

イミダクロプリドのラットを用いた催奇形性試験

(毒性資料 No. 原体-28)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 1992 年 1 月 8 日

検体の純度 :
試験動物 : ウィスターHan (Kfm:WIST) 系妊娠ラット (1 群 25 匹を交配)
11 週齢：(妊娠 0 日雌体重；184～240g)
投与期間 : 10 日間 妊娠 6～15 日
試験期間 : 1987 年 7 月 13 日～1987 年 8 月 12 日

試験方法：

検体を、0.5%クレモホア EL 蒸留水溶液に懸濁し、動物に 10mL/kg の容量で 0 (対照群)、10、30、100mg/kg の投与量を、妊娠 6 日目から 15 日目までの 10 日間毎日 1 回経口投与した。母動物を妊娠 21 日に帝王切開し、胎児を観察した。

交配および妊娠 0 日：

無処理の雌 1 匹のラットを雄 1 匹と一晚同居させ交配させた。膣スメアに精子が確認されたか、膣栓が観察された日を妊娠 0 日とした。

観察・検査項目：

親動物；妊娠 0 日から 20 日まで全動物について一般状態を毎日 2 回観察した。体重は妊娠 0 日及び 6 日から 21 日まで毎日測定した。交尾後 0 日から 20 日までの増体重から、妊娠 21 日の子宮重量を差し引いて、補正増体量を計算した。摂餌量については、妊娠 0～6、6～11、11～16 及び 16～21 日に測定した。帝王切開時(妊娠 21 日)には、肉眼的病理検査、黄体数、着床数、子宮重量、空着床(極めて早期の吸収胚)、胎芽吸収胚(無定形胚が認められる)、胎児吸収(胎児の吸収が認められる)及び死亡胎児(生命徴候がない)数、生存胎児数、

矮小児について調べた。

生存胎児；性別、体重、外表異常の観察を行った。

各同腹児群の約1/2の胎児については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4にまとめた。

1. 母動物に対する所見

1) 症状及び死亡率

本試験期間中、いずれの用量においても死亡例は認められなかった。また、いずれの用量においても検体投与に関連すると考えられる症状は観察されなかった。

溶媒対照群の1例(交尾後15日から)と100mg/kg群の1例(交尾後11日から)に背部や胸部の脱毛が認められたが、この所見は自然発生性の変化であり、検体投与の影響ではないものと判断した。

2) 摂餌量および体重

全ての用量群で、投与期間の前半5日間に平均摂餌量の統計学的有意な減少が認められた。溶媒対照群の平均摂餌量と比較した場合、100mg/kg群では35.5%、30mg/kgでは10.0%、10mg/kgでは9.5%減少した。投与期間の後半の5日間では、100mg/kg群の平均摂餌量は統計学的有意に19.9%減少し、30mg/kgの摂餌量は対照群と同等、10mg/kgの摂餌量は6.8%増加した。一方、投与期間中の増体重は30mg/kgではわずかに、100mg/kg群では統計学的有意に抑制された*。このように、摂餌量と体重への影響は100mg/kg群では明らかに、30mg/kg群ではわずかに認められた。しかし10mg/kg群にみられた摂餌量の減少は一過性で投与初期に限られ、その後には増加していること、さらには増体重に影響が見られていないことから、偶発性の変化であるものと考えられた。

*申請者注)体重は、100mg/kgでは妊娠8日(投与開始2日後)から対照群に比べ統計学的に有意な低値を示した。30mg/kgでは対照群に比べ統計学的に有意な低体重は認められなかった。摂餌量については5日間/6日の間隔で測定しているため、急性的な影響を確認できなかったが、体重に統計学的に有意差の伴わない程度のわずかな摂餌量の低下を毒性影響とはとらえなかった。従って、本検体はいずれの群においても摂餌量、体重に急性的な毒性影響を示さないものと考えられた。

表 1. 平均摂餌量 (g/雌/日)

投与用量 (mg/kg/日)	0	10	30	100
交配後 0 - 6 日	20.0	20.7	20.1	20.1
6 - 11 日	21.1	↓19.1	↓19.0	↓13.6
11 - 16 日	23.6	25.2	22.9	↓18.9
16 - 21 日	22.9	↑25.2	24.2	↑27.6

↑↓ : p<0.01 (Dunnett Test)

3) 補正体重

子宮およびその内容物の重量を最終体重から除去し、補正体重を求めた。

その結果、10mg/kg 群の補正体重増加量には溶媒対照群との差を認めなかったが、30mg/kg の補正体重増加量はわずかに、100mg/kg 群では統計学的有意に (-47%) 減少した。

表 2. 平均母動物体重

投与用量 (mg/kg/日)	0	10	30	100
交配後 0 日体重 (g)	208	214	210	208
平均体重増加量 (g)				
交配後 0-6 日	21	22	21	21
交配後 6-16 日	47	45	42	↓27
交配後 16-21 日	52	57	52	60
補正体重増加量 (g)				
交配後 6-21 日	18.1	20.2	12.9	↓9.6
最終体重 (g)	327.6	338.0	325.0	316.2
子宮重量 (g)	80.5	81.5	81.4	77.9

↓ : p<0.01 (Dunnett Test)

2. 子宮内発育に対する所見

着床痕を伴う妊娠動物数及び黄体数、着床前死胚数、着床後死胚数及び着床数については、全投与群で対照群の値との間に有意な差は認められなかった。

胎児数に検体の影響は認められなかった。100mg/kg 群では胎児の性比に統計学的有意差が認められたが、用量設定試験で用いたより高用量の 150mg/kg において性比に変化を見ていないことから、偶発性の変動と考えられた。胎児体重に検体の影響は認められなかった。

表 3. 平均生存胎児体重 (g) (腹毎)

用量 (mg/kg)	0	10	30	100
雄	4.9	5.0	4.9	5.0
雌	4.7	4.7	4.7	4.7
合計	4.8	4.8	4.8	4.9

Steel Test

3. 子宮内発育に対する所見

1) 外表検査

溶媒対照群の 314 胎児、10mg/kg 群の 312 胎児、30mg/kg 群の 305 胎児、100mg/kg 群の 297 胎児において、外表の異常所見は認められなかった。

2) 内臓検査：

溶媒対照群の 156 胎児、30mg/kg 群の 152 胎児、および 100mg/kg 群の 148 胎児の検査において異常所見は認められなかった。

10mg/kg 群では 1 例の母動物の 1 胎児に脳周辺の重度の出血がみられ、側脳室が拡張していた。この例はさらに心臓が肥大-心耳が血液で拡張し、心室壁が肥厚していた。これらの所見は偶発的なものであり、投与に関連していないものと考えられた。

3). 骨格検査

10mg/kg 群あるいは 30mg/kg 群と溶媒対照群との間に、骨格異常所見のタイプおよび発生頻度に差は認められなかった。100mg/kg 群で波状肋骨を有する例がわずかに増加したが(～4 腹、～7 胎児)、背景データ(～4 腹、～6 胎児)と極めて同程度で、投与の影響とは考えなかった。

骨格発育所見では、10mg/kg 群あるいは 30mg/kg 群と溶媒対照群との間に認められた有意差は背景データ範囲内にあり偶発的な所見と考えられた。100mg/kg 群での化骨不全における発生頻度の統計学的有意な増加は、検体投与による母毒性に起因する影響とも考えられたが、一方で種々の骨組織に化骨の促進が見られており、検体投与との関連性は明らかではないものとも考えられた。

以上の結果より、本検体を妊娠ラットに 100mg/kg までの用量で投与したとき、母動物に対する影響として 30mg/kg 以上で摂餌量の減少および体重増加抑制がみられた。一方、胎児に対する影響として 100mg/kg 群の化骨不全の発生頻度の増加が認められた。

以上のことから、母動物に対する無毒性量は 10mg/kg/日、胎児に対する無毒性量は 30mg/kg/日であった。

検体の直接的な催奇形性作用は 100mg/kg/日まで認められなかった。

表 4-1. 結果の概要

投与用量 (mg/kg/日)		0	10	30	100
交配動物数		25	25	25	25
受胎動物数		25	25	24	25
妊娠維持動物数		25	25	24	25
母動物	一般症状	-	-	-	-
	死亡	0	0	0	0
	流産	0	0	0	0
	全吸収胚雌数	0	0	0	0
	体重 d	-	-	-	↓↓
	摂餌量 d	-	-	↓	↓↓
	剖検所見	-	-	-	-
	★黄体数 s	14.6	14.8	14.7	13.7
	★着床数 f	13.6	13.3	13.3	12.7
	★着床前死胚数 f	1.0	1.6	1.5	1.0
	★着床後死胚数 f	1.0	0.8	0.5	0.8
	★生存胎児数 f	12.6	12.5	12.7	11.9
★雄の割合 (%) ¹⁾ f	51.0	50.0	51.1	59.6*	
★生存胎児体重(g) s	4.8	4.8	4.8	4.9	

1) 性比/背景データ 45.0%~51.9%, 投与設定のための予備試験(本報告書に添付), 対照群 41.4%, 150mg/g 50.0%)

d : Dunnett 検定(↓:p<0.05, ↓↓:p<0.01) f : Fisher 検定(*:p<0.05, **:p<0.01)

s : Steel 検定

表 4-2. 結果の概要

投与用量 (mg/kg/日)		0	10	30	100
外表検査	検査胎児数	314	312	305	297
	奇形を認めず	314	312	305	297
	異常を認めず	314	312	305	297
内臓検査	検査胎児数	156	157	152	148
	異常 脳周辺出血、側脳室拡張、心耳出血性拡張を伴う心室肥厚	0	1	0	0
児動物 骨格検査	検査胎児数	158	155	153	149
	奇形				
	波状肋骨 ¹⁾	2(1)	1(1)	0	7(4)
	胸椎の分離	1(1)	0	0	0
	変異				
	ダンベル型胸椎体	0	2(2)	2(2)	2(2)
	肋骨過剰(左)	23	21	16	19
	肋骨過剰(右)	20	20	15	16
	化骨不全				
	第2頸椎	21	↑34	▲39	▲50
	第3頸椎	2	↑8	2	▲15
	第4頸椎	0	4	2	▲9
	第2胸骨分節	18	24	▲41	▲51
	第5胸骨分節	132	131	130	↑136
	化骨不全				
	第2前肢近位指骨(左)	42	37	↓24	↓13
化骨不全					
第2前肢遠位指骨(左)	39	38	41	↓20	
化骨不全					
第2前肢近位指骨(右)	34	32	↓24	↓13	
化骨不全					
第2前肢遠位指骨(右)	30	28	29	↓14	
化骨不全					
第4後肢近位指骨(左)	66	51	↓43	↓24	
化骨不全					
第4後肢遠位指骨(左)	66	47	39	↓21	
化骨不全					
第4後肢近位指骨(右)	60	52	↓43	↓28	

1): 背景データ: 0~6 胎児、0~4 腹
 ↑ ↓: p<0.05, ▲ ▼: p<0.01; Fisher 検定
 ()内の数字: 母動物数

イミダクロプリドのウサギを用いた催奇形性試験

(毒性資料 No. 原体-29)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：1992年1月8日

検体の純度：
試験動物：チンチラウサギ(CHbb, CH Hibrids) (1群16匹を交配)
4~6ヶ月齢：(妊娠0日雌体重；2650~4060g)
投与期間：13日間 妊娠6~18日
試験期間：1987年6月1日~1987年7月8日

試験方法：

検体を、0.5%クレモホアEL蒸留水溶液に懸濁し、動物に4mL/kgの容量で0(対照群)、8、24、72mg/kgの投与量を、妊娠6日目から18日目までの13日間毎日1回経口投与した。母動物を妊娠28日に帝王切開し、胎児を観察した。

交配および妊娠0日：

無処理の雌1匹のウサギを雄1匹と一晚同居させ交配させた。交尾行動が観察された日を妊娠0日とした。

観察・検査項目：

親動物；妊娠 0 日から 28 日まで全動物について一般状態を毎日 2 回観察した。体重は妊娠 0 日から 28 日まで毎日測定した。交尾後 0 日から 28 日までの増体重から、妊娠 28 日の子宮重量を差し引いて、補正増体量を計算した。摂餌量については、妊娠 0～6、6～11、11～15、15～19、19～24 および 24～28 日に測定した。帝王切開時(妊娠 28 日)には、肉眼的病理検査、黄体数、着床数、子宮重量、空着床(極めて早期の吸収胚)、胎芽吸収胚(無定形胚が認められる)、胎児吸収(胎児の吸収が認められる)及び死亡胎児(生命徴候がない)数、生存胎児数、矮小児について調べた。

生存胎児；体重を測定し、外表異常の観察を行った。

全ての胎児を剖検し内臓の異常を記録した。性別を記録し、さらに皮膚を剥離して頭蓋の化骨状況を観察した。頭部はトリクロロ酢酸・ホルマリン混合液で固定後、連続切片を作成して観察した。体幹部は水酸化カリウム溶液に浸漬し、骨格異常の有無を検査した。

試験結果：

概要を表 4 にまとめた。

1. 母動物に対する所見

1) 症状及び死亡率

本試験期間中、最高用量群 (72mg/kg) の 2 例が死亡した。これらの例では摂餌量や増体重が減少した。さらにこの内の 1 例は死亡前の 3 日間白色粘液状の糞を排泄した。また、最高用量群 (72mg/kg) の 1 例は交尾後 26 日に流産し、別の 2 例には全吸収胚が認められた。これらの所見はいずれも検体投与に関連する変化と考えられた。

その他の用量群に検体投与に起因した症状や死亡例は認められなかった。

2) 摂餌量および体重

中間用量群 (24mg/kg) では交尾後 6～11 日に、また最高用量群 (72mg/kg) では交尾後 6～19 日において、摂餌量が用量相関的に減少した*。一方、最高用量群 (72mg/kg) の摂餌量が交尾後 24～28 日に統計学的有意に増加したが、これは代償性の変化と考えられた。低用量群の摂餌量に変化は認められなかった。

中間用量群 (24mg/kg) では一時的に(有意差なし)、また最高用量群 (72mg/kg) では交尾後 6～19 日において、増体重が統計学的有意に抑制された*。なお、最高用量群の体重は投与終了後急速に増加し、剖検時の体重に対照群との差を認めなかった。低用量群の増体重に変化は認められなかった。

表 1. 平均摂餌量 (g/雌/日)

投与用量 (mg/kg/日)	0	8	24	72
交配後 0 - 6 日	207.3	212.8	214.3	206.1
6 - 11 日	198.7	205.8	↓166.1	↓66.9
11 - 15 日	194.3	199.8	190.6	↓112.1
15 - 19 日	197.5	182.4	206.1	↓87.1
19 - 24 日	160.0	185.6	196.0	178.9
24 - 28 日	108.3	107.1	132.8	↑198.2

↑ ↓ : p<0.05, ↓ : p<0.01 (Dunnett Test)

*申請者注)体重は、72mg/kg では妊娠 11 日(投与開始 5 日後)から対照群に比べ統計学的に有意な低値を示した。24mg/kg では対照群に比べ統計学的に有意な低体重は認められなかった。摂餌量については 5 日間/6 日の間隔で測定しているため、単回投与による影響は確認できないが、体重に統計学的に有意差の伴わない程度のわずかな摂餌量の低下を毒性影響とはとらえなかった。以上のことから、本検体で認められた体重および摂餌量への毒性影響は単回投与によるというよりはむしろ複数回投与によって起こったものと考えられた。

3) 補正体重

子宮およびその内容物の重量を最終体重から除去し、補正体重を求めた。

その結果、いずれの用量群の補正体重にも溶媒対照群との統計学的有意な差を認めなかったが、72mg/kg の補正体重は溶媒対照群(-5.9%)に比して大きく(-8.2%)減少した。

表 2. 平均母動物体重

投与用量(mg/kg/日)	0	8	24	72
交配後 0 日体重(g)	3348	3286	3222	3239
平均体重増加量(g)				
交配後 0-6 日	154	191	161	188
交配後 6-19 日	147	141	99	↓-173
交配後 19-28 日	91	72	115	↑269
補正体増加重(g)				
交配後 6-28 日	-207.5	-233.8	-205.5	-284.2
最終体重(g)	3740	3690	3597	3458
子宮の重量(g)	445.8	446.7	419.8	379.9

↑ ↓ : p<0.01 (Dunnett Test)

2. 剖検所見

溶媒対照群、低用量群、中間用量群のそれぞれ1例の腎に粗面がみられ、低用量群の1例に肝の退色が、さらに最高用量群の死亡した1例に赤色清明な腹水約500mlが観察されたが、いずれも偶発性の変化と考えられた。

3. 子宮内発育に対する所見

最高用量群(72mg/kg)では2例が死亡し、評価から除外した。この群では他に2例が全吸収胚、1例が流産した。これら3例を除外して評価した場合(A)においては、着床後前胚数、着床後死胚数は統計学的有意に増加し、これに伴って総着床数や胎児総数が有意に減少した。一方これら3例を含めて評価した場合(B)においても、着床後死胚数が有意に増加し、胎児総数は有意に減少した。

中間用量群および低用量群の妊娠動物数及び黄体数、着床前死胚数、着床後死胚数及び着床数については、対照群の値との間に有意な差は認められなかった。

性比に検体の影響は認められなかった。

検体の72mg/kgを投与した結果、胎児毎に計算した胎児の体重が統計学的有意に減少し、これは母体毒性に起因したものと考えられた。なお、低用量群においても胎児毎に計算した胎児体重が統計学的有意に減少(5.6%)したが、1母体の胎児の著明な低体重に起因した変動で、さらに中間用量群では差が認められていないことから、この有意な減少は偶発性の変動と考えられた。

表 3-1. 平均生存胎児体重 (腹毎)

用量(mg/kg)	0	8	24	72
雄	34.2	32.4	34.0	31.3
雌	34.5	33.0	33.8	31.8
合計	34.3	31.6	33.7	31.3

Steel Test

表 3-2. 平均生存胎児体重 (胎児毎)

用量(mg/kg)	0	8	24	72
雄	34.2	32.3**	33.7	30.8**
雌	34.3	33.1	33.6	31.4*
合計	34.0	31.2**	33.8	30.0**

* : p<0.05, ** : p<0.01 (Steel Test)

4. 胎児の所見

1). 外表検査

矮小児を除けば、低、中間用量群においても外表の異常所見は認められなかった。

最高用量群 1 腹の 1 胎児が短尾であった。また、この群の 2 腹 3 胎児が矮小児であった。この群では 5 腹の胎児体重が著明に影響されていたことから、これらの矮小児は検体投与による著明な母体毒性に関連したものと考えられた。

低用量群の 1 母体から得られた 7 匹中 5 匹の胎児が矮小児 (19g 以下) であり、残りの 2 匹も低体重であった。この所見は、交尾後 14~23 日に見られた母体の著明な体重減少 (291g) に関連したもので、偶発性の変化と考えられた。

2). 内臓検査 :

全ての群の胎児の剖検において何らの異常も観察されなかった。

溶媒対照群、低用量群、最高用量群の頭部検査において、何らの異常も観察されなかった。

中間用量群の 1 胎児に内水頭症が認められたが、偶発性の変化と考えられた。

3). 骨格検査

8mg/kg 群あるいは 24mg/kg 群に投与に関連すると考えられる骨格異常所見は認められなかった。

最高用量群 (72mg/kg) 胸骨分節の左右非対称や癒合などの異常を示す胎児数 (3 腹、5 例) が溶媒対照群 (1 腹、2 例) に比してわずかに増加したが、これら 5 例中 4 例が著明な低体重であったことから、見られた異常所見はいずれも発育の遅延の結果と考えられた。

全ての用量群で種々の骨組織に化骨の遅延・促進が見られたが、検体投与との関連性は明らかではなかった。

以上の結果より、本検体を妊娠ウサギに 72mg/kg までの用量で投与したとき、母動物に対する影響として 24mg/kg 以上で摂餌量の減少および体重増加抑制がみられ、さらに 72mg/kg では流産や全吸収胚を示す例も認められた。一方、胎児に対する影響として 72mg/kg 群で母体毒性に起因した着床数や胎児数の減少、胎児体重の減少、骨格異常を示す胎児数の増加が認められた。

以上のことから、母動物に対する無毒性量は 8mg/kg/日、胎児に対する無毒性量は 24mg/kg/日であった。

検体の直接的な催奇形性作用は 72mg/kg/日まで認められなかった。

表 4-1. 結果の概要

投与用量 (mg/kg/日)		0	8	24	72	
交配動物数		16	16	16	16	
妊娠維持動物数 (A)		16	16	16	11	
受胎動物数 (B)		16	16	16	14	
母動物	一般症状	-	-	-	-	
	死亡	0	0	0	2	
	流産	0	0	0	1	
	全吸収胚雌数	0	0	0	2	
	体重 d	-	-	-	↓↓	
	摂餌量 d	-	-	↓	↓↓	
	剖検所見	-	-	-	-	
					(A)	(B)
	★黄体数 s	9.3	9.4	8.9	9.5	9.6
	着床数 f	8.9	9.0	8.1	8.5*	8.8
	着床前死胚数 f	0.4	0.4	0.8	1.1*	0.9
	着床後死胚数 f	0.4	0.4	0.1	0.9*	2.9**
	生存胎児数 f	8.5	8.6	7.9	7.5*	5.9**
	雄の割合 (%) f	47.1	57.7	48.0	56.6	
生存胎児体重(g)腹毎 s	34.5	32.4	34.0	31.3		
生存胎児体重(g)児毎 s	34.2	32.3**	33.7	30.8**		

d : Dunnett 検定 (↓ : p<0.05, ↓↓ : p<0.01) f : Fisher 検定 (*: p<0.05, **: p<0.01)

S : Steel 検定

表 4-2. 結果の概要

投与用量 (mg/kg/日)		0	8	24	72		
児動物	外表検査	検査胎児数	136	137	127	83	
		異常					
		短尾/残余の尾骨未化骨	0	0	0	1(1)	
		矮小児	0	5(1)	0	3(2)	
	内臓検査	検査胎児数	136	137	127	83	
		奇形					
		内水頭症	0	0	1	0	
	骨格検査	検査胎児数	136	137	127	83	
		奇形	第 2、5 胸骨分節欠損	0	0	0	2(1)
			肋骨癒合	1(1)	1(1)	0	2(2)
			腰椎、仙椎の椎弓拡張	0	1(1)	0	0
			胸骨分節異常骨化	0	0	0	2(1)
			胸骨分節分離	0	1(1)	0	0
			変異				
			ダンベル型胸椎体	1(1)	0	0	0
			胸骨分節左右非対称	0	1(1)	0	3(2)
		骨格検査	不全	化骨不全-第 5 胸骨分節	55	45	50
	化骨不全-第 6 胸骨分節			16	8	↓3	4
化骨不全-第 1 中指骨(左)	54			46	38	↓23	
化骨不全-	9			13	↑24	↑12	
第 1 前肢近位指骨 (左)							
化骨不全-第 1 中指骨 (右)	54			46	↓35	24	
化骨不全-	8			11	12	↓13	
第 1 前肢近位指骨 (右)							
骨格検査	不全	化骨不全-	14	↑33	↑25	↑32	
		第 4 後肢中位指骨 (左)					
骨格検査	不全	化骨不全-	81	↓52	84	↓37	
		第 4 後肢中位指骨 (右)					

↑ ↓ : p<0.05, ▲ ▼ : p<0.01 (Fisher 検定)

()内の数字 : 母動物数

(13) 変異原性
イミダクロプリドの細菌を用いた DNA 修復試験

(毒性資料 No. 原体-30)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年月日: 1990年6月18日

検体の純度: 94.7%

試験系: 細菌 (枯草菌: H17 株、M45 株)

試験方法:

(1) 検体の調製方法

使用溶媒として検体にはジメチルスルホキシド(DMSO)を用い、20 μ L に必要量を含有するよう調製した。検体は 5000 μ g/20 μ L が溶解限界濃度であり、この濃度を最高濃度と決定し、以下公比 2 で 5 用量を設定した。

陽性対照物質である 2-アミノアントラセンは DMSO に、もうひとつの陽性対照物質であるマイトマイシン C と陰性対照物質であるカナマイシンは蒸留水に溶解した。

(2) rec-assay (胞子法)

DNA 損傷の誘起作用を調べるために、*B. subtilis* の野生株である組換修復機構保持株(H17)と欠損株(M45)の胞子を用いた。

両菌株の胞子は、胞子浮遊液として 4 $^{\circ}$ C で保存しているものを使用した。約 45 $^{\circ}$ C に保った胞子法用のニュートリエントアガー 1L あたり胞子浮遊液を 10mL の割合で加え、攪拌後シャーレに 10mL ずつ分注し、室温で固化させた。代謝活性化させる場合は、S-9 mix*の 0.1mL をシャーレに分注してから胞子法用ニュートリエントアガーをシャーレに 10mL ずつ分注し、冷蔵庫で固化させた。次に検体あるいは対照物質を含む検体 20 μ L をしみ込ませたディスク(直径 8mm の円形濾紙)を 1 プレートに 2 枚置き、37 $^{\circ}$ C の孵卵器で 24 時間培養した。代謝活性化させる場合は、ディスクに補酵素液を 20 μ L、検体あるいは対照物質を含む検体 20 μ L をしみ込ませ同様な操作を行った。

そして両菌株の阻止円の直径を測定し、ディスクの直径を差し引いたものを生育阻止円(mm)の直径とした。そして両菌株の生育阻止円の直径の差が 5mm 以上の場合を陽性と判定した。

*S-9 mix ; 7 週齢雄の SD 系ラット肝ホモジネートから得た。誘導物質としてフェノバルビタール及び 5,6-ベンゾフラボンを使用

結果：

結果を次表に示した。

物質	濃度 μg/ディスク	- S-9 mix			+ S-9 mix		
		阻止円 (mm)		差 (mm)	阻止円 (mm)		差 (mm)
		H17	M45		H17	M45	
検体	312.5	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0
	625	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0
	1250	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0
	2500	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0
	5000	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0
マイトマイシン C ¹⁾ (MMC)	0.005	0	7	7	/	/	/
		0	7	7	/	/	/
	0.01	0	13	13	/	/	/
		0	13	13	/	/	/
2-アミノアントラセン ²⁾ (2-AA)	5	0	0	0	0	9	9
		0	0	0	0	11	11
	20	0	0	0	0	10	10
		0	0	0	0	11	11
硫酸カマイシン ¹⁾ (KM)	0.5	3	6	3	/	/	/
		3	6	3	/	/	/
	1.0	5	8	3	/	/	/
		5	8	3	/	/	/
ジメチルスルホキシド ²⁾ (DMSO)	20μL	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0

1) 蒸留水に溶解, 2) DMSO に溶解

表にみられるように検体は、312.5～5000μg/ディスクにわたる全濃度において S-9 mix の存在の有無にかかわらず両菌株ともに生育阻害が全く認められず、判定は陰性であった。対照物質の成績は、予期した結果が得られ適切な試験条件で実施されたことを保証するものであった。

従って、本剤には DNA 損傷の誘起作用は認められなかった。

イミダクロプリドの酵母を用いた体細胞組換え試験

(毒性資料 No. 原体-31)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1988年6月27日

検体の純度：

試験方法：2倍体の *Saccharomyces cerevisiae* D7 を用い、検体の 10000、2500、1250 および 625 μ g/mL の 5 用量 (S-9 mix 非存在下または S-9 mix 存在下) を用い *in vitro* 条件下で体細胞組換え (遺伝子交換または遺伝子交叉) について評価した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して用いた。陽性対照のメチルメタンサルホネート (MMS ; S-9 mix 非存在下) は DMSO に、シクロホスアミド (CYCL; S-9 mix 存在下) はリン酸緩衝液 (pH7.4) に溶解させた。試験はそれぞれ 2 回実施した。

試験操作

1mL の酵母保存浮遊液を 9mL の前培養完全液体培地にとり、28 $^{\circ}$ C で 5 時間前振とう培養 (150rpm) した。この浮遊液中には約 1 億個/mL のコロニーが存在した。その 0.5mL を検体 0.1mL、前培養完全液体培地 0.5mL、S-9mix または緩衝液 1.25mL 及び緩衝液 (残余) と混合し、計 5mL にして 37 $^{\circ}$ C で 16 時間で振とう培養 (150rpm) した。その培養液を遠心し細胞を洗浄した。

1) 遺伝子交換試験 (表 1~2)

上記培養液の 0.1mL をトリプトファン非含有培地 10 枚に播種し、28 $^{\circ}$ C で 3~6 日間培養し、その後 4~6 $^{\circ}$ C で 48 時間保存してから評価に供した。

2) 遺伝子交叉試験 (表 2~3)

プレートあたり約 200 個のコロニーが得られるように上記培養液を希釈し、その 0.2mL を寒天完全培地 10 枚に播種し、28 $^{\circ}$ C で 3~6 日間培養し、その後 4~6 $^{\circ}$ C で 48 時間保存して評価に供した。

結果及び考察

検体の 10000 $\mu\text{g/mL}$ までの用量では細胞毒性を示さなかった。なお、検体の 5000 $\mu\text{g/mL}$ 以上で析出がみられた。

表 1~4 に示す様に、用いた全用量において、検体はトリプトファン耐性株や赤色/桃色コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照物質の MMS (S-9 mix 非存在下) 及びシクロホスアミド (S-9 mix 存在下) では変異コロニー数が著明に増加した。

以上の結果より、本検体は代謝活性化の有無にかかわらず、*Saccharomyces cerevisiae* D7 を用いた体細胞組換え試験において非変異原性物質であると判断された。

表 1 遺伝子交換 (1回目試験)

用量 $\mu\text{g/mL}$	- S-9 mix			+ S-9 mix		
	トリプトファン非依存性コロニー数	推定コロニー数 $\times 10^5$	推定遺伝子交換割合 (%) $\times 10^{-5}$	トリプトファン非依存性コロニー数	推定コロニー数 $\times 10^5$	推定遺伝子交換割合 (%) $\times 10^{-5}$
0	29.2	116.9	2.498	27.1	134.5	2.015
625	20.2	90.5	2.232	29.7	140.2	2.118
1250	25.4	104.9	2.421	25.6	147.3	1.738
2500	19.4	103.0	1.993	20.6	119.7	1.721
5000	20.6	117.3	1.756	16.3	119.3	1.366
10000	20.2	110.2	1.833	24.4	159.9	1.526
陽性対照 [#]	271.3	98.9	27.432	132.2	163.8	8.071

[#]: 非代謝活性化: MMS (DMSO に溶解), 代謝活性化: シクロホスアミド (リン酸緩衝液 pH7.4 に溶解)

表 2 遺伝子交換 (2回目試験)

用量 $\mu\text{g/mL}$	- S-9 mix			+ S-9 mix		
	トリプトファン非依存性コロニー数	推定コロニー数 $\times 10^5$	推定遺伝子交換割合 (%) $\times 10^{-5}$	トリプトファン非依存性コロニー数	推定コロニー数 $\times 10^5$	推定遺伝子交換割合 (%) $\times 10^{-3}$
0	20.1	194.7	1.032	26.0	219.9	1.182
625	21.8	173.7	1.255	30.2	218.0	1.385
1250	—	193.8	0.000	—	—	—
2500	19.8	180.4	1.098	22.1	224.6	0.984
5000	17.4	146.3	1.189	28.8	164.8	1.748
10000	13.3	145.7	0.913	22.8	173.8	1.312
陽性対照 [#]	304.8	146.1	20.862	418.7	222.6	18.810

[#]: 非代謝活性化: MMS (DMSO に溶解), 代謝活性化: シクロホスアミド (リン酸緩衝液 pH7.4 に溶解)

—: 判定できず

表 3 遺伝子交叉 (1回目試験)

用量 μg/mL	- S-9 mix			+ S-9 mix		
	赤色/桃色 コロニー数	総 コロニー数	遺伝子交叉 割合(%) ×10 ⁻²	赤色/桃色 コロニー数	総 コロニー数	遺伝子交叉 割合(%) ×10 ⁻²
0	1.4	234	0.60	1.0	269	0.37
625	1.1	181	0.61	2.0	280	0.71
1250	1.5	210	0.71	1.5	295	0.51
2500	1.8	206	0.89	1.3	239	0.54
5000	0.5	235	0.21	0.7	239	0.29
10000	0.8	220	0.36	2.7	320	0.84
陽性対照 [#]	7.7	198	3.89	4.4	328	1.37

[#]:非代謝活性化:MMS(DMSOに溶解), 代謝活性化:シクロホスアミド(リン酸緩衝液 pH7.4に溶解)

表 4 遺伝子交叉 (2回目試験)

用量 μg/mL	- S-9 mix			+ S-9 mix		
	赤色/桃色 コロニー数	総 コロニー数	遺伝子交叉 割合(%) ×10 ⁻²	赤色/桃色 コロニー数	総 コロニー数	遺伝子交叉 割合(%) ×10 ⁻²
0	1.4	389	0.36	2.0	440	0.45
625	1.8	347	0.52	2.8	436	0.64
1250	2.2	388	0.57	—	—	—
2500	2.8	361	0.77	2.6	449	0.58
5000	1.5	293	0.51	1.8	330	0.55
10000	1.1	291	0.38	2.3	348	0.66
陽性対照 [#]	6.1	292	2.09	5.9	445	1.33

[#]:非代謝活性化:MMS(DMSOに溶解), 代謝活性化:シクロホスアミド(リン酸緩衝液 pH7.4に溶解)

—:判定できず

イミダクロプリドの細菌を用いた復帰突然変異試験

(毒性資料 No. 原体-32)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1991年1月17日

検体の純度：

試験方法：プレインキュベーション法

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) の4株及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* の1株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 mix) の非存在下及び存在下で Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、312.5～5000 μ g/プレートの範囲で5濃度で実施した。陽性対照物質も DMSO に溶解した。

試験は3反復とし、再現性を見るために2回行った。

復帰変異コロニー数が2倍以上で用量相関性を示した場合を変異原性陽性と判定した。

結果及び考察 (表1、2)：

次表に結果を示したが、2回の試験共代謝活性化の有無にかかわらず溶媒対照の復帰変異コロニー数の2倍以上でかつ用量相関性のある増加はどの菌株においても認められなかった。

一方、2回の試験共、陽性対照として用いた AF-2¹⁾、ENNG²⁾、9-AA³⁾ では溶媒対照と比較して著名な復帰変異コロニー数の増加が認められ、また、2-AA⁴⁾ は S-9 mix を加えることにより代謝活性化され、試験に用いたすべての株に著明な復帰変異を誘起した。

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は有しないものと判断される

- 1): 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
- 2): N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
- 3): 9-Aminoacridine
- 4): 2-Aminoanthracene

表 1. 復帰変異試験成績 (第 1 回目) (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
対照 (DMSO)		—	121	8	19	30	5
検体	312.5	—	114	7	16	28	6
	625	—	140	8	11	36	9
	1250	—	127	7	14	34	5
	2500	—	126	5	16	27	5
	5000	—	127	5	15	24	5
対照 (DMSO)		+	129	7	13	33	11
検体	312.5	+	117	6	14	31	7
	625	+	108	8	12	31	6
	1250	+	107	6	14	37	12
	2500	+	99	6	13	35	9
	5000	+	92	5	17	29	7
陽性 対照	AF-2 ¹⁾	0.01	—	514			
	ENNG ²⁾	5.0	—		48		
	AF-2 ¹⁾	0.04	—			467	
	AF-2 ¹⁾	0.1	—				371
	9-AA ³⁾	80.0	—				3853
	2-AA ⁴⁾	1.0	+	495			
	2-AA ⁴⁾	2.0	+		221		83
	2-AA ⁴⁾	20.0	+			395	
2-AA ⁴⁾	0.5	+				237	

陽性対照物質は全て DMSO に溶解した。

- 1): 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
- 2): N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
- 3): 9-Aminoacridine
- 4): 2-Aminoanthracene

表2. 復帰変異試験成績 (第2回目)

(表中の数値は3反復の平均値)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
対照 (DMSO)		—	94	8	11	27	5
検体	312.5	—	90	6	12	24	8
	625	—	102	6	9	26	6
	1250	—	101	8	13	34	4
	2500	—	101	9	9	27	6
	5000	—	95	8	10	21	6
対照 (DMSO)		+	95	5	13	30	11
検体	312.5	+	105	6	13	37	5
	625	+	102	7	12	36	7
	1250	+	99	8	16	33	8
	2500	+	112	7	11	36	8
	5000	+	98	5	12	31	7
陽性 対照	AF-2 ¹⁾	0.01	—	475			
	ENNG ²⁾	5.0	—		47		
	AF-2 ¹⁾	0.04	—			608	
	AF-2 ¹⁾	0.1	—				433
	9-AA ³⁾	80.0	—				3692
	2-AA ⁴⁾	1.0	+	536			
	2-AA ⁴⁾	2.0	+		169		89
	2-AA ⁴⁾	20.0	+			562	
2-AA ⁴⁾	0.5	+				202	

陽性対照物質は全て DMSO に溶解した。

- 1): 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
- 2): N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
- 3): 9-Aminoacridine
- 4): 2-Aminoanthracene

イミダクロプリドの細菌を用いた復帰突然変異試験

(毒性資料 No. 原体-33)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 1989年1月6日

検体の純度：

試験方法：プレートインコーポレーション法

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) の4株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 mix) の非存在下及び存在下で Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、1回目は 20~12500 μ g/プレートの範囲の5濃度で、2回目は 775~12400 μ g/プレートの5濃度で実施した。陽性対照物質も DMSO で調製した。

試験は4反復とし、再現性を見るために2回 (S-9 mix の存在下では3回) 行った。

結果及び考察：

表1、2に示したように、2回の試験共に検体を用いた全用量において代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数に溶媒対照の2倍以上で、かつ用量相関性を伴った増加は認められなかった。一方、6200 μ g/プレート以上の濃度において、極わずかに生育阻害が認められた。

一方、陽性対照として用いた S-9 mix 非存在下でのアジ化ナトリウム (NaN₃)、ニトロフラントイン (NF)、4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン (4-NPDA) では、溶媒対照と比較して明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、S-9 mix 存在下条件下での2-アミノアントラセン (2-AA) は、試験に用いたすべての菌株に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、検体は本試験条件下において、復帰変異誘発作用は有さないものと判断される。

表 1. 1 回目試験 (表中の数値は 4 反復の平均値)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート			
			塩基対置換型		フレームシフト型	
			TA1535	TA100'	TA1537	TA98
対照	0	—	14	107	8	17
検体	20	—	16	101	7	13
	100	—	19	122	11	17
	500	—	16	115	10	19
	2500	—	23	99	7	16
	12500	—	26	78	6	10
対照	0	+	14	113	12	32
検体	20	+	13	109	9	35
	100	+	15	128	10	26
	500	+	18	143	8	25
	2500	+	15	137	11	38
	12500	+	14	106	3	20
陽性 対照	NaN ₃	10	—	1068		
	NF	0.2	—	404		
	4-NPDA	10/0.5*	—		93	120
	2-AA	3	+	323	1249	99

*TA1537;10μg/プレート, TA98;0.5μg/プレート

陽性対照物質は全て DMSO に溶解した。

NaN₃ : アジ化ナトリウム

NF : ニトロフラントイン

4-NPDA : 4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン

2-AA : 2-アミノアントラセン

表 2. 2 回目試験 (表中の数値は 4 反復の平均値)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート			
			塩基対置換型		フレームシフト型	
			TA1535	TA100	TA1537	TA98
対照	0	—	18	103	9	24
検体	775	—	21	98	9	19
	1550	—	19	106	10	21
	3100	—	19	103	10	25
	6200	—	23	102	9	12
	12400	—	15	71	7	12
対照	0	+	17	124	11	29
検体	775	+	17	124	10	34
	1550	+	19	140	11	33
	3100	+	18	129	6	33
	6200	+	18	146	6	39
	12400	+	16	118	9	34
陽性対照	NaN ₃	10	—	963		
	NF	0.2	—		541	
	4-NPDA	10/0.5*	—			85 154
	2-AA	3	+	395	1417	128 1186

*TA1537; 10μg/プレート, TA98; 0.5μg/プレート

陽性対照物質は全て DMSO に溶解した。

NaN₃ : アジ化ナトリウム

NF : ニトロフラントイン

4-NPDA : 4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン

2-AA : 2-アミノアントラセン

表 3. 3 回目試験 (表中の数値は 4 反復の平均値)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9Mix の有無	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	TA1537	TA98
対照	0	+	14	134	9	30
検体	775	+	13	122	8	35
	1550	+	14	132	10	31
	3100	+	15	136	8	37
	6200	+	13	161	6	40
	12400	+	16	165	10	37
陽性対照 2-AA	3	+	312	2395	541	1918

2-AA : 2-アミノアントラセン

陽性対照物質は DMSO に溶解した。

イミダクロプリドの CHO 細胞-HGPRT 座を指標とした前進突然変異試験

(毒性資料 No. 原体-34)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1989年1月6日

検体の純度：

試験系：チャイニーズハムスター卵巣由来培養細胞 (CHO-K1-BH₄)

試験方法：

検体の 2000 μ g/mL まで (S-9 非存在下または S-9 存在下) の用量を用い、CHO 培養細胞の HGPRT 座における突然変異原性 (前進突然変異試験) を *in vitro* 条件下で評価した。検体および陽性対照物質のエチルメタンスルホネート (EMS; 非代謝活性化)、ジメチルベンゾアントラセン (DMBA; 代謝活性化) は全てジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させた。

コロニー形成率と突然変異試験

フラスコあたり 4×10^6 細胞の CHO 細胞を、各処理濃度あたり 2 個の 250mL のフラスコの培養用培地に入れた。接着後 (16~24 時間後) に、細胞を低血清量 (2%) の培地を用い、非代謝活性下及び代謝活性下条件で 5 時間各濃度の検体に暴露させた。各対照群は同じ条件下で培養した。その後、単層細胞を PBS で洗浄してトリプシン処理した。これをフラスコ中の培地に約 1.5×10^6 細胞の密度で、また 3 枚のペトリ皿それぞれに 200 個の細胞を、再播種した。ペトリ皿で 7 日間培養し、コロニー数を算定することにより細胞毒性を判定した。

一方、フラスコに再播種した細胞は、細胞増殖と誘発変異株の発現のために培養し、3日と6日に継代した。最初の継代では、各処理群および対照群あたり各々2個の250mLのフラスコに、約 1.5×10^6 個の細胞を再播種し、6日間培養した。突然変異株細胞分離のために、 $10 \mu\text{g/mL}$ の6-チオグアニン(6-TG)を添加したヒポキサンチン無含有培養液のペトリ皿(合計8皿)に 2×10^5 個の細胞を播種した。さらに、3枚のペトリ皿には各用量群のコロニー形成率を求めるために、ペトリ皿あたり200個の細胞を播種した。約5%炭酸ガスを含んだ加湿された空気中で、 37°C で7日間の培養後、コロニーを固定してギムザ液で染色した。突然変異株分離用のペトリ皿では6-TG抵抗性コロニー数を、コロニー形成率測定用ペトリ皿ではコロニー数を測定した。ただし、50個以下の細胞から形成されるのコロニーは除外した。

結果及び考察

1. S-9 mix 非存在下条件における突然変異原性試験

非活性化条件下で5試験を実施した。最初の2回の試験の $20 \mu\text{g/mL}$ までの濃度において検体は設定濃度範囲で細胞毒性を示さなかった。このため、その結果は評価から除外した。3回目の試験は $90 \mu\text{g/mL}$ までの濃度を、また4、5回目の試験は $125 \mu\text{g/mL}$ までの濃度を採用した。その結果、用量に相関した細胞毒性が認められた。なお、3回目の試験においては溶媒対照群の自然発生性変異株数が背景データを上回って観察された。このため、この試験結果も評価の対象から除外した。残りの2回の試験の総合的な統計学的解析において、処理した濃度のいずれにも突然変異の頻度に有意な増加は認められなかった。なお、このうち1試験の $80 \mu\text{g/mL}$ において変異株数が統計学的有意に増加したが、用量相関性が無いことや再現性が無いことから、意味のある増加とは判断しなかった。表には評価可能とした試験4回目、5回目の2回のデータを示した。

陽性対照群のEMSは、すべての試験で明らかに変異原性を誘発した。従って、検体は非代謝活性化試験において非変異原性物質と判断された。

2. S-9 mix 存在下条件における突然変異原性試験

活性化条件下で $1222 \mu\text{g/mL}$ までの濃度を採用して2試験を実施した。両試験ともに相対生存率および相対増殖を指標とした用量相関的な細胞毒性が観察された。1回目の試験において、 407 及び $815 \mu\text{g/mL}$ の濃度で、突然変異の頻度に統計

学的に有意な増加がみられた。しかし、1222 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の変異数に変動の無いことや、併行した2回目の試験で再現性がなかったことから、これらの増加は検体投与に起因したものとは考えられなかった。従って、検体は代謝活性化条件において突然変異性を示さなかったと結論した。

陽性対照物質のDMBAは、すべての試験で明らかに変異原性を誘発した。

以上の結果より、本検体は代謝活性化の有無にかかわらず、CHO-HPRT 前進突然変異原性試験において非変異原性物質であると判断された。

S-9 mix 非存在下

群	濃度 μg/mL	試験 1 (4 回目のデータ)					試験 2 (5 回目のデータ)				
		生存 細胞 数	相対 増殖 ^A	総 変 異 株 数 ^B	コロニー形 成率 ^C	変異率 ×10 ⁻⁶	生存 細胞 数	相対 増殖 ^A	総 変 異 株 数 ^B	コロニー形 成率 ^C	変異率 ×10 ⁻⁶
陰性対 照	無処理	102	95.6	1	93.8	0.7	91	98.4	19	80.8	14.7
		±3	93.1	1	99.3	0.6	±12	94.9	21	98.2	13.4
溶媒対 照	DMSO	102	100.0	2	100.2	1.4	82	100.0	31	71.3	27.2
		±4	100.0	5	96.3	3.2	±4	100.0	23	89.0	16.2
陽性対 照 EMS	900	39	41.7	195	63.3	192.5*	44	33.1	439	47.0	583.8*
		±1	35.9	280	80.5	217.4*	±4	45.1	343	42.8	500.9*
検体	60.0	86	69.1	1	102.5	0.6	90	87.8	19	85.3	13.9
		±20	84.8	1	91.7	0.7	±9	138.8	14	74.5	11.7
	70.0	100	94.0	6	91.0	4.1	83	84.1	13	79.7	10.2
		±0	85.8	2	99.8	1.3	±10	91.5	34	84.8	25.1
	80.0	71	74.3	4	94.8	2.6	65	70.9	42	80.3	32.7
		±3	97.0	1	91.8	0.7	±13	103.3	45	78.2	36.0*
	90.0	72	73.2	1	98.3	0.6	57	73.3	27	82.0	20.6
±10		70.4	1	90.3	0.7	±7	128.9	12	73.2	10.2	
100.0	50	73.4	1	95.3	0.7	52	79.3	23	79.0	18.2	
	±3	98.0	1	88.5	0.8	±10	112.2	26	77.0	21.1	
125.0	37	89.8	1	99.7	0.6	23	83.2	36	75.2	29.9	
	±2	58.5	1	95.8	0.7	±11	111.5	21	69.3	18.9	

*: P<0.05 (POISSON heterogeneity test)

A: 溶媒対照に対する百分率 B: 8 ペトリ皿のコロニーの合計 C: 細胞 200 個あたりのコロニー形成率

EMS : エチルメタンサルホネート (DMSO に溶解)

S-9 mix 存在下

群	濃度 μg/mL	試験 1					試験 2				
		生存 細胞 数	相対 増殖 ^A	総変 異株 数 ^B	コロニー形 成率 ^C	変異率 ×10 ⁻⁶	生存 細胞 数	相対 増殖 ^A	総変 異株 数 ^B	コロニー形 成率 ^C	変異率 ×10 ⁻⁶
陰性対 照	無処理	105 ±13	70.7 128.3	8 2	96.0 89.7	5.2 1.4	104 ±3	101.0 119.3	1 6	86.8 94.7	0.7 4.0
溶媒対 照	DMSO	105 ±1	100.0 100.0	1 3	75.5 97.5	0.8 1.9	106 ±22	100.0 100.0	1 7	82.2 95.5	0.9 4.6
陽性対 照 DMBA	20	53 ±6	71.3 70.3	93 93	69.7 79.8	83.4* 72.8*	68 ±14	67.5 74.8	128 102	79.8 78.0	100.3* 81.7*
検体 [#]	102.0	91	82.3	10	85.0	8.4	79	127.8	3	80.0	2.3
	100.0	±15	109.1	2	92.0	1.4	±9	138.6	4	84.2	3.0
	204.0	79	84.2	10	88.5	7.1	81	87.7	1	81.2	0.8
	119.0	±14	112.8	12	89.5	8.4	±2	100.7	2	80.8	1.5
	407.0	64	83.8	7	100.3	4.4	87	108.9	6	77.0	4.9
	399.0	±15	98.6	13	86.2	9.4*	±15	115.9	1	80.5	0.8
	815.0	66	76.2	8	103.0	4.9	34	42.4	1	94.8	0.7
	798.0	±9	92.1	16	92.7	12.3*	±10	79.5	1	71.3	0.9
	1222.0	40	59.7	15	115.7	8.1	4	3.4	1	65.5	1.0
	1196.0	±6	118.3	3	89.2	2.1	±3	4.4	4	64.3	3.9

*: P<0.05 (POISSON heterogeneity test)

A: 溶媒対照に対する百分率 B: 8 ペトリ皿のコロニーの合計 C: 細胞 200 個あたりのコロニー形成率

DMSA : ジメチルベンゾアントラセン (DMSO に溶解)

#: 上段/試験 1 の濃度, 下段/試験 2 の濃度

イミダクロプリドのラット初代肝培養細胞を用いた in vitro 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験

(毒性資料 No. 原体-35)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1988年12月21日

検体の純度：

試験方法

ラットの初代肝培養細胞を用い、in vitro 系において検体あるいはその代謝物の DNA に及ぼす影響を、UDS を指標として評価した。これは、核内の粒子数を計測し、DNA に対する障害の存在とその程度を推定することによった。750 μ g/mL \sim 5 μ g/mL の用量において UDS を評価した。

1. 供試液の調製

検体及び陽性対照の 2-アセチルアミノフルオレン (2-AAF) はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。

2. 肝細胞の単離

無処理の SD 系ラット雄 2 例をネンブター麻酔下でコラゲナーゼ液を用いて生体位灌流し、肝を摘出してから肝細胞を単離調製した。

3. 用量設定

用量設定は 15 用量で実施した。

20 \sim 24 時間後にトリパンブルー色素を排除した細胞数を生存細胞数とした。最高用量は形態学的に正常な細胞の十分な数が得られる用量とした。

4. UDS 検査用標本の作製と観察

単離した肝細胞は、牛胎児血清を添加した Williams E 培養液 (WME) で培養した。まず、単層細胞を得るために、培養皿に 0.5×10^6 個の肝細胞を加え、1.5 \sim 2 時間 5% 炭酸ガス下の加湿された空気中で 37 $^{\circ}$ C で培養した。その後 WME での洗浄により未接着の細胞を除去した。単層細胞を得てから、所定の検体液とともに牛胎児血清と 5 μ Ci/mL の 3 H-チミジンを含む培養液で 18 \sim 19 時間培養した。実験は各ラットごとに各用量 5 回実施し、そのうち 2 回は細胞毒性の評価に用いた。培養後、培養皿を WME で 2 回洗い、さらに 20 \sim 24 時間培養し、トリパンブルー色素を排除した細胞数を鑑定した。一方、UDS 試験では培養後チミジン含有 WME で 2 回洗い、さらに 20 \sim 24 時間培養した後、1%クエン酸ナトリウムでの核の膨化处理に続いて、氷酢酸と純エタノール混液 (1 : 3)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

での細胞の固定を行い、水洗後に24時間以上風乾した。オートラジオグラフィー処理のために、スライドガラスの NTB-2 写真用乳剤での処理を行い、暗箱中において4°Cで7~10日間の保持後に定着固定した。さらに、スライドガラスをヘマトキシリンエオシンで染色した。各動物、各濃度あたり3枚のスライドガラスを作製し、各スライドガラスごとに25細胞を観察した。従って、各濃度あたり150細胞を評価した。³H-チミジンの取り込みを反映する細胞中の粒子を、ZEISS顕微鏡に接続したTVカラーモニターを用いて計測した。

結果：

5回の実験のうち、3試験は技術的な理由から評価に供しなかった。

1. 細胞毒性

2試験の生存率は以下の表に示した。表に示す様に、良好な生存率と正常な形態の細胞が得られた。

	試験 1		試験 2	
	動物番号 1	動物番号 2	動物番号 1	動物番号 2
生存率(トリパンプルーを排除した細胞)	88.3	87.8	91.8	90.4
接着率(播種数に対する接着数)	98.6	78.5	86.2	81.4
処理時生存率(検体処理時の生存率)	94.0	93.6	94.5	93.6
培養後生存率(処理時に対する生存率)*	94.0	105.0	95.6	105.5

*：溶媒対照を基にした数値

2. UDS

本試験(実験2回)で得られた、補正した核粒子数、6個以上及び10個以上の粒子を有する核数、生存率の要約を次の表に示した。

2試験においてラットの初代肝細胞を検体の約3000µg/mLから0.500µg/mLに曝露させた。このうち750µg/mLから5µg/mLの用量においてUDSを評価した。1000µg/mL以上の濃度の検体は培養液に溶解しなかった。UDSを評価した用量範囲において良好な細胞毒性が認められた(生存率：68.7~118.5%)。曝露によってUDSを示唆する兆候は認められず、用量相関性のある結果も得られなかった。

従って、検体はラット初代肝培養細胞において、DNA修復合成を誘発しなかったものと評価した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

実験 1—動物番号 1

試験群	核当たりの 補正粒子数*	6 個以上の粒子 を有する核数	10 個以上の粒子を有 する核数	生存率(%) **
溶媒対照群 (DMSO: 1%)	-0.73	1.3	0.0	100.0
陽性対照群 2-AAF: 0.1µg/mL	13.65	92.0	13.3	101.4
検体 500µg/mL	-0.69	0.0	0.0	87.0
250	0.12	4.0	0.0	103.1
100	-0.89	1.3	0.0	101.8
50.0	-0.76	2.7	0.0	118.5
25.0	-0.37	2.7	0.0	107.5
10.0	-1.08	0.0	0.0	ND

実験 1—動物番号 2

試験群	核当たりの 補正粒子数*	6 個以上の粒子 を有する核数	10 個以上の粒子を有 する核数	生存率(%) **
溶媒対照群 (DMSO: 1%)	-0.89	5.3	0.0	100.0
陽性対照群 2-AAF: 0.1µg/mL	24.47	100.0	65.3	96.1
検体 500µg/mL	0.37	8.0	0.0	68.7
250	-1.05	5.3	0.0	95.1
100	-1.23	1.3	0.0	95.4
50.0	-0.31	1.3	0.0	99.1
25.0	-1.43	2.7	0.0	98.1
10.0	ND			ND
5.0	0.25	0.0	0.0	ND

*: 3 培養の平均値、**: 溶媒対照に比した一定面積中の生存細胞数

DMSO: ジメチルスルホキシド, 2-AAF: 2-アセチルアミノフルオレン

ND: 算定できず

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

実験 2—動物番号 1

試験群	核当たりの 補正粒子数*	6 個以上の粒子 を有する核数	10 個以上の粒子を有 する核数	生存率(%) **
溶媒対照群 (DMSO: 1%)	0.55	8.0	0.0	100.0
陽性対照群 2-AAF: 0.1µg/mL	18.79	97.3	41.3	84.6
検体 750µg/mL	1.61	14.7	0.0	84.0
500	-0.11	1.3	0.0	88.0
375	-0.23	1.3	0.0	91.8
250	-0.45	4.0	0.0	94.9
100	-0.35	5.3	0.0	100.0
50.0	0.49	1.3	0.0	106.0

実験 2—動物番号 2

試験群	核当たりの 補正粒子数*	6 個以上の粒子 を有する核数	10 個以上の粒子を有 する核数	生存率(%) **
溶媒対照群 (DMSO: 1%)	-1.61	5.3	0.0	100.0
陽性対照群 2-AAF: 0.1µg/mL	23.35	100.0	65.3	102.2
検体 750µg/mL	-0.01	0.0	0.0	71.1
500	0.91	6.7	0.0	92.5
375	-1.27	2.7	0.0	89.7
250	-1.15	2.7	0.0	93.9
100	-1.40	0.0	0.0	102.9
50	0.84	9.3	0.0	109.4

* : 3 培養の平均値、** : 溶媒対照に比した一定面積中の生存細胞数
DMSO : ジメチルスルホキシド, 2-AAF : 2-アセチルアミノフルオレン

イミダクロプリドの染色体異常誘発作用を評価するためのヒトのリンパ球の培養における in vitro 細胞遺伝学的試験

(毒性資料 No. 原体-36)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1989年6月16日

検体の純度：
供試生物：健康人の血液のリンパ球
試験期間：72時間 リンパ球培養
試験方法：

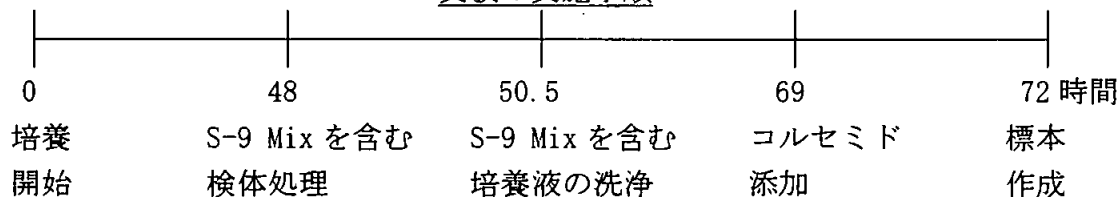
・検体の調製

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。陽性対照のマイトマイシン C (MMC) 及びシクロホスファミド (CYCL) はハンクス液に溶解した。

・染色体異常試験

健康人の血液 10mL 当り 0.5mL の抗凝血剤 Liquemin (Roche) を混合し、注射器でそのうち 2mL を吸い上げた。0.6mL まで沈降した透明層を捨て、次の層 0.2mL を含む残部を 9mL 染色体培地 B (Seromed) の入っている培養フラスコに移し 37°C で培養した。培養開始 48 時間後に検体を代謝活性化のための S-9Mix 存在下と非存在下で第一回目試験では 50、500 及び 5000 μ g/mL、第二回目試験では 1300、2600 及び 5200 μ g/mL の濃度になるように培養液に加えた。陰性対照群は DMSO のみを加えた。陽性対照群は S-9 mix 非存在下では MMC を、S-9 mix 存在下では CYCL を各々 0.15 及び 15 μ g/mL の濃度になるよう添加した後、試験は下記手順のように処理を行い各培養液毎に 2~3 枚の標本を作製した。

実験の実施手順



染色体異常の評価は各濃度毎に約 200 個の中期細胞の染色体を観察した。染色体の分類はギャップ、切断、断片、欠失、交換、重複異常とした。

試験結果：

1) 分裂頻度 (表 1)

検体は S-9 mix 非存在下の 500 μ g/mL 以上の濃度で分裂頻度の減少させ、有意な細胞毒性を示した。MMC は第 2 回目の試験でのみ、陰性対照に比べて軽度の分裂頻度の減少を認められた。

S-9 mix 存在下では、陰性対照に比べ 1300 μ g/mL 以上で分裂頻度が減少した。CYCL は分裂頻度を減少させなかった。

表 1. 分裂頻度

1 回目	S-9 mix 非存在下				S-9 mix 存在下			
	濃度 μ g/mL	検査した核数	有糸分裂 絶対数	対照に対する割合 (%)	濃度 μ g/mL	検査した核数	有糸分裂 絶対数	対照に対する割合 (%)
陰性対照	0	4000	89	100.0	0	4000	50	100.0
検体	50	4000	96	107.9	50	4000	84	168.0
	500	4000	57*	64.0	500	4000	112	224.0
	5000	4000	31*	34.8	5000	4000	78	156.0
陽性対照	0.15	4000	76	85.4	15	4000	62	124.0
2 回目	S-9 mix 非存在下				S-9 mix 存在下			
	濃度 μ g/mL	検査した核数	有糸分裂 絶対数	対照に対する割合 (%)	濃度 μ g/mL	検査した核数	有糸分裂 絶対数	対照に対する割合 (%)
陰性対照	0	4000	145	100.0	0	4000	245	100.0
検体	1300	4000	60*	41.4	1300	4000	196*	80
	2600	4000	18*	12.4	2600	4000	92*	37.6
	5200	4000	41*	28.3	5200	4000	160*	65.3
陽性対照	0.15	4000	93*	64.1	15	4000	211	86.1

陰性対照：DMSO

陽性対照群：S-9 mix 非存在下は MMC、存在下は CYCL

* : $p < 0.01$ (X^2 検定)

2) 染色体の評価 (表 2)

S-9 mix 非存在下

表 2 に示したように、検体の 50 μ g/mL の濃度では染色体異常の出現頻度の増加は見られなかった。500 μ g/mL 以上の濃度では染色体異常を示す細胞の数の増加がみられたが、これらは細胞毒性を示す濃度範囲に限られていた。

陽性対照 MMC は染色体異常を示す細胞に明らかで統計学的に有意な増加が認められた。

S-9 mix 存在下

第 1 回目の試験では 5000 μ g/mL の濃度まで、検体による異常数の増加はなかった。一方、第 2 回目の試験では、ギャップを含めない場合の異常を有する中期細胞が

2600 μ g/mL 以上で軽度ながら統計学的に有意な増加を示した。この増加は、第一回目の陰性対照群と比較して明らかな差ではないことから、本試験系の生物学的変動範囲内にあると判断されるが、弱い染色体異常誘発作用がある可能性も無視することはできなかった。

陽性対照の CYCL は異常割合に明らかで統計学的に有意な増加が認められた。

表 2. 染色体異常細胞数

第 1 回目	濃度 μ g/mL	S-9 mix の有無	評 価 細 胞 数	ギャップを含 む異常細胞数		ギャップを含 まない異常細 胞数		交 換		倍数体	
				n	%	n	%	n	%	n	X ¹⁾
DMSO	0	—	200	15	7.5	6	3.0	0	0	0 400	0
検体	50	—	200	20	10.0	2	1.0	1	0.5	0 400	0
	500	—	200	28*	14.0	8	4.0	0	0	2 400	0.5
	5000	—	100	29**	29.0	14**	14.0	1	1.0	2 300	0.7
MMC	0.15	—	200	111**	55.5	58**	29.0	16**	8.0	0 400	0
DMSO	0	+	200	26	13.0	3	1.5	0	0	1 400	0.3
検体	50	+	200	21	10.5	9	4.5	0	0	0 400	0
	500	+	200	10	5.0	2	1.0	0	0	3 400	0.8
	5000	+	200	12	6.0	3	1.5	0	0	1 400	0.3
CYCL	0.15	+	199	104**	52.3	71**	35.7	16**	8.0	1 400	0.3
第 2 回目	濃度 μ g/mL	S-9 mix の有無	評 価 細 胞 数	ギャップを含 む異常細胞数		ギャップを含 まない異常細 胞数		交 換		倍数体	
				n	%	n	%	n	%	n	X ¹⁾
DMSO	0	—	200	10	5.0	4	2.0	0	0	0 400	0
検体	1300	—	200	43**	21.5	20**	10.0	0	0	0 400	0
	2600	—	100	54**	54.0	28**	28.0	3	3.0	2 200	1.0
	5200	—	200	30**	15.0	12*	6.0	1	0.5	0 400	0
MMC	0.15	—	200	71**	35.5	51**	25.5	16**	8.0	0 400	0
DMSO	0	+	200	8	4.0	0	0	0	0	0 400	0
検体	1300	+	199	17*	8.5	4	2.0	1	0.5	0 400	0
	2600	+	200	15	7.5	5*	2.5	0	0	1 400	0.3
	5200	+	200	15	7.5	6*	3.0	0	0	0 400	0
CYCL	0.15	+	200	58**	29.0	42**	21.0	11**	5.5	0 400	0

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ (X^2 検定) ¹⁾ : 検査した細胞数

以上の結果から、検体は、S-9 mix 非存在下では細胞毒性を示す濃度で染色体異常誘発作用を示した。S-9mix 存在下では生物学的変動範囲内と考えられたものの、弱い染色体異常誘発作用を否定することができなかった。

50 μ g/mL では何らの影響も認められなかった。

イミダクロプリドのチャイニーズハムスターの卵巢由来培養細胞 (CHO) を用いた
in vitro 姉妹染色分体交換試験

(毒性資料 No. 原体-37)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1988年5月10日

検体の純度：

試験系：チャイニーズハムスター卵巢由来培養細胞 (CHO-WB1)

試験方法：

検体をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで (S-9 非存在下または S-9 存在下) の用量を用い、チャイニーズハムスター卵巢由来培養細胞 (CHO) の染色体異常を in vitro 条件下において姉妹染色分体交換系で評価した。

検体の濃度として、S9 mix 非存在下では 16.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 4 濃度と 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 1.0 mg/mL の 4 濃度、S9 mix 存在下では 166.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 5.0 mg/mL の 4 濃度と 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 3.0 mg/mL の 4 濃度を SCE (姉妹染色分体交換) の評価に供した。その他、陰性対照群 (無処理) 1 群、溶媒対照群 1 群、陽性対照群としてマイトマイシン C (MMC: 5.0 ng/mL ; 非代謝活性化) とシクロホスファミド (CYCL: 1.5 または 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 代謝活性化) のそれぞれ 1 群を設定した。

操作

非代謝活性化

フラスコあたり $1.0 \sim 1.1 \times 10^6$ 個の CHO 由来細胞を牛胎児血清を加えた McCony 5a 培養液で 24 時間培養した。24 時間後に所定量の検体を入れ、さらに 2.5 時間後に 2-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU : 最終濃度 $10 \mu\text{M}$) を添加し、23.75~23.9 時間培養した。回収の 2.7~3.0 時間前に培養液を生理食塩水で洗浄し、コルセミド ($2 \times 10^{-7}\text{M}$) と BrdU (最終濃度 $10 \mu\text{M}$) を含む新鮮な培養液を加え培養を継続した後、分裂中期細胞を回収した (培養液はフラスコに戻し、再検査のためさらに 17 時間培養した)。その後、細胞を 0.075M の KCl 低張液で処理し、メタノール・氷酢酸 (3 : 1) 混合液で固定し、スライドグラス上に滴下し、風乾した。

代謝活性化

フラスコあたり $1.0 \sim 1.1 \times 10^6$ 細胞の CHO 由来細胞を牛胎児血清を加えた McCony 5a 培養液で 24 時間培養した。その後、所定濃度の検体と S-9Mix を含む培養液 (牛胎児血清を含まない) で 2 時間、 37°C で培養した。その後、細胞を牛胎児血清を含む緩衝生理食塩水で洗浄し、2-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU : 最終濃度 $10 \mu\text{M}$) を含む培養液を添加した。さらに 23.6~23.9 時間培養した。回収の 2.6~2.75 時間前に培養液を生理食塩水で洗浄し、コルセミド ($2 \times 10^{-7}\text{M}$) を含む新鮮な培養液を加え培養を継続した後、分裂中期細胞を回収した (培養液はフラスコに戻し、再検査のためさらに 17 時間培養した)。その後、細胞を 0.075M の KCl 低張液で処理し、メタノール・氷酢酸 (3 : 1) 混合液で固定し、スライドグラス上に滴下し、風乾した。

SCE の分染と観察

スライドグラスにヘキスト 33258 (緩衝液中に $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) を滴下し、15 分間染色し、さらにギムザ染色し、風乾した。SCE の観察は顕微鏡下で行なった。

結果及び考察

1. 非代謝活性化条件における SCE

非活性化条件下で 16.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 4 濃度と 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 1.0 mg/mL の 4 濃度の 2 試験を実施した。

1 回の試験においては、最高用量の 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で SCE の統計学的有意な増加が認められた。一方、2 回目の試験では 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の 3 用量において SCE は統計学的有意に、また用量相関的に増加した。

陽性対照群の MMC は、両試験で明らかに変異原性を誘発した。

2. 代謝活性化条件における SCE

代謝活性化条件下では 166.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 5.0 mg/mL の 4 濃度と 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 3.0 mg/mL の 4 濃度の 2 試験を実施した。

1 回目の試験では全ての用量において SCE は増加しなかった。一方 2 回目の試験では、2 高用量 (2.0 と 3.0 mg/mL) において SCE が統計学的有意に増加した。

陽性対照物質の CYCL は、両試験で明らかに変異原性を誘発した。

以上の結果に基づき、本検体は S-9Mix 存在下あるいは非存在下にかかわらず、チヤイニーズハムスター卵巣由来細胞を用いた姉妹染色分体交換試験系において陽性であるものと結論した。

非代謝活性化 (1回目)

用量	検査細胞数	染色体数	総 SCE 数	SCE/染色体	SCE/2 倍体	溶媒対照に対する増加率 (%)
無処理対照	50	1041	436	0.42	8.72 ± 0.448	
溶媒対照 (DMSO)	50	1039	485	0.47	9.70 ± 0.451	
陽性対照 (MMC)	50	1035	1335	1.29	26.70* ± 0.916	175
検体 16.7 µg/mL	50	1033	456	0.44	9.12 ± 0.398	
50.0	50	1037	524	0.50	10.48 ± 0.504	8
166.7	50	1034	535	0.52	10.70 ± 0.543	10
500.0	50	1039	757	0.72	15.14* ± 0.737	56

*: P. < 0.05 (Student t-test)

MMC: 5.0 ng/mL

非代謝活性化 (2回目)

用量	検査細胞数	染色体数	総 SCE 数	SCE/染色体	SCE/2 倍体	溶媒対照に対する増加率 (%)
無処理対照	50	1039	334	0.32	6.68 ± 0.465	
溶媒対照 (DMSO)	50	1039	356	0.34	7.12 ± 0.370	
陽性対照 (MMC)	50	1041	1289	1.24	25.78* ± 0.816	262
検体 100 µg/mL	50	1036	370	0.36	7.40 ± 0.308	4
250	50	1027	513	0.50	10.26* ± 0.405	44
500	50	1028	556	0.55	11.12* ± 0.419	56
1000	50	1032	679	0.68	13.94* ± 0.728	96

*: P. < 0.05 (Student t-test)

MMC: 5.0 ng/mL

代謝活性化 (1回目)

用量	検査細胞数	染色体数	総 SCE 数	SCE/染色体	SCE/2 倍体	溶媒対照に対する増加率 (%)
無処理対照	50	1042	456	0.44	9.12 ± 0.441	
溶媒対照 (DMSO)	50	1040	530	0.51	10.60 ± 0.524	
陽性対照 (CYCL)	50	1031	2523	2.45	50.46* ± 1.123	376
検体 166.7 µg/mL	50	1041	454	0.44	9.08 ± 0.368	
500.0	50	1038	470	0.45	9.40 ± 0.464	
1700.0	50	1038	505	0.49	10.10 ± 0.474	
5000.0	50	1041	544	0.52	10.88 ± 0.512	3

*: P. < 0.05 (Student t-test)

CYCL: 1.5 µg/mL

代謝活性化 (2回目)

用量	検査細胞数	染色体数	総 SCE 数	SCE/染色体	SCE/2 倍体	溶媒対照に対する増加率 (%)
無処理対照	50	1035	356	0.34	7.12 ± 0.342	
溶媒対照 (DMSO)	50	1037	365	0.35	7.30 ± 0.396	
陽性対照 (CYCL) [#]	25	521	1338	2.57	53.52* ± 1.846	633
陽性対照 (CYCL) ^{##}	25	521	1689	3.24	67.56* ± 2.844	825
検体 500 µg/mL	50	1041	360	0.35	7.20 ± 0.415	
1000	50	1048	394	0.38	7.88 ± 0.425	8
2000	50	1045	466	0.45	9.32* ± 0.458	28
3000	50	1040	619	0.60	12.38* ± 0.602	70

*: P. < 0.05 (Student t-test)

CYCL:[#]-1.5 µg/mL, ^{##}-2.0 µg/mL

イミダクロプリドのチャイニーズハムスターの卵巣由来培養細胞を用いた
in vitro 姉妹染色分体交換試験

(毒性資料 No. 原体-38)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1989年9月12日

検体の純度：

試験系：チャイニーズハムスター卵巣由来培養細胞 (CHO-CCL 61)。

試験方法：

検体の 400 μ g/mL まで (S-9 mix 非存在下) または 1250 μ g/mL まで (S-9mix 存在下) の用量を用い、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 由来培養細胞の染色体異常を in vitro 条件下において姉妹染色分体交換系で評価した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、陽性対照物質であるトリエチレンメラミン (TEM ; 非代謝活性化) とシクロホスファミド (CYCL ; 代謝活性化) は蒸留水に溶解した。

検体の濃度として、S-9 mix 非存在下では 25、50、100、200 及び 400 μ g/mL、一方 S-9 mix 存在下では、157、313、625 及び 1250 μ g/mL を SCE の評価に供した。その他、陰性対照群 (無処理) 1 群、溶媒対照群 1 群 (DMSO)、陽性対照群として、TEM (0.025 μ g/mL) 群、CYCL (2.5 μ g/mL) 群それぞれ 1 群を設定した。

操作

非代謝活性化

培養は2反復で実施した。フラスコあたり 5×10^5 個の CHO 由来細胞を牛胎児血清を加えた McCony 5A 培養液で 16~24 時間培養した。その後、所定量の検体を入れ、さらに 2 時間後に 2-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU: 最終濃度 0.01mM) を添加し、29 時間培養した。回収の 2 時間前に培養液を牛胎児血清で洗浄し、コルセミド (0.1 μ g/mL) と BrdU (最終濃度 0.01mM) を含む新鮮な培養液を加え培養を継続した後、分裂中期細胞を回収した。その後、細胞を 0.075M の KCl 低張液で処理し、メタノール・氷酢酸 (3:1) 混合液で 1 晩固定し、スライドグラス上に滴下し、風乾した。

代謝活性化

培養は2反復で実施した。フラスコあたり 5×10^5 細胞の CHO 由来細胞を牛胎児血清を加えた McCony 5A 培養液で 16~24 時間培養した。その後、所定濃度の検体と S-9Mix を含む培養液 (牛胎児血清を含まない) で 2 時間、37°C で培養した。その後、細胞を牛胎児血清で洗浄し、2-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU: 最終濃度 0.01mM) を含む培養液を添加した。さらに 29 時間培養した。回収の 2 時間前に培養液を生理食塩水で洗浄し、コルセミド (0.1 μ g/mL) を加え培養を継続した後、分裂中期細胞を回収した。その後、細胞を 0.075M の KCl 低張液で処理し、メタノール・氷酢酸 (3:1) 混合液で 1 晩固定し、スライドグラス上に滴下し、風乾した。

SCE の分染と観察

スライドグラスにヘキスト 33258 (緩衝液中に 1.5 μ g/mL) を滴下し、15 分間染色し、さらにギムザ染色し、風乾した。SCE の観察は 2 回目について各培養あたり 25 の中期分裂細胞で顕微鏡下で行った。また、100 個の中期分裂細胞について分裂回数も評価した。

結果及び考察

1. S-9 mix 非存在下における SCE

非活性化条件下で 25、50、100、200 及び 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 5 濃度を試験した。

200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で SCE の統計学的有意な増加が認められた。しかしこの結果は陰性対照や溶媒対照で見られる SCE 数の範囲にあることや、用量相関性が無いことから、SCE 陰性と判断した。

陽性対照群の TEM は、明らかに陽性反応を示した。

2. S-9 mix 存在下における SCE

代謝活性化条件下では 157、313、625 及び 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 4 濃度を試験した。

全ての用量において SCE は統計学的有意に増加しなかった。

陽性対照物質の CYCL は、明らかな陽性反応を示した。

以上の結果に基づき、本検体は、S-9 mix の存在下あるいは非存在下にかかわらず、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞を用いた in vitro 姉妹染色分体交換試験系において陰性であるものと結論した。

S-9 mix 非存在下

用量	検査 細胞数	細胞分裂動態(%) [#]			SCE/染色体	SCE 平均値±SD
		M1	M2	M3		
無処理対照	25	3	97	0	0.55	11.24±3.58
	25	2	98	0	0.57	
溶媒対照	25	1	99	0	0.54	11.26±2.91
	25	2	98	0	0.59	
検体 50μg/mL	25	4	96	0	0.65	12.80±3.27
	25	5	95	0	0.63	
100	25	4	96	0	0.58	11.64±4.25
	25	1	99	0	0.59	
200	25	7	93	0	0.69	13.28±4.40*
	25	10	90	0	0.65	
400	25	73	27	0	0.61	12.21±3.08
	25	84	16	0	0.61	
陽性対照 (TEM)	25	5	95	0	2.69	54.10±8.67**
0.025μg/mL	25	1	99	0	2.70	

*: P. < 0.05, **: P. < 0.01 (Dunnett t-test あるいは Student t-test)

#: Cell Cycle Kinetics: 100 個の中期細胞中

S-9 mix 存在下

用量	検査 細胞数	細胞分裂動態(%) [#]			SCE/染色体	SCE 平均値±SD
		M1	M2	M3		
無処理対照	25	0	100	0	0.63	11.96±2.93
	25	0	100	0	0.57	
溶媒対照	25	0	100	0	0.54	11.82±3.28
	25	0	100	0	0.64	
検体 157μg/mL	25	0	100	0	0.52	11.06±3.56
	25	0	100	0	0.60	
313	25	0	100	0	0.61	11.30±3.18
	25	1	99	0	0.53	
625	25	1	99	0	0.61	11.92±3.74
	25	0	100	0	0.59	
1250	25	5	95	0	0.67	12.84±3.11
	25	2	98	0	0.62	
陽性対照 (CYCL)	25	0	100	0	1.61	32.20±6.97**
2.5μg/mL	25	0	100	0	1.64	

*: P. < 0.05, **: P. < 0.01 (Dunnett t-test あるいは Student t-test)

#: Cell Cycle Kinetics: 100 個の中期細胞中

イミダクロプリドの染色体異常誘発作用を評価するための
チャイニーズハムスターの骨髄細胞を用いた *in vivo* 細胞遺伝学的試験

(毒性資料 No. 原体-39)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1989年11月24日

検体の純度 :
供試動物 : チャイニーズハムスター, 1群雌雄各5匹
試験開始時; 体重 26~35g, 8~12週齢)
試験期間 : 48時間
試験方法 :

検体を 0.5%クレモホア溶液に懸濁し、チャイニーズハムスター1群雌雄各5匹に
検体 2000mg/kg を 10mL/kg 容量で強制経口投与した。

試験群は次に示すとおりで、検体 2000mg/kg を経口投与後、6、24、48 時間後に動物を屠殺し、摘出した大腿骨から骨髄塗沫標本を Boller と Schmid の方法で作成し、動物当たり 100 個の中期分裂像を染色体の構造異常 (ギャップ、切断、断片、欠失、交換、重複異常*、染色体破損) について検査した。

動物を屠殺する 2 時間前には 3.3mg/kg のコルセミドを全動物に腹腔内注射し有糸分裂を中期で停止させた。

*ギャップ以外の 4 個以上の異常を認めた場合を重複異常とする。

試験群	投与量 mg/kg	投与経路と屠殺時間
陰性対照	0	経口 24 時間後
検体	2000	経口 6 時間後
検体	2000	経口 24 時間後
検体	2000	経口 48 時間後
陽性対照 (シロホスファミド*)	30	経口 24 時間後

試験結果：

1) 一般症状

2000 を 1 回経口投与したとき、中毒症状は認められなかったが、34 匹の検体投与動物のうち 4 匹が急性毒性のため死亡した。

2) 染色体の評価

投与 6 時間後：

12 個のギャップと 2 個の切断の合計 14 個の異常が認められた。ギャップを含む構造異常は全中期細胞の中で 1.19%を示し、ギャップを除くと 0.20%であった。交換はなかった。陰性対照群との比較において有意差は認められなかった。

投与 24 時間後：

15 個のギャップと 6 個の切断と 4 個の断片の合計 25 個の異常が認められた。交換はなかった。ギャップを含めた構造異常は、全中期細胞の中で 2.19%を示した。又ギャップを除くと 0.8%であった。陰性対照群との比較において有意差は認められなかった。

投与 48 時間後：

9 個のギャップと 4 個の切断と 1 個の重複異常を有する中期細胞が認められ、異常総数は 18 個であった。交換はなかった。ギャップを含めた構造異常は、全中期細胞の中で 1.38%を示した。又ギャップを除くと 0.49%であった。陰性対照群との比較において有意差は認められなかった。

チャイニーズハムスターを用いた染色体異常試験の要約

試験群	評価した 中期細胞数	ギャップを含めた異常を持つ中期細胞		ギャップを除く異常を持つ中期細胞		交換を有する 中期細胞	
		n	%	n	%	n	%
陰性対照	1012	13	1.28	3	0.30	0	0
6 時間後	1009	12	1.19	2	0.20	0	0
24 時間後	1004	22	2.19	8	0.80	0	0
48 時間後	1013	14	1.38	5	0.49	0	0
陽性対照 [#]	1002	289*	28.84	260*	25.95	134*	13.37

* ; P<0.01 (X²テスト), # ; シクロホスファミド

以上のことから検体 2000mg/kg 群を陰性対照群と比較したとき、投与に起因する差は認められず、染色体異常誘発作用は認められなかった。一方、陽性対照のシクロホスファミドは 30mg/kg の経口投与で明らかな染色体異常誘発作用を示し、陰性対照群と比較した時、全ての項目が有意に増加した。

イミダクロプリドのチャイニーズハムスターの骨髓細胞を用いた姉妹染色分体交換試験 (in vivo)

(毒性資料 No. 原体-40)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年月日 : 1989年 6月 16日

検体の純度 :

供試動物 : チャイニーズハムスター, 1群雌雄各5匹
試験開始時 ; 体重 26~35g、8~12週齢)

試験期間 : 24時間

試験方法 :

検体を 0.5%クレモホア水溶液に懸濁し、500、1000 及び 2000mg/kg の用量で雌雄チャイニーズハムスターに経口投与した。また陰性対照群(0.5%クレモホア水溶液)1群、陽性対照群シクロホスファミド(CYCL:10mg/kg)1群を設定し経口投与した。CYCLは脱イオン水で調製した。投与容量はいずれも 10mL/kg とした。

骨髓細胞における染色体異常を in vivo 条件下において姉妹染色分体交換(SCE)系で評価した。

操作

1群雌雄各5例の雌雄チャイニーズハムスターに検体及び対照物質を所定量経口投与した。投与の2時間前に BrdU ペレット (約 50mg) を動物の頸背部に埋め込んだ。動物は 24 時間後に屠殺したが、屠殺前 2 時間にコルセミド (3.3mg/kg) を腹腔内投与した。屠殺後骨髓を取り出し、細胞成分を精製・固定 (エタノール・氷酢酸 (2.5 : 1) 混合液) し、スライド標本作製した。

SCE の分染と観察

スライドグラスにヘキスト 33258 で 10 分間染色し、さらにギムザ染色し、風乾した。SCE の観察は各個体あたり 50 の中期分裂細胞で顕微鏡下で行なった。また、各例 500 の細胞について細胞分裂を観察し、100 個の中期分裂細胞について分裂回数も評

価した。

結果及び考察

1. 動物に対する毒性

検体の 500、1000 及び 2000mg/kg を経口投与された動物に外観や行動の変化は認められなかった。摂餌行動にも異常はなく、死亡例も認められなかった。

2. 細胞毒性

2.1 細胞分裂指数

検体の 1000 及び 2000 mg/kg 群において細胞分裂が抑制された。

群	用量 mg/kg	観察核数	分裂核数	
			分裂核数	陰性対照に対する割合 (%)
陰性対照	0	5000	192	100.0
検体	500	5000	196	102.1
	1000	5000	160*	83.3
	2000	5000	160*	83.3
CYCL	10	5000	159*	82.8

*: P<0.05 (X² test)

2.1 細胞サイクル及び SCE

検体の 2000 mg/kg までの用量において細胞サイクル及び SCE に検体の影響は認められなかった。一方、陽性対照物質のシクロホスアミド(10mg/kg)では細胞サイクルの遅延と SCE の増加が認められた。

用量	中期細胞 (%)			SCE/ 分裂中期細胞 ^{&}
	第1回目	第2回目	第3回目	
無処理対照	13.0	86.1	0.9	2.01±0.57
検体 500mg/kg	13.1	85.7	1.2	2.17±0.40
1000	17.0*	82.0*	1.0	2.28±0.71
2000	14.9	84.1	1.0	2.41±0.45
CYCL	18.1*	80.7*	1.2	15.27 [#] ±2.27

*: P<0.05(chi² test)、#: P<0.01(Wilcoxon ranking test)

&: 平均±SD

以上の結果に基づき、本検体は、in vivo 条件下においてチャイニーズハムスターの骨髄細胞における染色体について姉妹染色分体交換を誘発しないものと結論した。

イミダクロプリドのマウス精祖細胞を用いた in vivo 染色体異常試験

(毒性資料 No. 原体-41)

試験機関：)

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 1990 年 5 月 22 日

検体の純度 :

試験系 : 雄 NMRI 系マウス (1 群 6 匹)、約 10 週齢 (体重約 30g)

試験期間 : 48 時間

試験方法

検体の 80mg/kg の用量を雄マウスに経口投与し、精祖細胞における染色体異常を in vivo 条件下において評価した。また、溶媒対照群 (0.5% クレモホア水溶液)、陽性対照群 ドキソブリシン (DOX: 生理食塩水に溶解; 10mg/kg 腹腔内投与) 1 群を設定した。

操作

1 群雌雄各 6 例の雄マウスに検体及び対照物質を投与した。屠殺の 4 時間前にコルセミド (4mg/kg) を腹腔内投与した。動物をスケジュールに従って頸部脱臼により屠殺し、精巣を摘出し、精細管を取り出し、コラゲナーゼを用いて細胞成分を分離した。細胞を 30 分間 37°C で培養し、さらに低張液で処理し 20 分間 37°C で培養した。その後、細胞成分を精製・固定 (エタノール・氷酢酸 (3:1) 混合液) し、スライド標本作製した。標本作製は、対照群: 24 時間後、陽性対照群: 24 時間後、検体投与群: 6、24、48 時間後とした。

染色体の分染と観察

スライドグラスをギムザ染色し、風乾した。染色体の観察は各動物あたり1枚のスライドについて顕微鏡下で行なった。各100の分裂中期細胞について染色体異常を観察し、500個の中期分裂細胞について分裂回数も評価した。スライドの観察は1群5例とし、残りのそれぞれ1例は予備とした。

結果及び考察

検体投与群において、染色体異常の頻度の増加は認められなかった。また、検体は細胞分裂指数にも作用を示さなかった。

群	用量 mg/kg	サンプリ ング時間	観察 細胞数	異常細胞数		分裂指数
				ギャップを含む	ギャップを含まない	
1 溶媒対照	0	24	500	0.2	0.2	3.50
2 陽性対照	10	24	500	8.6*	5.4*	3.26
3 検体	80	6	500	0.0	0.0	2.74
4 検体	80	24	500	0.4	0.0	3.78
5 検体	80	48	500	0.8	0.4	2.40

*: P<0.05、(Mann-Whitney test)

以上の結果に基づき、本検体は、in vivo 条件下のマウス精祖細胞において染色体異常を示さないものと結論した。

イミダクロプリドの突然変異誘発作用の評価のためのマウスを用いた小核試験
(毒性資料 No. 原体-42)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年月日 : 1988 年 6 月 27 日

検体の純度 :

試験動物 : NMRI 系マウス雌雄、1 群雌雄各 5 匹
(試験開始時 8~12 週齢、体重 28~41g)

試験期間 : 72 時間

試験方法 :

検体を 0.5%クレモホア溶液で懸濁し、1 群雌雄各 5 匹のマウスに対して 80mg/kg を 1 回経口投与し、24、48 及び 72 時間後に断頭により屠殺し、大腿骨の骨髓を摘出した。陰性対照は懸濁液のみを、陽性対照はシクロホスファミド(CYCL; 20mg/kg)を脱イオン水に懸濁して検体と同様に経口投与し 24 時間後に屠殺し、大腿骨の骨髓を摘出した。投与容量は、各群ともに 10mL/kg とした。

検査用の標本は Schmid の方法により作製し、光顕下で各種の赤血球数を算定した。

試験結果 :

1) 一般症状

80mg/kg を経口的に 1 回投与した時、動物は 6 時間後までに、無感覚、活動性低下、呼吸困難を示したが、その後は正常に回復し死亡例はなかった。

2) 突然変異誘発性 (表 1)

雌雄間に差は認められなかったので雌雄の結果をまとめて評価した。表に示すように、80mg/kg の検体を経口的に投与した群と陰性対照群との間に、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、統計学的に有意な変化はなかった。小核を有するこれらの細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.0/1000 ($1s=0.8$)、検体投与群では、24、48、72 時間後の屠殺でそれぞれ 1.0/1000 ($1s=1.2$)、0.9/1000 ($1s=0.9$) 及び 1.3/1000 ($1s=1.0$) であった。

陽性対照薬剤の CYCL の作用は、小核を有する多染性赤血球の著明な増加 (頻度

は 11.9/1000) を示すことによって確認された。小核を有する正染性赤血球は投与群と陽性対照群とも有意な増加を認めなかった。

3) 赤血球産生能 (表 1)

赤血球産生能の指標としての多染性赤血球の正染性赤血球に対する比率について、投与群と陽性対照群とも有意な増加は認められなかった。

以上の結果から、本検体には突然変異誘発作用も赤血球産生抑制作用もないものと判断された。

表 1. 小核試験結果

試験群	算定した 多染性 赤血球総数	1000 個の 多染性赤血球 あたりの 正染性赤血球数	小核を有する細胞数	
			1000 個の 正染性赤血球 あたり	1000 個の 多染性赤血球 あたり
陰性対照	10000	943±403	1.6±2.0	1.0±0.8
検体 24 時間屠殺	10000	649±226	1.7±1.3	1.0±1.2
検体 48 時間屠殺	10000	1066±414	2.6±2.2	0.9±0.9
検体 72 時間屠殺	10000	913±360	1.4±1.7	1.3±1.0
陽性対照 CYCL	10000	1000±455	1.4±1.3	11.9*±8.4

*: Wilcoxon の順位和検定で有意差 (p<0.01) あり。

(14) 生体機能への影響

イミダクロプリドにおける薬理試験

(毒性資料 No. 原体-43)

試験機関：

[非 GLP]

報告書作成年月日： 1991年2月10日

検体の純度： %

供試動物：雌雄マウス(ICR系)：雄 20.0～24.3g, 雌 18.5～21.7g,

雄ラット(SD系)：183g～384g,

雄ウサギ(日本白色種)：1.91g～2.18g

試験期間：1990年2月～1991年2月

試験方法：検体はジメチルスルホキシドに溶解させ、ポリエチレングリコール400を加えて混和調製した。投与方法は原則として経口投与とし、投与前は前夜より絶食させた。麻酔ウサギを用いた実験の呼吸、血圧、心拍の測定と腸管運動の記録は静脈内投与とした。検体の投与量は、各最少致死量を基準として公比約3で下に3～4濃度を設定した。

試験項目及び結果：

1. 中枢神経系に対する作用

1) マウスの一般行動

方法：1群雌雄各3匹からなるマウスに、検体の0、10、30および100mg/kgを経口投与した。検体投与前、投与後10、30分、1、3、6時間、1、2日にIrwinの多次元観察法に従い一般行動観察を行った。

結果：30および100mg/kg群では警戒性と運動性の低下、運動失調などが認められ、また投与後10分から6時間後まで散瞳傾向がみられた。しかし情緒性(気分)、中枢興奮、反射などの各項目には明らかな変化は観察されなかった。更に100mg/kg群では数例で投与10分後にヒョコ様啼声が一時的に聞かれ、投与3～6時間後に死亡例がみられた。10mg/kg群では影響はみられなかった。

2) ウサギの一般行動

方法：1群雄3匹からなるウサギに、検体の0、10、30および100mg/kgを経口投与した。検体投与前、投与後10、30分、1、3、6時間、1、2日にIrwinの多次元観察法に従い一般行動観察を行った。

結果：30および100mg/kg群では行動性の軽微な抑制傾向が、更に反射性の項目では動向反射の抑制がみられた。しかし、筋緊張や運動性に大きな変化はみられず、むしろ、呼吸数の増大や散瞳、頻脈などの自律神経症状が観察された。100mg/kg群では死亡例もみられた。10mg/kg群では影響はみられなかった。

3) ウサギの体温

方法：1 群雄 3 匹からなるウサギに、検体の 0、10、30 および 100mg/kg を経口投与した。検体投与前、投与後 10、30 分、1、3、6 時間、1、2 日にサーミスター型直腸体温計で直腸温を測定した。

結果：100mg/kg 群では投与後 3 時間に軽微な体温下降(-0.4℃)を示したが、投与前に比べ、0.5℃を越えるような変動は認められなかった。30mg/kg 以下の群では体温に影響は認められなかった。

2. 呼吸・循環器系に対する作用

1) 無麻酔ウサギの呼吸数・心拍数

方法：1 群雄 3 匹からなるウサギを用い、検体の 0、10、30 および 100mg/kg を経口投与した。検体投与前、投与後 10、30 分、1、3、6 時間、1、2 日に胸部の動きから呼吸数を、聴診にて心拍数を測定した(Irwin の方法による検査の時に実施)。

結果：呼吸数においては、30mg/kg 群では投与後 1 時間後に軽度な増加が認められたが、その後の観察時点では対照群との差は認められなかった。100mg/kg 群では 1 時間後に著明な増加がみられたが、3 時間後には逆に対照群に比べ減少した。6 時間以降には大きな変動はみられなかった。

表；呼吸数(回/分)

mg/kg	投与前	投与後						
		10 分	30 分	1 時間	3 時間	6 時間	1 日	2 日
0	100	140	103	127	107	110	113	113
10	107	127	120	127	107	117	110	120
30	107	137	147	153	103	97	123	120
100	110	123	217	233	83	110	100	105

心拍数においては 30 および 100mg/kg 群では投与後 30 分から明らかな増加がみられ、投与後 6 時間まで増加がみられた。投与翌日には対照群と差が認められなかった。

10mg/kg 群では、呼吸数、心拍数共に、対照群と同様の推移を示した。

表；心拍数(回/分) 10 秒計測し、6 倍した値

mg/kg	投与前	投与後						
		10 分	30 分	1 時間	3 時間	6 時間	1 日	2 日
0	200	253	227	247	227	243	237	227
10	200	233	237	240	237	240	227	227
30	193	247	247	267	277	283	240	243
100	177	253	267	283	277	300	240	220

2) 麻酔下ウサギの生体位呼吸・血圧・心拍の影響

方法：1 群雄 4~5 匹からなるウサギを用い、ウレタン麻酔下(皮下注射；1.5g/kg)

で胸部に呼吸ピックアップを取り付けて呼吸運動を、頸動脈に装着した圧トランスデューサーを介して血圧を、また四肢に電極を取り付け、第 I 誘導心電図をポリグラフに記録した。そして安定した状態を確認後、検体の 0、1、3、10 および 30mg/kg を静脈内投与し、以後連続して記録した。

結果：10mg/kg 以上で、呼吸の一過性の亢進、血圧の下降、心拍数の減少がみられたが程度はいずれも軽微なものであった。30mg/kg 群では呼吸の一過性の亢進後、抑制がみられ、呼吸停止から死亡する例がみられた。この呼吸の大きな変動に比し、一過性の血圧下降、心拍数の減少を示したものの、血圧や心拍数のこれらの変化は軽度にとどまっていた。3mg/kg 群では呼吸、血圧、心拍数に影響は認められなかった。

3. 自律神経系に及ぼす影響

1) ウサギの瞳孔径への作用

方法：1 群雄 3 匹からなるウサギを用い、検体の 0、10、30 および 100mg/kg を経口投与した。検体投与前、投与後 10、30 分、1、3、6 時間、1、2 日にノギスで瞳孔径を測定した。

結果：30 および 100mg/kg 群では散瞳傾向を示し、30mg/kg 群では投与 3 時間後に、100mg/kg 群では 30 分後に投与前に比し瞳孔径の増加がみられた。100mg/kg 群では投与後 1 日においてもなお散瞳傾向がみられた。10mg/kg では瞳孔径への影響は認められなかった。

瞳孔径 平均値 (mm)

mg/kg	投与前	投与後						
		10 分	30 分	1 時間	3 時間	6 時間	1 日	2 日
0	6.7	6.7 (0)	6.7 (0)	6.6 (-0.1)	6.5 (-0.2)	6.8 (0.1)	6.7 (0)	6.7 (0)
10	6.6	6.4 (-0.2)	6.6 (0)	6.6 (0)	6.6 (0)	6.6 (0)	6.5 (-0.1)	6.6 (0)
30	6.8	6.4 (-0.4)	6.8 (0)	6.9 (0.1)	7.5 (0.8)	7.3 (0.5)	6.8 (0)	6.8 (0)
100	6.6	6.6 (0)	7.1 (0.5)	7.2 (0.6)	7.5 (0.9)	7.5 (0.9)	7.0 (0.5)	6.8 (0.3)

() の数値は投与前の瞳孔径との差 (mm) の平均値

申請者注) 投与前の値と比べて、1mm 以内の差と極めて軽微であったこと、また、ウサギ催奇形性試験 (毒性資料 No. 原体-29) において、最高用量の 72mg/kg まで散瞳は認められていないことから、この薬理試験での変化は、有害作用とみなす必要はないものと考えた。

2) ラットの瞳孔径への作用

方法：1 群雄 5 匹からなるラットを用い、検体の 0、10、30 および 100mg/kg を経口投与した。検体投与前、投与後 10、30 分、1、3、6 時間、1、2 日にスケ

ール付きルーペで瞳孔径を測定した。

結果：100mg/kg 群では投与後 30 分から瞳孔径の増加がみられ、1 時間後をピークとし、6 時間後には投与前の瞳孔径まで回復していた。30 および 10mg/kg では瞳孔径への影響は認められなかった。

4. 体性神経系に及ぼす影響

1) ラットの坐骨神経刺激による腓腹筋収縮に対する作用

方法：1 群雄 3~4 匹からなるラットを用い、検体の 0、30、100 および 300mg/kg を経口投与直後にウレタンで麻酔(腹腔内注射；1g/kg)を施した。大腿部で坐骨神経を露出し、刺激電極を装着した。次に腓腹筋を半ばまで剥離し、その収縮を聴カトランスデューサーを介しポリグラフで記録した。

結果：各検体投与群で明らかな腓腹筋収縮に対する影響は認められなかった。

2) ラットの筋弛緩作用

方法：1 群雄 5 匹からなるラットを用い、検体の 0、30、100 および 300mg/kg を経口投与した。検体投与前、投与後 10、30 分、1、3、6 時間、1 日に傾斜板テストを行い、動物が滑り落ちる限界角度を測定した。

結果：300mg/kg 群では投与後 1 時間で落下限界角度の軽度な減少がみられたが、その後は大きな変動はみられなかった。30 および 100mg/kg 群では筋弛緩作用はみられなかった。

5. 消化管に及ぼす影響

1) 麻酔下ウサギの生体位腸管運動に対する作用

方法：1 群雄 4~5 匹からなるウサギを用い、ウレタン麻酔下(皮下注射；1.5g/kg)において、腸管内バルーンを挿入し、圧トランスデューサーを介して腸管運動をポリグラフに記録した。そして安定した状態を確認後、検体の 0、1、3、10 および 30mg/kg を静脈内投与し、以後連続して記録した。

結果：3mg/kg 群では腸管運動の抑制があらわれ、10 および 30mg/kg 群では著明な抑制作用が認められた。1mg/kg 群では腸管運動に及ぼす影響は認められなかった。

2) ラットの炭末輸送能

方法：1 群雄 5 匹からなるラットを用い、検体の 0、10、30 および 100mg/kg を経口投与した。投与後 3 時間および 24 時間に 10%炭末液(1mL/100g 体重)を経口投与し、その 30 分後に動物を屠殺し、全小腸を摘出して、その全長と炭末の移動距離を測定し、輸送率を求めた。

結果：100mg/kg 群では投与後 3 時間の検査で炭末移動率(対照群：68.4%，100mg/kg 群：42.2%， $p < 0.01$;Dunn 検定)の有意な減少が認められた。翌日の検査では、有意な変動は認められなかった。30mg/kg 群以下ではいずれの測定時点にお

いても炭末輸送能に対する影響は認められなかった。

3) ラットの胃液分泌に対する作用

方法：1群雄5匹からなるラットを用い、18時間絶食後、検体の0、10、30および100mg/kgを経口投与した。その30分後にエーテル麻酔したで幽門部を結紮し、3時間後に位を摘出した。そして胃液を採取し、胃液量、pHおよび総酸度(胃液100mLを中和するのに必要な1/10N NaOHの量で示す)を測定した。

結果：100mg/kg群では総酸度の有意な減少(対照群：85.7mL, 100mg/kg群：40.7mL, $p < 0.01$; Dunnett検定)、pH値の有意な上昇(対照群：pH 1.2, 100mg/kg群：pH 3.5, $p < 0.01$; Dunn検定)および胃酸分泌抑制がみられた。胃液量には有意差が見られない程度の減少が認められた。30mg/kg群では総酸度に有意差が認められない程度の減少傾向が認められたが、pH値、胃液分泌に影響は認められなかった。10mg/kgでは総酸度、pH、胃液量の項目の何れにおいても明らかな変化はみられなかった。

6. 腎機能に及ぼす影響

1) ラットの尿排泄に対する作用

方法：1群雄5匹からなるラットを用い、0、30、100および300mg/kgを経口投与した。そして検体投与直後および1日後からそれぞれ4時間にわたり採尿した。なお、採尿前に2.5mL/100gの生理食塩水を経口投与した。得られた尿について、外観を観察し、尿量、比重、電解質 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- を測定した。更に、尿試験紙を用いて、pH、潜血、糖、蛋白、ケトン体、ビリルビン、亜硝酸塩およびウロビリノーゲンについて定性分析を行った。

結果：投与直後から4時間かけて蓄尿したサンプルにおいて、100mg/kg群では尿量のわずかな減少がみられ、300mg/kgでは尿量の減少に加えて、電解質の変動がみられた。30mg/kgでは各項目に変動は認められなかった。

7. 血液に及ぼす影響

1) ウサギの血液に対する溶血作用

方法：雄ウサギ5匹の耳介静脈からヘパリン処理済み注射筒で採血し、10%赤血球浮遊液を調製し、これに検体溶液を添加し(検体 $10^{-5}\text{M} \sim 10^{-3}\text{M}$)、吸光度法を用いて溶血率を測定した。

結果：全濃度で溶血率は0%であり、溶血作用を示唆する所見は認められなかった。

2) ラットの血液凝固に対する作用

方法：1群雄5匹からなるラットを用い、0、10、30および100mg/kgを経口投与した。投与後3時間、1日に大静脈より採血し、血漿(抗凝固薬；クエン酸ナトリウム)を分離してプロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間を測定した。

結果：プロトロンビン時間の延長はいずれの投与群でも認められなかった。

一方、活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な延長が、30mg/kg 以上の群で投与後 3 時間および 1 日の両測定時でみられた。しかしながら各時間延長は 10 秒以内のものであり、軽微な変化であった。10mg/kg では活性化部分トロンボプラスチン時間に変化は認められなかった。

活性化トロンボプラスチン時間

投与量 / 測定時間	3 時間	1 日
30mg/kg	↑116	↑118
100mg/kg	↑115	↑128

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

↑:p<0.01, ↑:p<0.05(Dunnet 検定)

以上の結果から、本検体の推定亜致死量(マウス 100mg/kg, ラット 300mg/kg, ウサギ 100mg/kg)の経口投与では、行動性の低下や体温下降、筋力低下、呼吸抑制(一過性の亢進後)を示した。その 1/30 量では、各生体機能に影響を与えなかった。また 1/10 量ではウサギの生体胃腸管で明らかな運動抑制を認め、更に 1/3 量ではこの所見に加え、散瞳、炭末輸送能の低下や胃液分泌の抑制が明らかに認められた。これらのことから、本検体は自律神経系および消化管に対し軽度の抗コリン様症状を示したものと考えた。

一方、中枢神経系および体性神経系に対しては致死量投与で上記に示すような症状を示す程度であり、明らかな作用は認められなかった。

また、腎機能や血液に対しても特異的な作用を示さなかった。

申請者による追記

本試験では、マウスの一般状態(多次元観察法(Irwin 法))及びウサギの呼吸数・心拍数(無麻酔)及び瞳孔径について 30 mg/kg では「作用」が認められており、そのため、これらの項目における「最大無作用量」は 10 mg/kg と報告している。このように、本試験では、検体の薬理作用を明確化し、誤飲等の事故時の処置法を検討するための「作用」の検出に目的が置かれていたことから、毒性作用と毒性でない作用を明確に区別せずに報告されている。また、マウスにおいて多次元観察法(Irwin 法)により一般状態を評価する際、投与前の絶食時間がラットと同様の約 16 時間と現在推奨されている 3 時間程度に比べ長いことや、投与日における観察頻度が 5 回と数多く、観察時間ごとに行われた検査項目によっては対照群より被験物質投与群で多く繰り返して行っていたこともあり、検体を投与した動物にかなり負荷のかかる状態で実施されていた。また 30mg/kg でみられた影響はすべて毒性作用であるとは考えられなかった。

このようなことから、本剤は自律神経系節遮断作用があることに着目し、現行の判断基準に基づき、同時期に 2 試験場所で急性に一番感受性の高いマウスについて多次元観察法を用いた神経系への影響を調べた(毒性資料 No. 原体-43-1, 原体-43-2)。1 試験施設で 30mg/kg において振せんが雌雄それぞれ 1 例に認められたが、その他の行動に関する項目、自律神経系に関する所見、筋緊張および反射に関する項目に影響は認められず、申請者の考えをサポートする実験結果であった一方、本剤の薬理作用を考えると振せんは毒性作用をとらえるべきと考え、20mg/kg を無毒性量と判断した。

「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

項目		投与経路	投与量 mg/kg	動物数/ 群	無作用量 mg/kg	作用量 mg/kg	結果の 概要
中枢神経系	マウスの一般行動 (Irwin 法)	経口	0, 10, 30, 100	♂: 3 ♀: 3	♂♀:10	♂♀:30	警戒性・運動性の低下、運動失調、100mg/kg 群で死亡例
	ウサギの一般行動 (Irwin 法)	経口	0, 10, 30, 100	♂: 3	♂:10	♂:30	行動性の軽微な抑制 100mg/kg 群で死亡例
	ウサギの体温	経口	0, 10, 30, 100	♂: 3	♂:30	♂:100	軽微な体温下降
呼吸・循環系	無麻酔ウサギ呼吸数	経口	0, 10, 30, 100	♂: 3	♂:10	♂:30	呼吸数の増加後、減少
	無麻酔ウサギ心拍数				♂:10	♂:30	増加
	麻酔下ウサギの呼吸	静脈内	0, 1, 3, 10, 30	♂: 4~5	♂:3	♂:10	一過性の亢進、死亡例はその後抑制
	麻酔下ウサギの血圧				♂:3	♂:10	下降
	麻酔下ウサギの心拍数				♂:3	♂:10	減少
自律神経系	ウサギの瞳孔径	経口	0, 10, 30, 100	♂: 3	♂:10	♂:30	散大
	ラットの瞳孔径	経口	0, 10, 30, 100	♂: 5	♂:30	♂:100	散大
体性神経系	ラットの腓腹筋収縮	経口	0, 30, 100, 300	♂: 3~4	♂:>300	—	影響なし
	ラットの筋弛緩作用	経口	0, 30, 100, 300	♂: 5	♂:100	♂:300	落下限界角度の軽度な減少
消化器系	麻酔下ウサギの腸管運動	静脈内	0, 1, 3, 10, 30	♂: 4~5	♂:1	♂:3	腸管運動抑制
	ラットの炭末輸送能	経口	0, 10, 30, 100	♂: 5	♂:30	♂:100	炭末輸送率の低下
	ラットの胃液分泌	経口	0, 10, 30, 100	♂: 5	♂:10	♂:30	総酸度の低下、胃液の減少、pH 値の上昇
腎機能	ラットの尿量、尿中電解質、定性分析	経口	0, 30, 100, 300	♂: 5	♂:30	♂:100	尿量の減少、電解質の変動
血液系	ウサギの血液に対する溶血作用	<i>in vitro</i>	$10^{-5} \sim 10^{-3} M$	♂: 5	$>10^{-3} M$	—	影響なし
	ラットの血液凝固作用	経口	0, 10, 30, 100	♂: 5	♂:10	♂:30	プロトロンビン時間影響なし、活性化部分トロンボプラスチン時間の軽度な延長 (10 秒以内)

最少致死量; マウス:100mg/kg, ラット:300mg/kg, ウサギ; 100mg/kg(経口), 30mg/kg(静脈内)

一般薬理試験-多次元観察法を用いた神経系への影響の確認(1)

(毒性資料 No. 原体-43-1)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 : 2016 年

- 検体の純度 : %
- 供試動物 : 雌雄 ICR 系マウス (Crj:CD-1),
供試時週齢; 7 週齢 (雄 32.1~35.3g, 雌 22.6~26.0g)
1 群雌雄各 3 匹
- 試験期間 : 2016 年 3 月 29 日~2016 年 3 月 30 日
- 試験方法 : 検体をジメチルスルホキシドに溶解させ、ポリエチレングリコール 400 を加えて混和調製した。投与に先だって 3~4 時間絶食させたマウスに経口投与した。再給餌は投与終了後 3 時間後とした。設定用量は 0、30mg/kg とし、投与用量は 10mL/kg とした。観察は検体投与前日、投与後 1 時間、6 時間および 1 日に多次元観察法 (Irwin 法) により神経症状を観察した。体重測定も投与前日、検体投与直前および検査終了時に実施した。
- 結果 : 検査期間中、いずれの用量群の雌雄においても死亡および検体投与に起因すると思われる著しい体重変化は認められなかった。多次元観察法を用いて、投与前日、投与後 1、6 時間および 1 日に観察した結果、以下の項目で極軽微な低下が認められた。
- 同側屈筋反射 ;
 - 投与前日 0 mg/kg 雄
 - 投与後 6 時間 0 mg/kg 雄
 - 投与後 6 時間 30 mg/kg 雌
 - 投与後 1 日 0 mg/kg 雄
 - 四肢筋緊張 ; 投与後 1 時間 30 mg/kg 雌
- その他の項目 (行動, 自律神経系, 反射) ; 平均スコアは全て正常範囲

以上、同側屈筋反射に極軽微な低下が認められたが、この変化は投与前日、投与後 6 時間および 1 日の観察においても対照群の雄で認められており、正常範囲であると判断した。

また投与 1 時間に認められた四肢筋緊張の極軽微な低下は、検体の薬効を考慮すると投与に関連する変化である可能性が考えられたが、投与後 6 時間には消失していたことから極短時間に発現した非常にわずかな変化であり、神経系に対する有害作用とは言えなかった

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

以上の結果から、マウスを用いて多次元観察法によりイミダクロプリドの神経症状を検討したところ、30mg/kg の用量を投与した本試験条件下において、急性薬理作用に基づく有害性は認められなかった。

一般薬理試験-多次元観察法を用いた神経系への影響の確認(2)

(毒性資料 No. 原体-43-2)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2016年

- 検体の純度 : %
- 供試動物 : 雌雄 ICR 系マウス (Slc: ICR),
供試時週齢; 7 週齢 (雄 30.5~33.3g, 雌 24.6~28.0g)
1 群雌雄各 5 匹
- 試験期間 : 2016 年 2 月 22 日~2016 年 2 月 25 日
- 試験方法 : 検体をジメチルスルホキシドに溶解させ、ポリエチレングリコール 400 を加えて混和調製した。投与に先だって約 3 時間絶食させたマウスに経口投与した。
設定用量は 0、20、30mg/kg とし、投与用量は 10mL/kg とした。
観察は検体投与前、投与後 0.5 時間、1 時間、3 時間、6 時間および 1 日に多次元観察法 (Irwin 法) により、体位、行動、自律神経系およびその他の項目について 2 分間観察した後、反射、および筋緊張の項目について検査した。
- 結果 : 検査期間中、いずれの用量群の雌雄においても死亡は認められなかった。多次元観察法を用いて、検体投与前、投与後 0.5 時間、1 時間、3 時間、6 時間および 1 日に観察した結果、以下の所見がみられた (表 1)。
自律神経系：
振せん；
投与後 1 時間 30 mg/kg 雄 5 例中 1 例
投与後 1 時間 30 mg/kg 雌 5 例中 1 例
行動：
自発運動；ほとんど動かない
投与後 1 時間 30 mg/kg 雌 5 例中 1 例
その他の項目；正常範囲

表 1.

投与量 (mg/kg)	性別	動物番号	所見の発生時間 (hr)	
			振戦	自発運動/ほとんど動かない
30	雄	1205	1	-
	雌	2202	-	1
		2203	1	-

-: 発生なし

以上、上記にみられた振せんおよび自発運動の低下はいずれも雌雄各1例に認められたもので、その他の行動、自律神経系、筋緊張および反射に明らかな影響を伴わず軽度なものであったが、本検体には自律神経節遮断作用があることから、本試験条件下における無毒性量は雌雄とも20mg/kgと判断された。

申請者による追記)30mg/kgで振せんがみられた雌雄各1例(各5例中)あるいは自発運動の低下がみられた雌1例(各5例中)は、これらの症状が観察された投与後1時間においてでさえも、その他の行動に関する項目、自律神経系に関する所見、筋緊張および反射に関する項目に影響は認められなかった。すなわち、振せんあるいは自発運動の低下がみられていても、頸部を二指でつまむと逃げようとするというように正常な受動性を示し、歩行も正常であったことから、認められたこれらの所見はきわめて軽度なものと考えられた。またその他の負荷のかかる検査を伴っているのにもかかわらず、発現はいずれも測定時間の1時点のみしか認められなかった。

(15) 解毒および治療

イミダクロプリドの各種神経作働薬との相互作用

(毒性資料 No. 原体-44)

試験機関：

[非 GLP]

報告書作成年月日： 1987年5月9日

検体の純度：

供試動物：雄ラット(SD系)：供試時7週齢，雄マウス(ICR系)：供試時5週齢，
モルモット(ハートレー系)：供試時5週齢，ウシガエル(供試時体重；
100g)

検体の調製と供試した神経作働薬：

実験 1)、2)では、少量のジメチルスルホキシドに検体を溶解後、ポリエチレング
リコール 400 を加えて混和調製した。

実験 3)、4)では、検体を少量のクレモホア EL と生理食塩水で懸濁させた。

各実験には以下の掲げた薬剤を使用した。

薬剤名	主作用
アトロピン (硫酸アトロピン)	抗コリン作用(ムスカリン受容体遮断)
ヘキサメトニウム (臭化ヘキサメトニウム)	自律神経節遮断
エゼリン (サリチル酸エゼリン)	コリンエステラーゼ(ChE)阻害
ネオスチグミン (メチル硫酸ネオスチグミン)	コリンエステラーゼ(ChE)阻害
ツボクラリン (塩酸ツボクラリン)	神経筋接合部遮断
ヒスタミン (二塩化ヒスタミン)	ヒスタミン作働性
アセチルコリン (塩化アセチルコリン)	コリン作働性
硫酸ニコチン (硫酸ニコチン)	神経節興奮・抑制
ディプテレクス乳剤	コリンエステラーゼ阻害

いずれも原液のまま、あるいは生理食塩水で希釈して使用した。

試験方法および結果：

実験 1) 検体の急性経口毒性に対する各種薬剤処理

各薬剤(アトロピン、ヘキサメトニウム、エゼリン、ネオスチグミン、アセチルコリン)を1群3~5匹の雄マウスおよび雄ラットの腹腔内または皮下に前処理(修飾作用の有無)および後処理(救命作用の有無)、検体の急性経口毒性を調べた。

前処理は検体経口投与前5分とし、後処理はマウスの場合経口投与直後、ラットの場合は10分後から症状に応じて行った。

実験 1) 結果：

表1に示したようにマウス・ラットでの検体の急性経口毒性に対し、アトロピンの前処理はその毒性を著明に増強させ、重篤な症状の発現や死亡時間が検体のみの処理に比し早められた。ヘキサメトニウム(自律神経節遮断薬)の前処理も毒性を軽度ながら増強せしめた。一方、ChE阻害薬であるエゼリンの前処理はマウスでは影響はなかったが、ラットでは毒性の軽減がみられた。また、エゼリンのマウスへの後処理ではわずかに毒性が弱められた。

表2には別のChE阻害薬ネオスチグミンおよびコリン作働性アセチルコリンの皮下投与による後処理の結果を示した。ネオスチグミンではエゼリンのような毒性軽減の傾向はみられなかったが、アセチルコリンの皮下投与ではラットにおいて毒性軽減作用がみられた。

以上のように、検体の毒性は自律神経にみる限り、副交感神経遮断状態下あるいは自律神経節遮断状態下で強められ、副交感神経興奮下で(ChE阻害状態)で弱められる結果がえられた。従って、検体は抗コリン作用を有する。

表1：検体単独のLD₅₀値と各薬剤の併用処理によるLD₅₀値の変化

薬剤	マウス雄 (mg/kg)		ラット雄 (mg/kg)
	試験 I	試験 II	試験 III
検体単独 p. o.	135	90	900
アトロピン 25mg/kg i. p. 前処理	35		<500
ヘキサメトニウム 25mg/kg i. p. 前処理	95		600
エゼリン 0.2~0.3mg/kg i. p. 前処理	120		>1000
エゼリン 0.3mg/kg i. p. 前処理		135	

表 2 : 検体単独の LD₅₀ 値と各薬剤の併用処理による LD₅₀ 値の変化

薬剤	マウス雄 (mg/kg)	ラット雄 (mg/kg)
検体	90	600
ネオスチグミン 0.1mg/kg s.c. 後処理	90	750
アセチルコリン 10mg/kg s.c. 後処理 2mg/kg s.c. 後処理	100	1000

実験 2) ChE 阻害による中毒およびアセチルコリン投与での症状に対する検体の処理

ChE 阻害剤としてディプレックス乳剤を用い、この急性経口毒性に対する検体の腹腔内投与による前処理の影響を 1 群 3~5 匹の雄マウスおよび雄ラットを用いて、アトロピンの効果と比較検討した。

更に、雄マウスを用い、アセチルコリン投与 (20mg/kg 皮下投与) で生じる流涎および流涙に対する検体の前処理による影響を、他剤の効果と比較検討した。上記 2 試験における薬剤の前処理は、検体は投与前 10~15 分、その他の薬剤は投与前とした。

実験 2) 結果 :

ChE 阻害作用をもつ有機リン系農薬 (ディプレックス乳剤) の経口投与によるラットおよびマウスの急性中毒に対し、検体は明らかな救命効果を示した。また、アトロピン類似作用 (ムスカリン受容体遮断による抗コリン作用) を有するか否かをみるために、アセチルコリン投与で生じるマウスの流涎、流涙に対する検体の影響を、前処理して調べたところ抑制作用は全く認められなかった。

従って、抗コリン作用は有するものの、作用点はアトロピンのようなムスカリン受容体にあるのではないことが示唆された。

表 3 : ディプレックス乳剤の LD₅₀ 値と検体を含めた各薬剤の併用処理による LD₅₀ 値の変化

薬剤	マウス雄 (mg/kg)	ラット雄 (mg/kg)
ディプレックス乳剤単独 p.o.	1300	1200
検体 10mg/kg i.p. 前処理	2000	
50mg/kg i.p. 前処理		2000
アトロピン 25mg/kg i.p. 前処理	>2000	2000

表 4 : アセチルコリン投与による検体を含めた薬剤の併用処理による症状抑制作用

薬剤	流涎	流涙
アセチルコリン単独 s. c.	4/4	3/4
検体 10mg/kg i. p. 前処理	3/3	2/3
アトロピン 25mg/kg i. p. 前処理	0/3	0/3

症例数/使用動物数

実験 3) 摘出モルモット腸管を用いた実験

雄モルモットの摘出回腸をマグヌス管内にて懸吊し、アセチルコリン、ニコチンおよびヒスタミンによる等張性収縮を記録しこれに対する検体の影響を調べた。検体の前処理はいずれも各収縮薬適用前 30 秒から 1 分間とした。

実験 3) 結果 :

摘出モルモット腸管において、検体の前処理は、アセチルコリン収縮に対して明らかな作用は示さなかったが、ニコチンによる収縮に対しては抑制効果を示した ($3 \times 10^{-6}M$)。

この結果は、検体がニコチン受容体遮断を介し、副交感神経節での神経伝達を阻害していることを意味するものと考えられる。

更にヒスタミン収縮に対しては、前処理では明らかな作用がみられなかったが、後処理において収縮の軽減傾向が認められた。

実験 4) 摘出カエル腹直筋を用いた実験

ウシガエルを断頭屠殺し、脊髄破壊後直ちに常法に従い腹直筋を摘出し、得られた腹直筋をマグヌス管内にて懸吊し、アセチルコリンおよびニコチンによる等張性収縮を記録した。これに対する検体の影響を調べた。

実験 4) 結果 :

摘出カエル腹直筋では、検体の $3 \times 10^{-4}M$ の前処理でアセチルコリン収縮に対する、また検体の $10^{-4}M$ の前処理でニコチン収縮に対する抑制作用が認められた。

この結果から、神経節接合部での神経伝達に抑制を示すものと思われた。

以上の結果から、検体がコリン作働性神経の伝達阻害作用、すなわち抗コリン作用を有することが確認され、更にこの検体の作用部位としてアセチルコリンのニコチン受容体への関与が推察された。

イミダクロプリドの有機リン化合物との相互作用

(毒性資料 No. 原体-45)

試験機関：

[非 GLP]

報告書作成年月日：1992年6月18日

検体の純度：イミダクロプリド

供試動物：雄マウス(ICR系 CRJ-CD-1)：供試時5週齢，1群5匹

検体の調製：

検体および2種の有機リン化合物はジメチルスルホキシドに溶解後、ポリエチレングリコール400で混和調製した。それぞれの混合物の毒性に対する効果をみるために用いた硫酸アトロピンは生理食塩水に溶解した。

投与方法：

体を強制経口投与した。投与容量は体重10gあたり0.1mLとした。投与前日の夕方から絶食を行い、翌日の投与後30分に再給餌した。中毒症状の観察は投与後5日まで行ったが、症状の遅延する個体は症状の消失まで観察した。硫酸アトロピンは検体の投与直後に20mg/kgを大腿部に筋肉注射した。

試験方法および結果：

1)イミダクロプリド、2種の有機リン化合物の単独の急性経口毒性試験成績

イミダクロプリド

LD₅₀値は120mg/kgであった。中毒症状は投与後数分から鎮静、呼吸異常などがみられ、死亡は早い個体では投与10分前後にみられた。症状の回復は速やかで翌日までには回復した。

LD₅₀値は600mg/kgであった。中毒症状は投与後数分から振せんや呼吸異常などがみられた。発症状況に個体差があり、有機リン化合物特有の振せんや流涎を示さないまま、呼吸困難やけいれんを呈して死亡する例が多かった。死亡の多くは投与後1時間前後にみられ、回復も比較的早かった。

LD₅₀値は430mg/kgであった。中毒症状は投与後30分から振せん、流涎などの症状が発現し、投与後5日でも観察された。死亡は投与後1～3日に散発的にみられた。

上記LD₅₀値から Finny の式に基づいて求めた混合物の期待LD₅₀値は、イミダクロ

プリドと の毒性等価比率(1:5)で360mg/kg、混合剤製剤比率(1:10)で440mg/kgであり、イミダクロプリドと の毒性等価比率(1:3.5)で275mg/kg、混合剤製剤比率(1:8)で330mg/kgであった。

2)イミダクロプリドと の相互作用および硫酸アトロピン処理の効果

等価比率の LD₅₀ 値は 430mg/kg で、製剤比率で 900mg/kg といずれも期待値(360mg/kg、440mg/kg)より高値となった。製剤比率では期待値の約2倍となり、拮抗作用といえる数値であった。中毒症状の発現と消失時間および死亡時間は、イミダクロプリドと の処理とほぼ同じであった。

製剤比率の硫酸アトロピン処理での LD₅₀ 値は 760mg/kg であり、アトロピン無処理での LD₅₀ 値である 900mg/kg に比してやや低値であった。先行してみられるイミダクロプリドの毒性の発現が硫酸アトロピン処理でより強くあらわれる傾向がみられた。

3)イミダクロプリドと の相互作用および硫酸アトロピン処理の効果

等価比率の LD₅₀ 値は 300mg/kg で、製剤比率で 420mg/kg といずれも期待値(275mg/kg、330mg/kg)より高値を示し、相乗毒性はないことが確認された。また中毒症状の発現時間も製剤比率での低用量群で遅く、個体ごとに見た場合投与後1時間くらいから多くの動物に症状が発現した。死亡時期は、毒性等価比率でイミダクロプリドの用量に依存してわずかに早い傾向を示したが、製剤比率においては、単独と同様、3日後も続いた。

一方、製剤比率におけるアトロピン処理では、LD₅₀ 値が 350mg/kg とアトロピン無処理での LD₅₀ 値である 420mg/kg に比してやや低値であった。

表1 LD₅₀ 値の比較

	LD ₅₀ 値	期待 LD ₅₀ 値
イミダクロプリド+		
毒性等価比率混合(1:5)	430mg/kg	360mg/kg
製剤比率混合(1:10)	900mg/kg	440mg/kg
製剤比率混合+硫酸アトロピン	760mg/kg	440mg/kg
イミダクロプリド+		
毒性等価比率混合(1:3.5)	300mg/kg	275mg/kg
製剤比率混合(1:8)	420mg/kg	330mg/kg
製剤比率混合+硫酸アトロピン	350mg/kg	330mg/kg

以上の結果から、イミダクロプリドと有機リン剤の との間に相乗毒性は認められなかった。また、各混合物投与直後の硫酸アトロピン処理は、明らかな毒性増強作用は示さなかったが、その高投与量においてやや毒性を強める傾向がみられた。

イミダクロプリドの救命試験

(毒性資料 No. 原体-46)

試験機関：

[非 GLP]

報告書作成年月日： 1992年6月18日

検体の純度：

供試動物：雄ラット(SD系 CRJ:CD)：供試時7週齢，1群3～6匹

雄マウス(ICR系 CRJ:CD-1)：供試時5週齢，1群5匹

試験方法：

検体はジメチルスルホキシドおよびポリエチレングリコール400に溶解し調製した。解毒を目的に供試した薬剤については蒸留水を用いた活性炭を除き、生理食塩水で調製した。

供試薬剤：

有効成分	商品名	処理用量	処理経路	効能
フェノバルビタール	フェノバル®	5mg/kg	s. c.	鎮静，抗痙攣薬
ジモルホリン	テラプチク®	0.3mg/kg	i. p.	呼吸興奮薬
塩酸プロプラノロール	インデラル®	1mg/kg	i. p.	β-遮断薬
メチル硫酸ネオスチグミン	ワゴスチグミン®	0.05mg/kg	s. c.	抗コリンエステラーゼ薬
活性炭	ノーリット SX-3	1g/kg	p. o.	吸着剤

検体は経口投与とした。検体の投与量はLD₅₀値量とその1.5倍量とし、ラットでは500mg/kgと750mg/kg、マウスとウサギでは検体100mg/kgと150mg/kgとした。検体の投与容量はラット、マウスでは10mg/kgとし、ウサギでは5mg/kgとした。

供試薬の投与は、症状の発現し始める、マウスでは5分、ラットでは15分そしてウサギでは30分後にそれぞれ1回行った。

更に、胃洗浄による効果についても検討した。この場合にはラットに検体の800mg/kgを投与し、投与後15、30、60分にそれぞれ胃洗浄を行った。

結果：

1. 各供試薬の単独処理による効果(表1)：

フェノバルビタールの投与により、マウス、ラットに対して死亡率の低下および延命効果、ウサギにおいては死亡率の低下を認めた。

活性炭の投与では、ラットに対して死亡率の低下、ウサギに対して延命効果と死亡率の低下がみられた。

しかし、ジモルホリン、塩酸プロプラノロール、メチル硫酸ネオスチグミンの処理では明らかな効果は認められなかった。

2. 活性炭とその他の供試薬との併用処理による効果(表 2) :

フェノバルビタールと活性炭の併用投与では、マウスとラットの単独処理よりもわずかに死亡率が低下し、マウスでは発症開始も遅れる傾向がうかがわれたが、いずれも顕著なものではなかった。

ジモルホリン、塩酸プロプラノロール、メチル硫酸ネオスチグミンと活性炭の併用処理では、活性炭単独の結果と同等であった。

3. 胃洗浄による効果(表 3) :

ラットに対する胃洗浄の効果は検体投与後 15 分の処理では中毒症状も散瞳のみで無処理に比して明らかに軽く、完全な救命が可能であった。投与後 30 分と 60 分の洗浄では十分な洗浄ができた場合には救命の可能性は大きく、死亡率を明らかに軽減した。

4. 中毒症状 (散瞳の観点から)

ラット、ウサギの試験を通じ、検体にみられる散瞳所見に留意しつつ観察を行った。投与後、始めにみられる所見は散瞳であり、そして呼吸異常や振せんなど全身症状がみられる間は継続的にみられ、散瞳の消失と共に、回復していることがみいだされた。また鎮静症状などの全身症状がなお存続していたとしても、散瞳が消失した動物はその後悪化することなく回復した。またウサギ活性炭処理では、その効果に伴い散瞳所見が比較的早く消失した。更に一般薬理試験(毒性資料 No. 原体-43)における瞳孔径の測定においても、最少致死量の 3 分の 1 量で散瞳をみていることから、この所見は検体の中毒の発現、回復の指標になりうるものと考えられた。

以上の結果から、本検体の急性中毒時に卓効を示す解毒薬は見出されなかったが、出現する症状を軽減する対症治療薬としては活性炭およびフェノバルビタールが考えられた。また経口投与による中毒時に、検体が胃内に滞留しているときには、胃洗浄は効果的であった。

表1：フェノバルビタール、活性炭単独処理の効果

種	群	検体用量	死亡数/供試動物数				発症期間	
		mg/kg	1時間	4時間	1日	5日	開始	終了
マウス	無処理	100	2/5	2/5	2/5	2/5	3分	1日
		150	3/5	5/5	5/5	5/5	3分	-
ス	フェノバルビタール	100	0/5	0/5	1/5	1/5	4分	2日
		150	1/5	2/5	3/5	3/5	4分	3日
雄	活性炭	100	1/5	1/5	1/5	1/5	2分	3時間
		150	3/5	4/5	4/5	4/5	2分	1日
ラット	無処理	500	1/5	1/5	2/5	2/5	20分	1日
		750	1/5	2/5	3/5	3/5	4分	3日
ト	フェノバルビタール	500	0/5	1/5	2/5	2/5	9分	3日
		750	0/5	1/5	1/5	1/5	3分	4日
雄	活性炭	500	0/5	1/5	1/5	1/5	7分	2日
		750	0/5	2/5	2/5	2/5	6分	5日
ウサギ	無処理	100	0/2	0/2	0/2	0/2	40分	4日
		150	0/3	2/3	3/3	3/3	25分	-
ギ	フェノバルビタール	100	0/2	0/2	0/2	0/2	20分	4日
		150	0/3	1/3	1/3	1/3	30分	3日
雄	活性炭	100	0/2	0/2	0/2	0/2	1時間	1日
		150	0/3	0/3	0/3	2/3	30分	3日

フェノバルビタール 5mg/kg s.c., 活性炭 1g/kg p.o.

表2：フェノバルビタール、活性炭併用処理の効果

種	群	検体用量	死亡数/供試動物数				発症期間	
		mg/kg	1時間	4時間	1日	5日	開始	終了
マウス	無処理	100	2/5	2/5	2/5	2/5	3分	5時間
		150	3/5	4/5	5/5	5/5	2分	-
ス	活性炭	100	1/5	1/5	1/5	1/5	2分	5時間
		150	2/5	3/5	3/5	3/5	1分	1日
雄	活性炭 + フェノバルビタール	100	0/5	0/5	0/5	0/5	8分	4時間
		150	3/5	3/5	3/5	3/5	3分	4時間
ラット	無処理	500	0/5	2/5	2/5	2/5	9分	1日
		750	0/5	4/5	5/5	5/5	2分	-
ト	フェノバルビタール	500	0/5	2/5	2/5	2/5	10分	2日
		750	0/5	2/5	4/5	4/5	6分	8日
雄	活性炭 + フェノバルビタール	500	0/5	1/5	1/5	1/5	9分	2日
		750	1/5	2/5	4/5	4/5	10分	5日

フェノバルビタール 5mg/kg s.c., 活性炭 1g/kg p.o.

表 3 : 胃洗浄の効果 (雄ラット)

投与用量 mg/kg	処理時間 (投与後)	発症		死亡		死亡数/ 供試動物数
		開始	終了	開始	終了	
800	無処理	30 分	-	2 時間	6 時間	5/5
	15 分後	40 分	3 時間	-	-	0/6
	30 分後	50 分	1 日	3 時間	6 時間	2/5
	60 分後	30 分	1 日	-	-	0/3