跳び上り、自発運動の亢進、振戦、硬直性痙攣、取り扱い時にうずくまり、円背位、鎮静、自発運動の低下等が認められた。

剖検所見では、死亡動物で胃のガス膨満がみられ、死後の変化と考えられた。生存動物で投与の影響と考えられる肝臓の腫大がみられた。

(3) ラットにおける急性経皮毒性試験

(資料 63)

試験機関:

報告書作製年:

検体純度: (代謝物 C) 純度不明

試験動物: Cr1: CD(SD)BR 系ラット、平均体重: 150~200g、1 群雌雄各 5 匹

試験期間: 14 日間観察

試験方法: 投与前日に背部被毛を刈った。翌日、検体をそのまま皮膚表面に塗り広げ、処置部位を被覆し 24 時間閉塞貼付した。被覆除去後、適用部位の検体を除去した。

試験項目: 中毒症状及び生死を 14 日間観察した。死亡動物及び試験終了時の全生存動物について、適用部位を含む組織の肉眼的病理検査を行った。

試験結果:

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	雄雌 250、500、4000
LD ₅₀ 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	雄: 4000 > >500 雌: 4000 > >500
死亡開始及び終了時間	投与後 3 日に開始、投与後 5 日に終了
症状発現及び消失時期	投与直後に発現、投与後 10 日に消失
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	500

中毒症状として、雌雄に関係なく鼻周囲の汚染、立毛、血涙、痙攣が 4000mg/kg 群のみに認められた。

剖検所見では、主要な組織器官に特記すべき変化は認められなかった。
また、投与部位の皮膚に刺激性の変化及びその他の異常は認められなかった。

10-3-2 代謝物 C()の垂急性毒性

(1)ラットを用いた垂急性毒性試験

(資料 64)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作製年:

検体純度: (代謝物 C)

試験動物: Sprague-Dawley CD 系ラット、4~5 週齢、体重: 雄 127~150g; 雌 133~153g、1 群
雌雄 各 10 匹

試験期間: 13 週間(12 月 6 日~ 3 月 13 日)

投与方法: 検体を粉末飼料に混入して 300ppm の飼料を調製し、これを順次希釈して 50、25 及び 10ppm の飼料を調製した。13 週間にわたって混餌投与した。対照群の動物には基礎飼料のみ投与した。混餌は毎週調製した。

用量設定根拠: 同試験機関において、同系統ラット(雌雄各 5 匹/群)に対し、検体を 0、20、60、170、500、および 1500ppm になるように飼料へ混入し、28 日間摂取させた試験において以下のような症状が認められた。

1500ppm: 投与 1 週目に全個体が死亡。

500ppm: 投与 1 週目に雌 2 匹が死亡。投与初期の摂食量の低下、ヘモグロビン及び赤血球数の軽度低下、血小板増加(雄のみ)、プロトロンビン時間の軽度短縮(雌のみ)、血液生化学検査ではタンパクの増加、血糖(雄のみ)、アミノトランスフェラーゼ活性、カリウム及びビリリン(雌のみ)の低下。肝重量及び甲状腺相対重量(雄のみ)の増加、肺重量及び胸腺相対重量の低下(雌のみ)が認められた。

170ppm: 投与初期の体重増加の抑制。血小板の増加(雄のみ)、プロトロンビン時間の短縮(雌のみ)、血液生化学ではアミノトランスフェラーゼ活性の低下、タンパクの増加、肝重量の増加(雌のみ)、肺相対重量及び胸腺相対重量の低下(雌のみ)及び甲状腺相対重量の増加(雄)が認められた。

60ppm: 血清アミノトランスフェラーゼ活性の低下、血清タンパクの増加、肝重量の増加(雌のみ)および肺重量の低下(雌のみ)が認められた。

20ppm: 血清 AST 活性の低下(雌のみ)、血清タンパク量の軽度増加が認められた。

以上、500ppm 以上は致死的毒性を示したが、20 及び 60ppm は変化がなく、170ppm が最小毒性用量と考えられ、これらの結果をもとに本試験の用量を設定した。

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。

300ppm 群の雄で、震毛の損傷が 2 週から大部分の動物に認められ、鼻漏の発生頻度が対照群よりわずかに多かった。

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。

次表に試験期間中の体重増加の対照群に対する比率を有意差のみられた群について示す。

投与後週	性別/投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	10	25	50	300	10	25	50	300
1~13 週				89↓				

統計学的方法：Student t-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。

300ppm 群雄でのみ、体重増加が投与 13 週間で有意に低下した。同群の雌では、1 週のみ対照群より少なかった(対照群の 69%)。

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に比べて低下した(対照群に対し雄 84%、雌 85%)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 週目に対照群に比べて低下したが、その後対照群との差はみられなかった。

	投与後週	性別/投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		10	25	50	300	10	25	50	300
摂餌量	1 週				84				85
	1~13 週				98				97
食餌効率*	1 週				146				125
	1~13 週				111				95

*：摂餌量 g/体重 g の対照群に対する比率

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。

検体摂餌量；投与期間中の 1 日当たり平均検体摂餌量は以下のとおりである。

投与量 (ppm)	10ppm		25ppm		50ppm		300ppm	
性別	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
摂取量 (mg/kg)	0.69	0.81	1.77	2.15	3.54	4.14	21.49	24.55

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、歩行と姿勢の異常、振戦あるいは他の運動障害の有無

投与に起因すると考えられる異常所見はみられなかった。

血液学的検査：投与 13 週目の全生存動物を対象として一晩絶食後、眼窩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。

表のように対照群に比し有意な種々の変化が認められたが、これらの差は軽微で、雌雄のいずれかに生じ、また用量関連性もないので、投与に関連がないと考えられた。

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

検査項目	性別/投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	10	25	50	300	10	25	50	300
ヘマトクリット値					97↓		96↓	
ヘモグロビン濃度							96↓	
平均赤血球血色素濃度			103↑					
平均赤血球容積		96↓						96↓
平均赤血球血色素量								95↓
総白血球数				81↓				
リンパ数	79↓			81↓				
血小板数						112↑		
プロトロン時間	104↑							96↓

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。

血液生化学的検査; 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、クレアチンホスホキナーゼ、総蛋白、タンパク分画、グルコース、ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、コレステロール、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下表に示す。

検査項目	性別/投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	10	25	50	300	10	25	50	300
アルカリホスファターゼ				127↑		128↑		
アラニンアミノトランスフェラーゼ		143↑		143↑	80↓		80↓	
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ					80↓	87↓	75↓	78↓
クレアチンホスホキナーゼ								151↑
尿素窒素	132↑	123↑	150↑	127↑			130↑	
グルコース					115↑	110	116↑	121↑
コレステロール								173↑
総タンパク	106↑	106↑	107↑	112↑			107↑	109↑
α ₁ グロブリン	123↑	115↑	123↑	131↑			117↑	125↑
α ₂ グロブリン	167↑	167↑	167↑	167↑	125↑			150↑
A/G 比	89↓	89↓	89↓	89↓				90↓
ナトリウム	101↑			101↑				
塩素	101↑		101↑		98↓			98↓
カルシウム				104↑		96↓		104↑
無機リン								118↑

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。

50 及び 300ppm 群雌雄の総タンパクが対照群に比べて高値を示した。10 及び 25ppm 群の雄も有意に高かったが、これらは軽微であり、用量依存性などもないことから、毒性学的意義はないと考えられた。タンパク画分の検査で α -1 グロブリンの軽度増加がみられた。

300ppm 群雌のコレステロール及び無機リンの軽度増加がみられたが、雄は対照群と差がなかった。総蛋白、 α -グロブリン、無機リン等の変化は肝臓代謝の軽微な変化を生じているものと考えられた。

その他に有意な種々の変化が 300ppm 群雌雄のカルシウムの高値を含め認められたが、これらの差は軽微で、雌雄いずれかに生じ、また用量関連性もないので、投与に関連がないと考えられた。

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。

概観、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

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	性別/投与量 (ppm)									
	雄					雌				
	0	10	25	50	300	0	10	25	50	300
pH	6.6	6.7	6.6	6.6	6.9↑	6.2	6.3↑	6.3	6.1↓	6.3
比重	1.054	1.047↑	1.058	1.054	1.050	1.069	1.066	1.078↑	1.081↑	1.066

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

300ppm 群の雄で pH の有意な高値が認められたが、対照群 (pH の範囲 6.1~7.3) の変動の範囲内であり投与の影響ではないと考えられる。その他の pH の変動および比重の変動は用量関連性もなく、投与関連性の影響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、肺及び主気管支、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

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			
		10	25	50	300	10	25	50	300
甲状腺	重量			150↑	200↑			135↑	143↑
	対体重比			156↑	215↑			128	145↑
肝臓	重量			109	121↑		113	116	138↑
	対体重比			116↑	134↑		115↑	112↑	138↑
副腎	対体重比			118↑					

統計学的手法：Dunnett t-検定 または Behren-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。

甲状腺及び肝臓の重量及び対体重比は 50 及び 300ppm 群の雌雄で有意な高値あるいは高値傾向が認められた。同様の傾向が 25ppm 群雌の肝臓でも認められた。肝臓に病理組織学的所見がないことから、重量の変化は投与に対する適応変化と考えられた。副腎の対体重比の増加は用量関連性もなく、絶対重量にも変化がないので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について剖検を行った。

投与に起因すると考えられる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、大腿骨骨髓の塗抹標本はメイ-グリュンワルド-ギムザ染色して病理標本を作製した。検鏡は対照群及び 300ppm 群の全動物、並びに 10、25 及び 50ppm 群の全動物の甲状腺及び上皮小体並びに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)、大腿骨及び関節面、大腿骨骨髓、胸骨、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、陰、脳、下垂体、坐骨神経(左)、骨格筋、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	10	25	50	300	0	10	25	50	300
甲状腺	濾胞上皮肥大	0	0	1	2	10↑	0	0	0	1	6↑
	濾胞細胞過形成	0	0	0	0	9↑	0	0	0	0	4

統計学的手法：Fisher の直接確立検定法(両側) ↑: p<0.05 ↑↑: p<0.001

300ppm 群雌雄で甲状腺濾胞上皮肥大及び濾胞細胞過形成の増加が認められた。
50ppm 群の雌雄及び 25ppm 群の雄でも少数例（1～2/10 例）に濾胞上皮肥大が認められた。これ以外に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、代謝物 C（ ）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、標的臓器は肝臓及び甲状腺であった。

300ppm 群において、試験開始 1 週に摂餌量のわずかな低下、体重増加の抑制（雄）、甲状腺及び肝臓の重量増加、総蛋白、 α -グロブリン、高コレステロール血症（雌）、無機リン（雌）の軽度増加が認められた。甲状腺では濾胞上皮肥大あるいは濾胞細胞過形成がみられた。

50ppm 群でも総蛋白及び α -グロブリンの軽度増加、甲状腺の重量増加及び肝臓の相対重量のみの増加、1～2/10 例に甲状腺濾胞上皮肥大が認められ、25ppm 群の雄で甲状腺濾胞上皮肥大が 1/10 例認められた。雌では肝臓の相対重量のみの増加が認められた。10ppm 群では検体の投与に起因する毒性影響は認められなかったので、無毒性量 (NOAEL) は 10ppm (雄 0.69mg/kg/日、雌 0.81mg/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

(2) 代謝物 C : のイヌを用いた 4 週間経口(カプセル)投与予備毒性試験 (資料 65)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作製年:

検体純度: (代謝物 C)

試験動物: 純系ビーグル犬、28~51 週齢、体重: 雄 9.9~14.1kg; 雌 9.6~12.0kg、
1 群雌雄各 2 頭

試験期間: 4 週間(11 月 22 日~ 12 月 21 日)

投与方法: 検体を用量 1、5 及び 15mg/kg/日でゼラチンカプセルに充填して 4 週間、給餌後に経口投与した。対照群には空のカプセルを同様に投与した。

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。

投与に起因する一般状態の変化も、死亡も認められなかった。

体重変化: 毎週 2 回、全ての動物の体重を給餌前に測定した。

投与終了時の体重を次表に示す。

	性別/投与量 (mg/kg)							
	雄				雌			
	0	1	5	15	0	1	5	15
体重 (kg)	12.4	12.8	12.8	13.1	11.2	10.9	11.3	11.4
体重増加 (kg)	0.4	0.6	0.8	0.7	0.6	0.4	0.5	0.1

15mg/kg 投与群の雌の体重増加は対照群に比しわずかに抑制された。

1 及び 5mg/kg 群では対照群と同等であった。

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。

試験期間中の合計摂餌量の対照群に対する各群の比率 (%) を次表に示す

	性別/投与量 (mg/kg)					
	雄			雌		
	1	5	15	1	5	15
合計摂餌量	100	100	100	100	99	94

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

15mg/kg 投与群の雌 1 例の摂餌量は投与前値及び最初の 2 週間の対照群の値よりわずかに少なかった(対対照比 83%) が、残りの雌 1 例及び雄、並びに 1 及び 5mg/kg 群では投与の影響は認められなかった。

獣医学的検査：投与開始前及び投与 26 日後に、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

いずれの群とも、投与に起因する影響は認められなかった。

神経機能検査：投与前に 1 回、投与 27 日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

いずれの群とも、投与に起因する神経学的影響は認められなかった。

血液学的検査：投与前及び投与 26 日後の投与前に、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、正赤芽球)、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

次表のように、15mg/kg 群の雌は対照群及び投与前値と比べ、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、赤血球数がわずかに高値を示した(対対照比はそれぞれ 109%、110%、109%)。同群の雄及びその他の群の雌雄に投与に起因する影響は認められなかった。

検査項目	検査時期	性別/投与量 (mg/kg)							
		雄				雌			
		0	1	5	15	0	1	5	15
ヘマトクリット (%)	投与前	44	41	38	40	42	39	44	43
	試験 26 日	47	46	39↓	44	45	44	46	49
ヘモグロビン (g%)	投与前	14.5	13.8	12.7	13.4	14.2	13.1	15.1	14.5
	試験 26 日	15.6	14.9	12.9↓	14.5	14.5	14	15.1	15.9
赤血球数 (mil/cmm)	投与前	6.33	6.25	5.48↓	6.02	6.24	5.88	6.82	6.35
	試験 26 日	6.68	6.66	5.43↓	6.47	6.35	6.25	6.82	6.95

統計学的手法：併合誤差分散を用いる Student t-検定 ↓: p<0.05

血液生化学的検査；血液学的検査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、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、総タンパク、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。

検査項目	性別/投与量 (mg/kg)					
	雄			雌		
	1	5	15	1	5	15
アルカリホスファターゼ		111	141↑		75	110
ALT		65↓				
α2グロブリン					129↑	
塩素			96↓			
無機リン						121↑

統計学的手法：併合誤差分散を用いる Student t-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。

アルカリホスファターゼ活性の軽微な亢進が投与前値に比し、15mg/kg 群の雌雄全例 (投与前値に比し雄 111%、雌 113%) 及び 5mg/kg 群の雄全例 (2 例) (投与前値に比し 113%)、雌 1 例 (投与前値に比し 118%) で認められた。その他に投与に起因する明らかな変化はみられなかった。

眼科学的検査；投与開始前及び投与 26 日後は全動物を対象として検査した。

投与に起因する眼の変化はみられなかった。

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。

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

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

いずれの群とも、投与に起因する変化は認められなかった。

肉眼的病理検査：投与終了時の全動物について剖検を行った。

いずれの群とも、投与に起因する肉眼的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製し、検鏡した。

脳、腎臓、肝臓、坐骨神経(左)、脊髄

いずれの群とも、投与に起因する病理組織学的変化は認められなかった。

以上、フィプロニルの代謝物 C である を 15mg/kg までの用量をビーグル犬に 4 週間強制経口投与した。その結果、15mg/kg 群の雌で軽微な摂餌量の減少を伴う体重増加の抑制がみられた。また、同群の雌で軽度の血色素濃度の高値及び 5mg/kg 群でアルカリホスファターゼ活性の軽微な亢進がみられたが、腎臓及び肝臓に組織学的変化は認められなかった。

以上より、ビーグル犬に対する無作用量 (NOEL) は 1 mg/kg と判断した。次の毒性試験の最高用量として 15mg/kg が推奨される。

10-3-3. 変異性試験

(1) 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 66)

試験機関：

報告書作製年：

検体純度： (代謝物 C) 純度不明

方法： ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella tryphimurium*, 5 株 (TA98, TA1538, TA100, TA1535, TA1537) 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、1.6~1000 μg /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： TA98 を用いた用量設定試験において、1.6~5000 μg /プレートの範囲の 6 用量で、細胞毒性について本試験と同様に行い、処理 24 時間後にバックグラウンドコロニー数を評価した結果、200 μg /プレート以上の用量で生育阻害が認められ、1000 μg /プレート以上の用量で検体の沈殿が認められたので、本試験の最高濃度を 1000 μg /プレートとした。

結果： 結果は次頁の表に示す。

検体は代謝活性化系の有無に係わらず、1000 μg /プレートの用量で全試験菌株に毒性を示し、S-9mix の非存在下で 200 μg /プレートの用量でほとんどの試験菌株に毒性を示した。また、代謝活性化系の存在下において、1000 μg /プレート用量で沈殿が認められた。

このような試験条件下で、いずれの菌株も代謝活性化系の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数の増加を認めなかった。

一方、陽性対照として用いたアジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、2-ニトロフルオレン、2-アミノアントラセンでは、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。

表 復帰変異性試験結果 (3 プレートの平均値)

	薬物	濃度 (μg /プレート)	S-9Mix 有無	復帰変異コロニー数/プレート					
				TA1535	TA1537	TA1538	TA98	TA100	
試験 1	溶媒対照 (DMSO)	-	-	9	8.3	12.3	16.7	95.7	
	検体	1.6	-	12.5	5.3	12	13.7	103	
		8	-	12.3	12	15.3	12.3	94.7	
		40	-	7	15.3	14.7	11.3	88.7	
		200	-	6.0a	55.0a	11.3	24.7a	84	
		1000	-	53.0ac	22.3a	19.0a	60.0a	94.7a	
	溶媒対照 (DMSO)	-	+	8.3	5.3	11.7	18	84.3	
	検体	1.6	+	4	2.3	8.7	13	87.7	
		8	+	4.7	6	6.7	12.7	82.3	
		40	+	6	5	6	11.7	78	
		200	+	5	5.3	7	10.7	69.7	
		1000	+	18.0ac	46.0ac	8.0ac	18.0ac	78.0ac	
	陽性対照	アジ化ナトリウム	1	-	144.5				320
		9-アミノアクリジン	50	-		1117			
2-ニトロフルオレン		0.5	-			147.5	135		
2-アミノアントラセン		2	+	104.3	36.7	121.7	165.7	274	
試験 2	溶媒対照 (DMSO)	-	-	7.3	6.7	7.3	14.5	86.7	
	検体	1.6	-	12.3	9.3	8.3	10.3	73.3	
		8	-	7.7	7.7	6	13.3	70	
		40	-	8	4	5.7	12.3	59.3	
		200	-	8.3a	21.3a	5.7a	13.0a	43.3a	
		1000	-	36.3a	132.3a	6.7a	14.3a	35.0a	
	溶媒対照 (DMSO)	-	+	9.3	6	15.3	16	90.3	
	検体	1.6	+	6.7	6.7	11.7	16.3	85	
		8	+	10	9	13.7	9.7	85	
		40	+	9	9.7	15.7	10.3	82.3	
		200	+	7	7	17	15.3	72.3	
		1000	+	8.3ac	14.7ac	15.3ac	20.3ac	74.3a	
	陽性対照	アジ化ナトリウム	1	-	340.7				661.3
		9-アミノアクリジン	50	-		1448.3			
2-ニトロフルオレン		0.5	-			93.3	151.7		
2-アミノアントラセン		2	+	72.3	40.7	131.3	350.7	247	

a: 背景ローンの減少 c: 沈殿の発生

(2) 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 67)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作製年：

検体純度： (代謝物 C)

方 法： ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella tryphimurium*、4 株 (TA98、TA100、TA1535、TA1537) 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、10~250 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。

なお、TA1537 は試験 1 の S9 の非存在下で、陽性対照の値が当研究室の正常の範囲から外れていたため、試験を繰り返した。

用量設定根拠： TA98 を用いた用量設定試験において、1~5000 μ g/プレートの範囲の 9 用量で細胞毒性を 2 連制で試験した結果、250 μ g/プレート以上で沈殿が認められ、さらに、2500 μ g/プレート以上では評価が困難であった。バックグラウンドコロニーの生育阻害が 250 μ g/プレート以上で認められたため、本試験の最高濃度を 250 μ g/プレートとした。

結 果： 結果は次頁の表に示す。

代謝活性化系の非存在下で、250 μ g/プレートの用量では多くのプレートで検体の沈殿及び全てのプレートでバックグラウンドコロニーの生育阻害が認められた。100 μ g/プレートでも TA98 を除く菌株で、バックグラウンドコロニーの生育阻害が認められた。TA1537 では陽性対照の値が当研究室の正常の範囲から外れていた。これは陽性対照溶液の調製の間違いと考えられ、繰り返し実験を行った結果、許容できる陰性及び陽性対照の結果が得られたが、250 μ g/プレートはヒスチジン依存性の微小コロニーの生育のために評価できなかった。

代謝活性化系の存在下で、250 μ g/プレートの用量では全てのプレートで検体の沈殿及び多くのプレートでバックグラウンドコロニーの生育阻害が認められた。50 及び 100 μ g/プレートでも一部のプレートでバックグラウンドコロニーの生育阻害が認められた。

このような試験条件下で、いずれの菌株も代謝活性化系の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数の増加を認めなかった。

一方、陽性対照として用いたアジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、2-ニトロフルオレン、2-アミノアントラセンでは、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。

表 復帰変異性試験結果 (3 プレートの平均値)

	薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9Mix 有無	復帰変異コロニー数/プレート					
				TA1535	TA1537*	TA98	TA100		
試験 1	溶媒対照 (DMSO)	-	-	19	12	17	32	135	
	検体	10	-	17	12	16	34	115	
		25	-	19	12	14	35	115	
		50	-	20	16a	13	31	125	
		100	-	15b	11b	12b	32	125a	
		250	-	11b	8b	NR cd	24ad	92bd	
	溶媒対照 (DMSO)	-	+	17	15		41	126	
	検体	10	+	15	16		45	123	
		25	+	16	15		37	118	
		50	+	15a	15		35	113	
		100	+	13b	14a		36	113	
		250	+	12bd	11bd		31ad	118ad	
	陽性対照	アジ化ナトリウム	1	-	584				896
		9-アミノアクリジン	50	-		88	457		
		2-ニトロフルオレン	1	-				359	
		2-アミノアントラセン	2	+	274	192		2012	
試験 2	溶媒対照 (DMSO)	-	-	20	14		36	144	
	検体	10	-	21	16		33	124	
		25	-	19	19		34	142	
		50	-	16	10		38	118	
		100	-	16a	8b		35	115a	
		250	-	14bd	NR cd		25ad	119bd	
	溶媒対照 (DMSO)	-	+	18	16		37	121	
	検体	10	+	15	14		34	130	
		25	+	13	16		40	121	
		50	+	18	15		39	126	
		100	+	17	11		33	126	
		250	+	10ad	16ad		36d	132ad	
	陽性対照	アジ化ナトリウム	1	-	566				783
		9-アミノアクリジン	50	-		364			
		2-ニトロフルオレン	1	-				340	
		2-アミノアントラセン	2	+	252	309		2465	2162

a: 背景ローンの軽度～中等度減少 b: 背景ローンの顕著な減少
 c: 背景ローンの顕著な減少とプレートの評価が困難な微小コロニーの形成
 d: プレート上に相当大きい沈澱の発生 NR: 結果が得られなかった。
 *: 試験を繰り返し実験の結果を右側に示す。

(3) ヒトリンパ球を用いる *in vitro* 染色体異常試験

(資料 68)

試験機関：

報告書作製年：

検体純度： (代謝物 C)

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、最終濃度 6.25、12.5、25、50、100、200 及び 400 $\mu\text{g/mL}$ 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：メチルメタンシルホネート (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、25 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、細胞分裂指標は 100 $\mu\text{g/mL}$ 処理で S-9MIX 存在下及び非存在下で各々 30 及び 69% の阻害がみられたため、25、50 及び 100 $\mu\text{g/mL}$ を選定して評価した。評価は各培養の 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 400 $\mu\text{g/mL}$ とした。

結 果：次表に示す。

代謝活性化の有無に係らず、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係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。

表 2 ドナーの各培養の染色体異常出現数の合計値

処理	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	S-9 mix	観察 細胞数	キ ャ ッ フ	異常を有する細胞数					異常細胞数(%)			有糸 分裂 指数
					染色体		染色分体		その 他	キ ャ ッ フ を 含 む	構 造 + 数 的 異 常 を 含 む	構 造 異 常 を 含 む	
					欠 失	交 換	欠 失	交 換					
DMSO	0	-	200	0	0	0	0	0	2	1	1	0	2.2
検体	25		200	4	1	0	2	0	1	4	2	1.5	18.
	50		200	0	2	0	1	0	0	1.5	1.5	1.5	1.5
	100		188	3	0	0	3	0	0	3.7	2.1	1.6	1.5
MMS	75		50	7	3	2	7	12	0	32 \uparrow	28 \uparrow	28 \uparrow	-
DMSO	0	+	200	6	2	0	0	0	0	3	0.5	0.5	1.2
検体	25		194	8	1	0	2	0	1	5.2	1.5	1	0.9
	50		200	1	1	0	3	0	1	2.5	2.5	2	1.2
	100		200	10	2	0	1	0	4	7.5	3.5	1.5	0.7
CPA	25		50	15	3	0	10	1	1	36 \uparrow	20 \uparrow	18 \uparrow	

MMS:メチルメタンサルホネート CPA:シクロホスファミド

統計学的手法: カイ二乗検定 \uparrow : $p < 0.001$

10-4. 代謝物 E: (動植物、土壤中の代謝物、加水分解物)の毒性試験

10-4-1. 急性毒性

(1) ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 69)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作製年:

検体純度: (代謝物 E)

試験動物: SPRAGUE DAWLEY 系ラット、9~10 週齢、体重: 雄 279~312g、雌 194~207g、1 群雌雄各 5 匹

試験期間: 14 日間観察

試験方法: 検体をコーンオイルに懸濁し、10mL/kg の容量で一夜絶食させた動物に単回強制経口投与した。

試験項目: 中毒症状及び生死を 14 日間毎日観察した。試験終了時に全例の肉眼的病理検査を行った。

試験結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雄雌 2000
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	2000 以上
症状発現及び消失時期	中毒症状なし
死亡開始及び終了時間	死亡例なし

死亡例はなく、特記すべき中毒症状も認めらなかった。

解剖所見では雄 1 匹に中等度の肝臓肥大が認められた。

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

10-4-2. 代謝物 E () の亜急性毒性

ラットを用いた亜急性毒性試験

(資料 70)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作製年:

検体純度: (代謝物 E)

試験動物: Sprague-Dawley 系 Ico:0FA, SD. (10PS Caw) ラット、6~7 週齢、体重: 雄 213~237g ; 雌 147~177g、1 群雌雄 各 10 匹

試験期間: 4 週間 (7 月 10 日 ~ 8 月 10 日)

投与方法: 検体を粉末試料に直接混入して 0、50、500、5000 及び 15000ppm の飼料を調製し、4 週間にわたって混餌投与した。対照群の動物には基礎飼料のみ投与した。混餌は 1 回のみ調製した。

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。

試験期間中、投与関連性のある一般状態の変化は認められなかった。15000ppm 群の雌 1 例が試験 24 日に死亡したが、死因は採血のためで、投与に関連がないと考えられた。

体重変化; 毎週 1 回、全ての動物の体重を測定した。

対照群と比べ統計学的に有意差の認められた時期を下表に示す。

	投与後週	性別/投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		50	500	5000	15000	50	500	5000	15000
体重	1			87↓	77↓			85↓	76↓
	2			90↓	81↓			85↓	75↓
	3			92↓	82↓			85↓	73↓
	4			90↓	77↓			84↓	72↓
体重増加	1			33↓	-20↓			11↓	-41↓
	2							83	72
	3							87	51
	4			43↓	-52↓			45	54

統計学的手法: Dunnett または Mann-Whitney 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。

5000 及び 15000ppm 群の雌雄は試験 8 日から投与終了まで統計学的有意に抑制された。

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時期を下表に示す。

投与後週	性別/投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	50	500	5000	15000	50	500	5000	15000
1			76↓	48↓		89↓	58↓	35↓
2				89↓			76↓	67↓
3				86↓			79↓	67↓
4				75↓			78↓	67↓

統計学的手法： Dunnett または Mann-Whitney 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。

摂餌量の減少が 15000ppm 群の雌雄及び 5000ppm 群の雌で試験期間中認められた。また、5000ppm 群の雄及び 500ppm 群の雌では試験 1 週のみ減少が認められた。

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)	50ppm		500ppm		5000ppm		15000ppm	
性別	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
摂取量 (mg/kg)	3.80	4.44	38.16	43.97	385.07	386.75	1087.05	1062.84

血液学的検査；投与 23～25 日に全生存動物を対象として、各群から 1 日に同数ずつ一晩絶食後、眼窩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、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、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。

検査項目	性別/投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	50	500	5000	15000	50	500	5000	15000
ヘモグロビン		96↓	92↓	92↓		97↓	93↓	
ヘマトクリット			92↓	93↓			94↓	
平均赤血球容積			97↓					
平均赤血球血色素量				96↓			96↓	95↓
プロトロンビン時間	92↓					90↓	83↓	89↓
血小板数			126↑	119				

統計学的手法： Dunnett または Mann-Whitney 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。

ヘモグロビン量 (500ppm 以上の雄及び 500/5000ppm 群の雌) 及びヘマトクリット値 (5000ppm 以上の雄及び 5000ppm 群の雌) の軽度減少が認められた。平均赤血球血色素量の軽度減少が 15000ppm 群雄及び 5000ppm 以上の群の雌で認められた。

プロトロンビン時間が表のように対照群に比し、500ppm 群以上の雌で軽度減少がみられたが、対照群の値が異常に高値であったためであり、投与に関連がないと考えられた。平均赤血球容積及び血小板数が 5000ppm 群雄で軽度減少及び軽度増加を示したが明確な用量関連性もなく、投与に関連がないと考えられた。

血液生化学的検査；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、アルブミン、グルコース、ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、コレステロール、トリグリセライド、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下表に示す。

検査項目	性別/投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	50	500	5000	15000	50	500	5000	15000
尿素							134↑	135↑
クレアチニン		107↑	114↑	120↑				
コレステロール		130↑	276↑	384↑		149↑	333↑	389↑
トリグリセライド			301↑	613↑			339↑	313↑
総蛋白		104↑	104	110↑		107↑	106↑	104
アルブミン			95↓					
ビリルビン		59↓				52↓		
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ				84↓			86↓	
アラニンアミノトランスフェラーゼ				137↑				
アルカリホスファターゼ		80↓	77↓	91	80↓	60↓	57↓	
カリウム								111↑
カルシウム							95↓	
無機リン		90↓	88↓	88↓				

統計学的手法： Dunnett または Mann-Whitney 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。

500ppm 以上の群の雌雄でコレステロールの増加、雄でのみクレアチニンの増加が認められた。5000ppm 以上の群の雌雄でトリグリセライドの増加、雌で尿素的増加が認められた。

その他に表のような変化が認められたが、個体別値のほとんどは偶発的であり、用量関連性も明確でないことから毒性学的意義はほとんどないものと考えられた。

尿検査；投与終了後の朝に全ての生存動物から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、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

15000ppm 以上の群の雄でのみ尿 pH が僅かに低かった(対照群の 6.65 に対し、15000ppm 群で 6.10)。その他に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 4 週時は対照群及び 15000ppm 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、脾臓、心臓、脳、甲状腺及び上皮小体、精巣及び精巣上体、前立腺、卵巣、子宮、胸腺、下垂体

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。

投与関連性のある肝臓重量の増加が 500ppm 以上の群の雌雄で認められた。

甲状腺重量の有意な増加が 50ppm 以上の群の雄で認められたが、個体別値の変動が大きく、大部分は予想の範囲内であったが、数例が極めて高値を示した。組織学的に変化が認められないので投与に関連がないと考えられた。

副腎重量の有意な増加が雄では投与全群で認められたが明確な用量関連性もなく、高用量群で認められた体重増加の抑制との関連が考えられた。副腎重量の増加は通常ストレスを受けた動物で観察されるので、投与関連性の影響とは考えられない。雌では 15000ppm 群で有意な低下が認められたが、毒性学的意義は明らかでなかった。

その他の統計学的に有意な変化は正常の範囲内あるいは 5000 及び 15000ppm 群の動物にみられた低体重に起因しており、また、組織学的変化 (5000ppm 以下) がこれらの臓器に認められないので、これらの臓器重量の変化は偶発的と考えられた。

臓器重量		性別/投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		50	500	5000	15000	50	500	5000	15000
脳	重量			97↓	92↓				
	対体重比			108↑	120↑			117↑	136↑
心臓	重量								85↓
	対体重比			124↑	133↑				117↑
肝臓	重量		116↑	171↑	190↑		129↑	185↑	191↑
	対体重比		121↑	191↑	249↑		133↑	221↑	266↑
	対脳重比		119↑	177↑	208↑		127↑	187↑	195↑
下垂体	重量				60↓			67↓	58↓
	対脳重比				72↓			72↓	60↓
脾臓	重量				70↓				
	対体重比			123↑					
	対脳重比				77↓				
腎臓	重量			85↓	71↓			90↓	79↓
	対体重比				93↓				109↑
	対脳重比			88↓	78↓			91↓	80↓
副腎	重量		140↑	138↑					55↓
	対体重比	118↑	141↑	153↑	159↑		120↑		77↓
	対脳重比	122↑	143↑	142↑	136↑				56↓
胸腺	重量				58↓			74↓	59↓
	対体重比				77↓				
	対脳重比				64↓			75↓	61↓
甲状腺	重量	131↑	131↑	163↑	175↑				
	対体重比	131↑	135↑	171↑	214↑				
	対脳重比	130↑	133↑	164↑	187↑				
精巣	重量				82↓				
精巣 上体	重量				68↓				
	対脳重比				75↓				
前立腺	重量			58↓	38↓				
	対体重比			64↓	49↓				
	対脳重比			60↓	43↓				
卵巢	重量							68↓	
	対脳重比							70↓	
子宮	重量							36↓	
	対体重比							49↓	
	対脳重比							37↓	

統計学的手法：Dunnett または Mann-Whitney 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。

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。

死亡した 15000ppm 群雌の 1 例に投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

計画屠殺動物で認められた主要な病変を次表に示す(15000ppm 群雌は9例、その他の群は10例中の発生頻度)。

臓器/所見	性別/投与量 (ppm)									
	雄					雌				
	0	50	500	5000	15000	0	50	500	5000	15000
肝臓：腫大 暗調化			1	8	10				10	9
副腎：腫大				5	3				3	2
精囊：小型				5	8					
前立腺：小型				4	8					

統計検定なし。

肝臓及び副腎の腫大並びに肝臓の暗調化が5000ppm以上の群の雌雄に認められた。小型の精囊及び前立腺が5000ppm以上の群の雄で認められ、また500ppm群の雄1例で肝臓の暗調化が認められたが、組織学的変化もないので、投与に関連はないと考えられた。

病理組織学的検査：投与終了時の全生存動物及び全ての死亡動物を対象として、以下の組織について、対照群及び5000ppm群の全動物、並びにその他の群の全動物の肺、肝臓、腎臓、副腎及び甲状腺並びに肉眼的病変部をヘマトキシリン・エオジン染色して病理標本を作製して検鏡した。なお、15000ppm群は対照群に比し、体重増加の抑制が極めて顕著で、過剰な投与量と考えられたので、組織学的検査はしなかった。

乳腺、リンパ節(下顎、腸間膜)、大動脈、唾液腺、関節(大腿-脛骨)、胸骨及び骨髄、胸腺、気管、肺(主気管支を含む)、心臓、甲状腺、上皮小体、舌、食道、喉頭、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、骨格筋、脊髄(頸部、胸部、腰部)、眼窩(視神経を含む)、ハーダー腺、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(5000ppm 群雌は9例、その他の群は10例中の発生頻度)。

臓器/所見	性別/投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	0	50	500	5000	0	50	500	5000
肝臓：小葉中心性肥大 瀰漫性肥大				6				6
				4				4
副腎：髓外造血 微細/粗大空胞化				5				4
		2	5	10				7

統計検定なし。

5000ppm 群雌雄において、肝臓で軽微ないし中程度の肝細胞肥大が小葉中心性あるいは瀰漫性(小葉中心性領域に顕著であるが)に認められ、また副腎で軽微ないし中

程度の髄外造血が認められた。さらに副腎では、束状帯での空胞化変性が 50ppm 以上の用量で認められた。一般的に、副腎束状帯での空胞化形成は、副腎皮質ホルモンの合成・分泌と密接な関係にあり、個体がストレスを受けるなどすると亢進する。本試験では、体重減少というストレスが個体に負荷されており、これは 5000ppm 以上であった。また、副腎皮質ホルモン合成のソースとなるコレステロール値は 500ppm 以上で有意な増加が認められており、これらのことから副腎束状帯の空胞化変性は、500ppm 以上で投与に起因するものであり、50ppm での増加は軽微なものでもあり、毒性学的な意義はないものと考えられる。

以上の結果から、代謝物 E()のラットに対する 28 日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、15000ppm 群において、雌雄で摂餌量の減少を伴う体重の抑制、ヘモグロビンの軽度低下、コレステロール及びトリグリセライドの増加、肝臓重量の増加、肝臓の腫大及び暗調化並びに副腎の腫大が認められた。さらに、雌で血中尿素の増加、雄でクレアチニンの増加が認められた。

5000ppm 群において、雌雄で体重の抑制が、雌では摂餌量の減少を伴い認められ、ヘモグロビンの軽度低下、コレステロール及びトリグリセライドの増加、肝臓重量の増加、肝臓の腫大及び暗調化並びに副腎の腫大、肝臓に小葉中心性あるいは瀰漫性肝細胞の肥大、副腎に髄外造血及び束状帯の空胞化が認められた。さらに、雌では血中尿素、雄ではクレアチニンの増加が認められた。

500ppm 群において、雌雄でヘモグロビンの軽度低下、コレステロールの増加、肝臓重量の増加が認められ、さらに雄ではクレアチニンの増加、副腎束状帯の空胞化が認められた。

50ppm 群では、検体投与に起因する毒性学的所見は認められなかった。

したがって、無毒性量 (NOAEL) は 50ppm (雄 3.80mg/kg/日、雌 4.44 mg/kg/日) と判断された。

10-4-3. 変異原性試験

(1) 細菌を用いた復帰変異試験

(資料 71)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作製年:

検体純度: (代謝物 E)

方 法: ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella tryphimurium*, 5 菌株 (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538) を用い、ラットの肝臓から調製した代謝酵素系 (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。検体を溶解させるため、ジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。

検体を DMSO に溶解し、S-9 mix の存在下では 50~2500 μ g/プレートの範囲の 6 用量で、非存在下では 50~1000 μ g/プレートの範囲の 5 用量で、2 回目の実験は S-9 mix の非存在下及び存在下とも 50~1000 μ g/プレートの範囲の 5 用量で実施した。いずれの試験も 3 連制で行った。

用量設定根拠: TA100 を用いた用量設定試験において、用量 1~5000 μ g/プレートの範囲の 9 用量で、溶媒対照と陽性対照も用いて実施した。全てのプレートで沈殿が認められた。S-9 mix 存在下では 1000 μ g/プレート以上でも沈殿の生成はわずかであった。そこで 1 回目の試験では、S-9 存在下は 2500 μ g/プレート、非存在下は 1000 μ g/プレートを最大用量とした。

結 果: 結果は次頁の表に示す。

S-9 mix の存在下では 500 μ g/プレートでもほとんどのプレートでわずかな沈殿が認められた。非存在下では 500 μ g/プレートで TA1537 (試験 2) のプレートでのみ、又 1000 μ g/プレートでは全てのプレートでわずかな沈殿が認められた。細胞毒性はいずれにも認められなかった。

このような条件下で、検体は代謝活性化系の有無に係わらず、いずれの菌株にも復帰変異コロニー数の増加を認めなかった。

一方、陽性対照として用いたアジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、2-ニトロフルオレン、2-アミノアントラセンでは、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。

表 復帰変異試験結果 (3 プレーットの平均値)

	薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9Mix 有無	復帰変異コロニー数/プレート					
				TA98	TA100	TA1535	TA1537	TA1538	
試験 1	溶媒対照 (DMSO)	-	-	28	123	19	12	13	
	検体	50	-	33	109	15	12	14	
		100	-	36	122	21	15	14	
		250	-	29	118	23	12	14	
		500	-	33	112	20	12	14	
		1000	-	36 ^c	112 ^c	14 ^c	9 ^c	21 ^c	
	溶媒対照 (DMSO)	-	+	41	104	13	14	24	
	検体	50	+	37	108	12	12	18	
		100	+	35	111	15	16	30	
		250	+	29	97	15	9	20	
		500	+	41 ^c	107 ^c	12 ^c	11 ^c	16 ^c	
		1000	+	31 ^c	103 ^c	16 ^c	7 ^c	17 ^c	
	陽性対照	アジ化ナトリウム	2	-		694	509		
		9-アミノアクリジン	50	-				250	
2-ニトロフルオレン		50	-	394				250	
2-アミノアントラセン		2	+	1495	1864	291	236	1862	
試験 2	溶媒対照 (DMSO)	-	-	26	122	20	14	16	
	検体	50	-	29	124	19	11	12	
		100	-	36	138	22	12	15	
		250	-	30	112	18	17	13	
		500	-	24	120	20	14 ^c	18	
		1000	-	31 ^c	129 ^c	18 ^c	13 ^c	16 ^c	
	溶媒対照 (DMSO)	-	+	35	104	16	9	18	
	検体	50	+	40	103	14	15	16	
		100	+	36	94	17	15	24	
		250	+	35	107	14	18	26	
		500	+	35	106 ^c	14 ^c	15 ^c	22 ^c	
		1000	+	32	98 ^c	16 ^c	15 ^c	20 ^c	
	陽性対照	アジ化ナトリウム	1	-		734	483		
		9-アミノアクリジン	50	-				379	
2-ニトロフルオレン		1	-	422				475	
2-アミノアントラセン		2	+	1830	2183	255	352	1700	

c: 沈澱がみられた

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

(2) 代謝物 E () の染色体異常誘発性

ヒトリンパ球を用いる *in vitro* 染色体異常試験

(資料 72)

試験機関 :

[GLP対応]

報告書作製年 :

検体純度 : (代謝物 E)

試験方法 : 男性から採血し、組織培養液(10%牛胎児血清+ヘパリン+ペニシリン+ストレプトマイシン+グルタミン添加)で希釈し、フィットヘマアグルチニンを添加して、毎日軽く振盪して細胞を浮遊させながら、約 48 時間培養して用いた。この浮遊液を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 に溶解して試験した。試験は 2 反復で行った。

試験 1 : DMSO に対する検体の溶解度は 500mg/mL であったが、培地を加え 1250 μ g/mL 以上の最終濃度とすると培地に溶解せず、沈殿を生じたので、1250 μ g/mL を最高濃度とし、S-9 Mix の存在下及び非存在下とも 9.77、19.53、39.06、78.13、156.25、312.5、625 及び 1250 μ g/mL の試験濃度とした。S-9 Mix の非存在下の試験では細胞毒性が強かったので、100、200、300、400、500 及び 600 μ g/mL の試験濃度で再試験を行った。

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(MC)、S9 Mix 存在下:シクロホスファミド(CPA)]を加えた。

S-9 Mix の非存在下及び存在下とも検体含有培地で細胞を 3 時間培養後、遠心分離し、細胞ペレットを新鮮培地に再浮遊させてさらに 17 時間培養した。培養終了 2 時間前にコルセミド 0.1 μ 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、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溶媒対照の 50%まで低下、かつ染色体の形態が良好である用量を最高評価用量として、S-9 Mix の非存在下では 200、300 及び 400 μ g/mL を、S-9 Mix の存在下では 156.25、312.5 及び 625 μ g/mL を選定して評価した。評価は各培養の 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、切断、交換、その他(8 以上の異常、細粉化)に分類した。

試験 2 : S-9 Mix の非存在下では連続 20 時間検体含有培地で培養とし、S-9 Mix の存在下では試験 1 と同様に 3 時間検体含有培地で培養した後、検体無添加培地で 17 時間培養した。これ以外は下記の点を除いて試験 1 と同条件で行った。

試験濃度 : S-9 Mix の非存在下 - 3.91、7.82、15.63、31.25、62.5、125、
250 及び 5000 $\mu\text{g/mL}$

S-9 Mix の存在下 - 78.13、156.25、312.5、625 及び 800 $\mu\text{g/mL}$

評価濃度 : S-9 Mix の非存在下 - 31.25、62.5、125 $\mu\text{g/mL}$

S-9 Mix の存在下 - 312.5、625 及び 800 $\mu\text{g/mL}$

結 果 : 染色体異常の観察結果を表 1、細胞毒性の結果を表 2 に示す。

代謝活性化の非存在下において、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が、代謝活性化の存在下において、625 $\mu\text{g/mL}$ 以上で細胞毒性があり、染色体異常を有する分裂細胞の割合の有意な増加がみられた。

一方、陽性対照群ではマイトマイシン C 及びシクロホスファミドとも有意な増加がみられた。

以上の結果より、本試験条件下で、代謝活性化の存在下において、検体は培養ヒトリンパ球細胞に対し細胞毒性がある濃度で、染色体異常誘発性が認められた。代謝活性化の非存在下では染色体異常誘発性は認められなかった。

表 1 染色体異常の観察結果 (2 プレートの合計値)

薬物	濃度 μg/ml	S-9 Mix 有無	観察 細胞 数	染色体異常数						異常細胞数 (%)			
				キヤ ップ	染色分体		染色体		その 他 ^a	キヤップを含む		キヤップを除く	
					切断	交換	切断	交換		細胞数	平均%	細胞数	平均%
試験 1 時間処理後 17 時間培養													
溶媒対照 (DMSO)	0	-	200		2		1			3	1.5	3	1.5
検体	200	-	200	1	1		1			3	1.5	2	1.0
	300	-	200							0	0.0	0	0.0
	400	-	200	2	4	1	1			7	3.5	5	2.5
陽性対照 (MC ^b)	0.2	-	200	2	28	2	8			32	16.0 [↑]	30	15.0 [↑]
溶媒対照 (DMSO)	0	+	200		1					1	0.5	1	0.5
検体	156.25	+	200				2			2	1.0	2	1.0
	312.5	+	200							0	0.0	0	0.0
	625	+	200		15	1	3		3	16	8.0 [↑]	16	8.0 [↑]
陽性対照 (CPA ^c)	6	+	200		33	2	2			28	14.0 [↑]	28	14.0 [↑]
試験 2 20 時間連続処理培養 (-S9)/3 時間処理後 17 時間培養 (+S9)													
溶媒対照 (DMSO)	0	-	200							0	0.0	0	0.0
検体	31.25	-	200							0	0.0	0	0.0
	62.5	-	200	2						2	1.0	0	0.0
	125	-	200		1					1	0.5	1	0.5
陽性対照 (MC ^b)	0.1	-	200		26	3				24	12.0 [↑]	24	12.0 [↑]
溶媒対照 (DMSO)	0	+	200		2					2	1.0	2	1.0
検体	312.5	+	200		1	1				2	1.0	2	1.0
	625	+	200		19	3	2			14	7.0 [↑]	14	7.0 [↑]
	800	+	200		16	1			1	13	6.5 [↑]	13	6.5 [↑]
陽性対照 (CPA ^c)	6	+	200	1	32	7	3			29	14.5 [↑]	29	14.5 [↑]

^a : 8 以上の異常、細粉化等

^b : マイトマイシン C (MC)

^c : シクロホスファミド (CPA)

統計学的方法 : Fisher 検定 ↑: P<0.01 ↑↑: p<0.001

表 2 細胞毒性—分裂指数(反復当たり 1000 細胞を観察)

薬物	S-9 Mix の有無	試験 1				試験 2			
		濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	3 時間処理後 17 時間培養			濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	20 時間連続処理培養 (-S9)/ 3 時間処理後 17 時間培養 (+S9)		
			平均分裂 ^a 指数%	相対分裂 指数%	倍数性 ^b %		平均分裂 ^a 指数%	相対分裂 指数%	倍数性 ^b %
溶媒対照 DMSO	-	0	7.4	100		0	5.2	100	0.1
検体	-	9.77	9.6	130		3.91	5.2	100	
	-	19.53	8.0	108		7.82	5.0	96	
	-	39.06	8.1	109		15.63	5.0	96	
	-	78.13	9.6	130		31.25	4.5	87	
	-	156.25	10.1	136		62.5	3.9	75	
	-	312.5	5.8	78		125	2.2	42	0.1
	-	625	0.6	8		250	1.0	19	
	-	1250	c, d	0		500	d	0	
溶媒対照 DMSO	+	0	8.3	100	0.2	0	6.7	100	0.1
検体	+	9.77	9.8	118					
	+	19.53	11.6	140					
	+	39.06	9.0	108					
	+	78.13	7.5	90		78.13	8.0	119	
	+	156.25	8.7	105		156.25	5.2	78	
	+	312.5	7.7	93		312.5	8.2	122	
	+	625	3.5	42	0.9	625	3.2	48	
	+	1250	c, d	0		800	2.2	33	0.1
溶媒対照 DMSO	-	0	9.8	100	0.0				
検体	-	100	7.8	80					
	-	200	7.0	71					
	-	300	4.1	42					
	-	400	4.3	44	0.3				
	-	500	1.8	18					
	-	600	0.3	3					

a: 合計 2000 細胞を調査

b: 合計 1000 細胞を調査

c: 処理時に沈殿を観察した。

d: 細胞は存在するが、分裂細胞がなかった。

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

(3) 代謝物E()のラットを用いた小核試験 (資料 73)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作製年:

検体純度: (代謝物E)

試験動物: Sprague-Dawley CD-1 系ラット、1 群雄各 7 匹(ただし、陽性対照群は 5 匹)
体重範囲 雄 157~221g

試験期間: 投与後 48 時間

試験方法: 検体をコーンオイルに懸濁して 10mL/kg の容量で強制経口投与した。

用量選定のために、1 群雌雄各 2 匹を用い予備試験(観察期間 48 時間)を 1500 及び 2000mg/kg で行った結果、死亡例もなく、投与に起因する一般症状もみられず、性差もなかったため、雄のみを使用し、本試験の用量を 500、1000 及び 2000mg/kg とし、対照群には溶媒(陰性)及びシクロホスファミド(CPA) 20mg/kg(陽性)を同様に投与した。

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雄 7 匹、さらに投与 48 時間後に陰性及び 2000mg/kg 群の 7 匹を屠殺して、大腿骨の骨髓を採取し、各大腿骨から塗抹をスライドグラス上に数枚ずつ作製して固定後、改良 Feulgen 法で染色し、骨髓標本を作製した。

各標本について、動物当たり 2000 個(1 スライド)の多染性赤血球当たり小核の発生頻度を求めた。動物当たり少なくとも 1000 個の赤血球を検査し未熟赤血球の割合を求め、同時に小核を有する成熟赤血球を観察した。

結 果: 次表に結果を示す。

死亡例もなく、投与に起因する一般症状も認められなかった。

小核誘発性:

いずれの検体投与群のいずれの試料採取時期とも、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正染性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/成熟赤血球比の有意な変化は認められなかった。

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。

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

	処理区	投与量 (mg/kg)	動物数	処理時間	MNPCE ^a	MNNCE ^b	P/M ^c (%)	
本試験	溶媒対照 (コーオイル)	0	7	24	1.1	0.0	42	
				48	0.4	0.0	44	
	検体	500	7	24	1.3	0.0	42	
				24	0.9	0.0	44	
				2000	24	0.6	0.0	43
					48	0.3	0.0	43
	陽性対照 (CPA) ^d	20	5	24	46.8↑	0.0	37	

^a: 多染性赤血球 2000 個あたりの小核を有する多染性赤血球数

^b: 正染性赤血球 2000 個あたりの小核を有する正染性赤血球数

^c: 多染性赤血球 / (多染性赤血球 + 正染性赤血球) 比

^d: CPA (シクロホスファミド) は純水に溶解した。

統計学的方法: 並べ替えによる厳密片側 p 値 ↑: P<0.01

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

10-5. 代謝物 G : (植物中の代謝物、水中光分解物)の毒性試験

10-5-1. 急性毒性試験

(1) ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 74)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作製年:

検体純度: (代謝物 G)

試験動物: Sprague-Dawley 系ラット、9~10 週齢、体重: 雄 274~301g、雌 199~222g、1 群雌雄各 5 匹

試験期間: 14 日間観察

試験方法: 検体をコーンオイルに懸濁し、10mL/kg の容量で一夜絶食した動物に単回強制経口投与した。

試験項目: 中毒症状及び生死を 14 日間観察した。試験終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行った。

試験結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雄雌 2000
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	2000 以上
死亡開始及び終了時間	死亡例なし

死亡例はなく、特記すべき中毒症状も認められなかった。

剖検所見では、主要な組織器官に特記すべき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

10-5-2. 代謝物 G () の亜急性毒性

ラットを用いた亜急性毒性試験

(資料 75)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作製年: (本試験)・ (ネモン測定)

検体純度: (代謝物 G)

試験動物: Sprague-Dawley 系 Ico:0FA. SD. (IOPS Caw) ラット、6 週齢、体重: 雄 127~185g; 雌 129~160g、1 群雌雄 各 10 匹

試験期間: 4 週間 (9 月 4 日 ~ 10 月 3 日)

投与方法: 検体を粉末試料に直接混入して 0、50、500、5000 及び 10000ppm の飼料を調製し、4 週間にわたって混餌投与した。対照群の動物には基礎飼料のみ投与した。混餌は 1 回のみ調製した。

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。

試験期間中、投与関連性のある一般状態の変化もなく、死亡もなかった。

体重変化: 毎週 1 回、全ての動物の体重を測定した。

対照群と比べ統計学的に有意差の認められた体重増加を次表に示す。

増加体重	性別/投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	50	500	5000	10000	50	500	5000	10000
投与 3 週					91	83	102	75
投与 4 週					347↑	219	206	343↑

統計学的手法: Dunnett または 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。

4 週時の体重増加は 50 および 10000ppm 群で有意に多かった。これは前週の体重増加が少なかったことによる反動と考えられ、用量依存性もなく、体重自体に影響を与える変化ではないことから、毒性学的意義はないと考えられる。

摂餌量: 全動物の摂餌量を週 1 回測定した。

投与に起因する変化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。

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 (ppm)	50ppm		500ppm		5000ppm		10000ppm	
性別	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
摂取量 (mg/kg)	4.5	4.7	45.7	50.4	458.5	487.4	915.9	949.7

血液学的検査：投与 22～24 日に全生存動物を対象として、各群から 1 日に同数ずつ一晩絶食後、眼窩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、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、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。

検査項目	性別/投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	50	500	5000	10000	50	500	5000	10000
プロトロンビン時間			108↑	116↑				

統計学的手法：Dunnett または Mann-Whitney 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。

プロトロンビン時間が表のように対照群に比し、5000ppm 以上の群の雄でのみ有意に延長した。

血液生化学的検査：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、アルブミン、グルコース、ビリルビン、尿酸窒素、クレアチニン、コレステロール、トリグリセライド、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下表に示す。

検査項目	性別/投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	50	500	5000	10000	50	500	5000	10000
アルカリホスファターゼ			134↑	332↑			294↑	533↑
コレステロール								135↑
トリグリセライド					151↑	125	225↑	214↑

統計学的手法：Dunnett または Mann-Whitney 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。

5000ppm 以上の群の雌雄でアルカリホスファターゼ活性の亢進が、又雌では 5000ppm 以上の群でトリグリセライドの増加、及び 10000ppm 群でコレステロールの増加が認められた。トリグリセライドの有意な増加は 50ppm 群の雌でもみられたが、500ppm 群で有意差がみられないことから、50ppm 群の増加は検体の影響とは考えられない。

甲状腺ホルモンの測定；同時に採血した血液から得られた血漿をTSH、T3およびT4の分析に供した。

第4週 群 (ppm)	対照群の平均値と比較した変化%					
	雄			雌		
	T3	T4	TSH	T3	T4	TSH
50	+50.8%					
500	+27.7%					
5000	+30.8%				-20.4% ↓	
10000	+15.4%	-15.2%	+38.7%	-14%	-22.9% ↓	

統計検定：Dunnett 検定または Kruskal-Wallis および Mann-Whitney test
 ↓：p≤0.05, ↓↓：p≤0.01, 空欄および矢印のない数値(%)は有意差なし。

10000ppm 群雄にみられた T4 の軽度低下は有意でないが、TSH の増加もみられていることから、生物学的に有意であると考えられた。5000 及び 10000ppm 群雌の T4 の有意な低下は関連する血漿 TSH の増加がみられないことから、毒性学的に有意ではないと考えられた。また、雄において全投与群に T3 の増加がみられた。しかし、これらは統計学的に有意でなく、また用量関連性もなく、雌 10000ppm 群では低下していることから毒性学的に有意な変動ではないと考えられた。雌雄の T3/T4 の比にも投与による変化はみられなかった。

尿検査：投与終了後の朝に全ての生存動物から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、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

次表に有意差の認められた項目のみ示した。

検査項目	性別/投与量 (ppm)									
	雄					雌				
	0	50	500	5000	10000	0	50	500	5000	10000
pH	6.39	6.83	7.00↑	7.33↑	7.15↑					

統計学的手法：Dunnett または Mann-Whitney 検定 ↑：p<0.05 ↑↑：p<0.01

上表のように 500ppm 以上の群の雄のみ尿 pH が僅かに高かった。しかしながら、用量依存性がないことや変動も中性範囲内のわずかなものであることから、毒性学的意義はないと考えられる。

眼科学的検査：投与開始前は全動物、投与 4 週時は対照群及び 10000ppm 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、脾臓、心臓、脳、甲状腺及び上皮小体、精巣及び精巣上体、前立腺、卵巣、子宮、胸腺、下垂体

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			
		50	500	5000	10000	50	500	5000	10000
脳	重量		106↑						
	対体重比								
肝臓	重量				115↑				
	対体重比			109↑	112↑			112↑	112↑
胸腺	重量			129↑					
	対体重比			126↑				125↑	
	対脳重比			124↑					
精巣	重量			92↓					
	対体重比		91↓	91↓					
	対脳重比		90↓	89↓	91↓				
精巣上体	重量			90↓					
	対体重比		92↓	89↓	93↓				
	対脳重比			87↓					
卵巣	重量							83↓	
	対体重比							84↓	

統計学的手法：Dunnett または Mann-Whitney 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。

10000ppm 群の雄の肝臓の重量増加及び雌雄の対体重比の増加、5000ppm 群雌雄の肝臓の対体重比の増加は投与に関連があると考えられた。

その他に認められた表のような変化は用量関連性がない、あるいは 10000 群で影響がないことから毒性学的あるいは生物学的に意義がないものと考えられた。

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。

投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

病理組織学的検査：投与終了時の全生存動物を対象として、以下の組織について、対照群及び 10000ppm 群の全動物、並びにその他の群の全動物の肺、肝臓、甲状腺及び腎臓並びに肉眼的病変部をヘマトキシリン・エオジン染色して病理標本を作製して検鏡した。

乳腺、リンパ節(下顎、腸間膜)、大動脈、唾液腺、関節(大腿-脛骨)、胸骨及び骨髄、胸腺、気管、肺(主気管支を含む)、心臓、甲状腺、上皮小体、食道、舌、喉頭、胃、小腸(十二指腸、空腸、回腸)、大腸(盲腸、結腸、直腸)、肝臓、脾臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精囊、前立腺、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、陰、脳、下垂体、坐骨神経、骨格筋、脊髄(頸部、胸部、腰部)、眼窩(視神経を含む)、ハーダー腺、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	50	500	5000	10000	0	50	500	5000	10000
甲状腺: 濾胞上皮肥大	2	0	1	1	5	0	0	0	0	1
肝臓: 類洞リンパ球集簇	5	4	4	4	7	6	2	6	2	8
肝臓: 肝細胞微細空胞	1	0	0	0	1	5	6	7	5	9

統計検定なし。

投与に関連があると考えられる変化は肝臓及び甲状腺のみに認められた。

肝臓では 10000ppm 群雌雄で軽微ないし軽度の変性性肝細胞を伴う類洞リンパ球集簇の発生頻度の僅かな増加が認められた。また、同群の雌では軽微ないし軽度の肝細胞微細空胞の発生頻度の僅かな増加が主に門脈周囲に認められ、典型的には肝臓全般にび漫性であった。

甲状腺では 10000ppm 群雄でのみ濾胞上皮肥大の発生頻度の増加が認められた。

以上の結果から、代謝物 G() のラットに対する 28 日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、標的臓器は肝臓及び甲状腺であった。10000ppm 群ではプロトンピン時間の延長(雄)、アルカリホスファターゼ活性の亢進(雌雄)、コレステロール及びトリグリセライドの増加(雌)、T4 の軽度低下と TSH の増加(雄)、肝臓の重量及び対体重比の軽度増加(雄; 雌は対体重比のみ)、肝臓に軽微ないし軽度の変性性肝細胞を伴う類洞リンパ球集簇(雌雄)及び肝細胞微細空胞の発生頻度の僅かな増加(雌)、並びに甲状腺で濾胞上皮肥大の発生頻度の増加(雄)が認められた。

5000ppm 群ではプロトンピン時間の延長(雄)、アルカリホスファターゼ活性の亢進(雌雄)、トリグリセライドの増加(雌)、肝臓の対体重比の軽度増加(雌雄)が認められた。

したがって、無毒性量 (NOAEL) は 500ppm (雄 45.7mg/kg/日、雌 50.4 mg/kg/日) と判断された。

10-5-2. 代謝物 G () 変異原性試験

(1) 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 76)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作製年:

検体純度: (代謝物 G)

方 法: ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella tryphimurium*, 5 菌株 (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538) を用い、ラットの肝臓から調製した代謝酵素系 (S-9 mix) 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。検体を溶解させるため、ジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。

検体を DMSO に溶解し、S-9 mix の存在下及び非存在下とも 250~5000 μ g/プレート の範囲の 5 用量で、2 回実施した。いずれの試験も 3 連制で行った。

用量設定根拠: TA100 を用いた用量設定試験では、最大用量の 5000 μ g/プレートで沈澱も細胞毒性も認められなかったため、5000 μ g/プレートを最大用量とした。

結 果: 結果は次頁の表に示す。

検体は S9 mix の有無に係らず、いずれの菌株にも復帰変異コロニー数の増加を認めなかった。

一方、陽性対照として用いたアジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、2-ニトロフルオレン、2-アミノアントラセンでは、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。

表 復帰変異試験結果 (3 プレートの平均値)

	薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9Mix 有無	復帰変異コロニー数/プレート					
				TA98	TA100	TA1535	TA1537	TA1538	
試験 1	溶媒対照 (DMSO)	-	-	35	128	19	13	14	
	検体	250	-	37	124	18	14	16	
		500	-	30	126	20	16	18	
		1000	-	39	119	22	17	18	
		2500	-	34	113	19	13	19	
		5000	-	37	125	18	16	19	
	溶媒対照 (DMSO)	-	+	37	135	16	20	22	
	検体	250	+	32	122	15	22	25	
		500	+	44	132	15	17	26	
		1000	+	36	107	14	17	20	
		2500	+	43	120	17	16	28	
		5000	+	41	108	15	17	27	
	陽性 対照	アジ化ナトリウム	1	-		773	525		
		9-アミノアクリジン	50	-				228	
2-ニトロフルオレン		1	-	417				427	
2-アミノアントラセン		2	+	2212	2928	308	242	2044	
試験 2	溶媒対照 (DMSO)	-	-	31	124	18	11	16	
	検体	250	-	29	115	19	9	10	
		500	-	29	107	23	15	15	
		1000	-	32	118	20	11	13	
		2500	-	35	115	19	12	21	
		5000	-	39	112	19	16	17	
	溶媒対照 (DMSO)	-	+	41	98	16	17	24	
	検体	250	+	35	113	20	17	24	
		500	+	36	114	13	14	26	
		1000	+	36	110	15	16	25	
		2500	+	42	108	12	16	30	
		5000	+	36	111	20	21	24	
	陽性 対照	アジ化ナトリウム	1	-		765	514		
		9-アミノアクリジン	50	-				313	
2-ニトロフルオレン		1	-	363				452	
2-アミノアントラセン		2	+	2566	1934	289	335	2174	

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) 代謝物 G () の染色体異常誘発性

ヒトリンパ球を用いる *in vitro* 染色体異常試験

(資料 77)

試験機関 :

[GLP対応]

報告書作製年 :

検体純度 : (代謝物 G)

試験方法 : 男性から採血し、組織培養液(10%牛胎児血清+ヘパリンナトリウム+ペニシリン+ストレプトマイシン+グルタミン添加)で希釈し、フィトヘマアグルチニンを添加して、毎日軽く振盪して細胞を浮遊させながら、約 48 時間培養して用いた。この浮遊液を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 に溶解して試験した。試験は 2 反復で行った。

試験 1 : DMSO に対する検体の溶解度は 250mg/mL であったが、培地を加え 5000 μ g/mL とすると培地に溶解せず、1800 μ g/mL では溶解したが、5000 μ g/mL を最高濃度とし、S-9 Mix の存在下及び非存在下とも 39.06、78.13、156.25、312.5、625、1250、2500 及び 5000 μ g/mL の試験濃度とした。

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(MC)、S9 Mix 存在下:シクロホスファミド(CPA)]を加えた。

S-9 Mix の非存在下及び存在下とも検体含有培地で細胞を 3 時間培養後、遠心分離し、細胞ペレットを新鮮培地に再浮遊させて、さらに 17 時間培養した。培養終了 2 時間前にコルセミド 0.1 μ 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、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溶媒対照の 50% まで低下、かつ染色体の形態が良好である用量を最高評価用量として、1250、2500 及び 5000 μ g/mL を選定して評価した。評価は各培養の 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、切断、交換、その他(8 以上の異常、細粉化)に分類した。

試験 2 : S-9 Mix の非存在下では連続 20 時間検体含有培地で培養とし、S-9 Mix の存在下では試験 1 と同様に 3 時間検体含有培地で培養した後、検体無添加培地で 17 時間培養した。これ以外は下記の点を除いて試験 1 と同条件で行った。

試験濃度 : S-9 Mix の非存在下 - 312.5、625、1250、2500、3750 及び 5000 μ g/mL

S-9 Mix の存在下 - 625、1250、2500 及び 5000 μ g/mL

評価濃度：S-9 Mix の非存在下 - 625、1250 及び 2500 $\mu\text{g/mL}$

S-9 Mix の存在下 - 1250、2500 及び 5000 $\mu\text{g/mL}$

結果：染色体異常の観察結果を表 1、細胞毒性の結果を表 2 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、陽性対照群ではマイトマイシン C 及びシクロホスファミドとも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。

表 1 染色体異常の観察結果 (2 プレーットの合計値)

薬物	温度 $\mu\text{g/ml}$	S-9 Mix 有無	観察 細胞 数	染色体異常数						異常細胞数 (%)			
				キ ャ ッ	染色分体		染色体		その 他*	キ ャ ッ を含む		キ ャ ッ を除く	
					切断	交換	切断	交換		細胞数	平均%	細胞数	平均%
試験 1 時間処理後 17 時間培養													
溶媒対照 (DMSO)	0	-	200		1		2			3	1.5	3	1.5
検体	1250	-	200		1					1	0.5	1	0.5
	2500	-	200	1	3					4	2.0	3	1.5
	5000	-	200		1					1	0.5	1	0.5
陽性対照 (MC ^b)	0.2	-	200		11	2	5			16	8.0 \uparrow	16	8.0 \uparrow
溶媒対照 (DMSO)	0	+	200				1			1	0.5	1	0.5
検体	1250	+	200	1	1					2	1.0	1	0.5
	2500	+	200							0	0.0	0	0.0
	5000	+	200	1	3					4	2.0	3	1.5
陽性対照 (CPA ^c)	6	+	200	1	20	1	1			22	11.0 \uparrow	21	10.5 \uparrow
試験 2 20 時間連続処理培養 (-S9) / 3 時間処理後 17 時間培養 (+S9)													
溶媒対照 (DMSO)	0	-	200		1					1	0.5	1	0.5
検体	625	-	200				1			1	0.5	1	0.5
	1250	-	200		4		1			5	2.5	5	2.5
	2500	-	200		1					1	0.5	1	0.5
陽性対照 (MC ^b)	0.1	-	200		18	9	5			29	14.5 \uparrow	29	14.5 \uparrow
溶媒対照 (DMSO)	0	+	200		2					2	1.0	2	1.0
検体	1250	+	200		3					3	1.5	3	1.5
	2500	+	200		2					2	1.0	2	1.0
	5000	+	200		1					1	0.5	1	0.5
陽性対照 (CPA ^c)	6	+	200		27	3				27	13.5 \uparrow	27	13.5 \uparrow

* : 8 以上の異常、細粉化等

^b : マイトマイシン C (MC)

^c : シクロホスファミド (CPA)

統計学的方法 : Fisher 検定 \uparrow : $P < 0.01$ $\uparrow\uparrow$: $p < 0.001$

表 2 細胞毒性—分裂指数(反復当たり 1000 細胞を観察)

薬物	S-9 Mix の有無	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	試験 1			試験 2		
			3 時間処理後 17 時間培養			20 時間連続処理培養(-S9)/ 3 時間処理後 17 時間培養(+S9)		
			平均分裂 ^a 指数%	相対分裂 指数%	倍数性 ^b %	平均分裂 ^a 指数%	相対分裂 指数%	倍数性 ^b %
溶媒対照 DMSO	-	0	7.7	100	0.0	4.6	100	0.3
検体	-	39.06	9.7	126				
	-	78.13	9.2	119				
	-	156.25	7.1	92				
	-	312.5	7.1	92	3.7	80		
	-	625	8.2	106	3.7	80		
	-	1250	7.3	95	3.9	85		
	-	2500	8.0	104	3.1	67	0.1	
	-	3750				1.6	35	
	-	5000	3.4 ^c	44	0.1	d		
溶媒対照 DMSO	+	0	8.8	100	0.0	8.9	100	0.0
検体	+	39.06	6	68				
	+	78.13	5.3	60				
	+	156.25	7.7	88				
	+	312.5	8.8	100				
	+	625	7.7	88	11.5	129		
	+	1250	7.2	82	9.5	107		
	+	2500	6.7	76	7.1	80		
	+	5000	4.4 ^c	50	0.3	6.1	69	0.1

a: 合計 2000 細胞を調査

b: 合計 1000 細胞を調査

c: 処理時に沈殿を観察した。

d: ほとんど細胞がなく、分裂細胞がなかった。

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

10-6. 代謝物 D : (動植物、土壤中の代謝物、水中光分解物)の急性経口毒性試験

ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 78)

試験機関 :

(英国)

報告書作製年 :

検体の純度 : (代謝物 D)

試験動物 : CrI : CD (SD) BR 系 (VAF Plus) ラット、5~8 週齢、体重 : 雄 150~179g、雌 126~141g、1 群雌雄各 5 匹、

試験期間 : 14 日間観察

投与方法 : 検体をゴマ油に溶解して、10mL/kg を経口投与した。投与前に一晚絶食した。

試験項目 : 中毒症状及び生死を 14 日間観察した。試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結 果 :

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ 値 (mg/kg) (95% 信頼限界)	>2000
死亡開始時間 及び終了時間	死亡なし
症状発現時期 及び消失時期	投与 1 時間後から発現 2 日に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	<2000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2000

中毒症状として、自発運動の低下が認められた。

剖検所見では、主要な組織器官に特記すべき変化は認められなかった。

10-7. 代謝物 H: (動植物中の代謝物)の毒性試験

10-7-1. ラットにおける急性経口毒性試験 (資料 79)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作製年:

検体純度: (代謝物 H)

試験動物: SPRAGUE DAWLEY 系ラット、6~7 週齢、体重: 雄 187~200g、雌 138~155g、1 群雌雄各 5 匹

試験期間: 14 日間観察

試験方法: 検体をコーンオイルに懸濁し、10mL/kg の容量で一夜絶食させた動物に単回強制経口投与した。

試験項目: 中毒症状及び生死を 14 日間毎日観察した。試験終了時に全例の肉眼的病理検査を行った。

試験結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雄雌 2000
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	2000 以上
症状発現及び消失時期	中毒症状なし
死亡開始及び終了時間	死亡例なし

死亡例はく、特記すべき中毒症状も認められなかった。

剖検所見では、主要な組織器官に特記すべき変化は認められなかった。

10-7-2. (代謝物 H) の変異原性試験

細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 80)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作製年:

検体純度: (代謝物 H) 純度

方法: ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella tryphimurium*, 5 菌株 (TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537) を用い、ラットの肝臓から調製した代謝酵素系 (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。検体を溶解させるため、ジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。

検体を DMSO に溶解し、S-9 mix の存在下では 100~5000 μg /プレートの範囲の 6 用量で、非存在下では 250~5000 μg /プレートの範囲の 5 用量で、実験 2 も実験 1 と同一濃度で試験した。いずれの試験も 3 連制で行った。

用量設定根拠: TA100 を用いた用量設定試験において、用量 1~5000 μg /プレートの範囲の 9 用量で実施した。S-9 mix 存在下では 5000 μg /プレートではプレート 2 枚とも極端なバックグランド菌叢の抑制が認められた。また、2500 μg /プレートでは 1 枚のプレートで軽度ないし中程度の菌叢の抑制が認められた。S-9 Mix 非存在下は細菌の生育への影響が認められなかった。この結果から上記の用量を選定した。

結果: 結果は次頁の表に示す。

実験 1 では S-9 mix の存在下では 5000 μg /プレートで全ての菌株、2500 μg /プレートで TA100, TA1535 及び TA1537 のバックグランド菌叢の抑制が認められた。実験 2 では S-9 mix の非存在下では 5000 μg /プレートで TA100, TA1535 及び TA1537, 2500 μg /プレートで TA100 のバックグランド菌叢の抑制が認められた

このような条件下で、検体は代謝活性化系の有無に係わらず、いずれの菌株にも復帰変異コロニー数の増加を認めなかった。

一方、陽性対照として用いたアジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、2-ニトロフルオレン、2-アミノアントラセン、クメベルオキシドでは、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

表 復帰変異試験結果 (3 プレーットの平均値)

	薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9Mix 有無	復帰変異コロニー数/プレート					
				塩基対置換型			フレームシフト型		
				TA1535	TA100	TA102	TA1537	TA98	
試験 1	溶媒対照 (DMSO)	-	-	16	119	370	10	34	
	検体	250	-	16	113	373	12	39	
		500	-	15	107	364	13	32	
		1000	-	15	125	353	14	32	
		2500	-	15	126	323	17	30	
		5000	-	12	139	356	13	31	
	溶媒対照 (DMSO)	-	+	13	160	461	18	42	
	検体	100	+	12	146	456	16	33	
		250	+	13	175	428	16	32	
		500	+	12	147	437	17	40	
		1000	+	13	135	423	17	42	
		2500	+	13a	120a	423	14a	32	
		5000	+	13b	100b	437a	13b	31a	
	陽性 対照	アジ化ナトリウム	1	-	401	554			
		9-アミノアクリジン	50	-				457	
2-ニトロフルオレン		1	-					258	
クメンペルオキシド		200	-			959			
2-アミノアントラセン		2	+	214	1887	694	220	1928	
2-アミノアントラセン		5	+			1245			
試験 2	溶媒対照 (DMSO)	-	-	23	172	335	17	32	
	検体	250	-	18	167	342	20	41	
		500	-	13	168	327	13	33	
		1000	-	20	187	340	15	32	
		2500	-	14	140a	363	18	41	
		5000	-	17a	91b	356	15a	39	
	溶媒対照 (DMSO)	-	+	13	134	427	13	32	
	検体	100	+	11	132	450	20	38	
		250	+	12	130	409	11	31	
		500	+	12	138	432	19	43	
		1000	+	11	145	440	17	32	
		2500	+	14	140	469	16	40	
		5000	+	14	141	443	14	35	
	陽性 対照	アジ化ナトリウム	1	-	542	677			
		9-アミノアクリジン	50	-				596	
2-ニトロフルオレン		1	-					393	
クメンペルオキシド		200	-			1334			
2-アミノアントラセン		2	+	293	2002	660	208	2134	
2-アミノアントラセン		5	+			1139			

a: 軽度ないし中程度のバックグラウンド菌叢の抑制

b: 極端なバックグラウンド菌叢の抑制

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

10-8. 代謝物 I : (植物中の代謝物)の急性経口毒性試験

ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 81)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作製年:

検体純度: (代謝物 I)

試験動物: SPRAGUE DAWLEY 系ラット、9~10 週齢、体重: 雄 303~314g、雌 187~202g、1 群雌雄各 5 匹

試験期間: 14 日間観察

試験方法: 検体をコーンオイルに懸濁し、10mL/kg の容量で一夜絶食した動物に単回強制経口投与した。

試験項目: 中毒症状及び生死を 14 日間観察した。試験終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行った。

試験結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雄雌 2000
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	2000 以上
死亡開始及び終了時間	死亡例なし

死亡例はなく、特記すべき中毒症状も認められなかった。

剖検所見では、主要な組織器官に特記すべき変化は認められなかった。