

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。

4. 急性神経毒性

(1) チアクロプリドのラットにおける急性経口神経毒性 スクリーニング試験
(資料 No. 原体-7)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：1997年5月12日

検体の純度：97.5% (1995年10月)、96.7% (1996年4月)

試験動物：Fischer344 ラット、1群雌雄各12匹

試験開始時；雄9週齢(159~192g)

雌9週齢(112~137g)

試験期間：14日間観察

【試験方法】

検体調製

検体を所定量秤量し、0.5%メチルセルロース・0.4%Tween80 を含有する脱イオン水中に懸濁させた。

投与方法

投与前約16~18時間絶食させたラットにカテーテルを用い、0(担体)、20、50及び100mg/kgの用量で強制的に単回経口投与した。

投与容量は、体重100gあたり1mLとした。

臨床症状の観察及び体重の測定

観察期間は14日間とし、少なくとも1日1回、詳細な身体検査を含め臨床観察を行った。

体重は、運動機能評価試験(FOB)の一環として週1回測定した。

運動機能評価試験(FOB)及び運動能試験

本試験に割り当てられた動物は、全て4回(被験物質投与1週間前、投与4時間、7日及び14日後)FOB及び運動能試験を行った。

運動機能評価試験は、握力、開肢状態、立ち直り反応など*により記載された一連の試験法に準拠した。

運動能試験は、8の字型迷路法を用い自動化運動能測定装置で行い、運動能と移動能について検査した。

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

運動能及び移動運動能は、90分間のセッション及び各々10分のインターバルで試験した。

運動能は、セッション中に赤外線のリモコンを遮った回数により測定した。

移動運動能は、ラットが迷路中で新しい場所に移動し、別のリモコンの中の一つを遮る回数を計測した。

順応性はセッション内での運動量の減少として評価した。

剖検及び脳重量の測定

投与後14日目、灌流と臓器組織採取用の動物（各用量群から雌雄各6匹）は、ペントバルビタール（50mg/kg）の腹腔内注射で深部麻酔した。他の動物は、CO₂で窒息死せしめた。剖検は、全ての動物の全臓器、体腔、断面、外部開口部、体表の検査を含み行った。

脳は、ホルマリンによる固定前に頭蓋骨から切り離し重量を測定し、脳：体重比を計算した。

病理組織学的検査

高用量群（100mg/kg）の雌雄動物の組織を対照群動物の組織と比較検討した。検体関連の病変は明らかではなかったため、低用量群の動物の組織については検査を行わなかった。動物の脳、脊髄、両眼（視神経共）、選択した（左右）末梢神経（坐骨、脛骨、腓腹神経）、ガッサー神経節、腓腹筋などについて病理組織学的検査を行った。

【結果】

検体中の被験物質濃度

20、50及び100mg/kgの3用量群の化学分析の結果、22、53及び109mg/kgであった。以下の結果は分析値で示す。

臨床観察及び体重の測定

検体投与に関連して、53mg/kg雌群に観察された唯一の症状は瞳孔拡大であった。109mg/kgの雌雄群では、振戦、運動能低下、移動運動能不整（運動失調）、接触無関心、瞳孔拡大、被毛の汚れ及び眼瞼下垂等の症状が見られた。これらの症状は、投与日に発現し、翌日までに消失した。

これらの結果から、臨床症状に対する無毒性量（NOEL）は、雄で53mg/kg、雌で22mg/kgであった。

死亡した動物は、認められなかった。

体重の測定において、109mg/kgの雄群で僅かな増加抑制が認められたが、最終時には、対照群と差異は認められなかった。雌では全群で影響はみられなかった。

*: , "Screening Approaches to Neurotoxicity : A Functional Observational Battery",
J. Am. Coll. Toxicol., 1989, 8, pp. 85-93.

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。

運動機能観察試験(FOB) 投与4時間

方法	性別	雄				雌			
	用量 (mg/kg)	0	22	53	109	0	22	53	109
ケージサイド	歩行不整：軽度	0	0	0	6*	0	0	0	2
	振戦：軽度	0	0	0	3*	0	0	0	5*
	中度-重度	0	0	0	7*	0	0	0	6*
	活動性低下	0	0	0	10*	0	0	0	12*
	眼瞼下垂	0	0	0	7*	0	0	1	9*
取り扱い時	瞳孔拡大	0	0	0	9*	0	0	4*	11*
	流涙	0	0	0	0	0	0	0	2
オープンフィールド	姿勢：立位	7	5	10	6	11	12	9	0*
	座位・横臥	5	7	2	6	1	0	3	11*
	腹臥	0	0	0	0	0	0	0	1*
	振戦：軽度	0	3	6*	0	0	0	3*	0
	中度-重度	0	0	0	12*	0	0	0	12*
	歩行不整：軽度	0	0	0	9*	0	0	0	8*
	中度-重度	0	0	0	0	0	0	0	2*
	眼瞼下垂	0	1+	1+	7+	0	0	0	10+
	覚醒 正常	5	1	3	1	10	11	10	0*
	不活発-探索行動	3	8	6	6	2	1	2	3*
	不活発-軽度動き	4	3	3	5	0	0	0	9*
	立ち上がり回数	0.9	0.2	0.2	0.2	3.3	2.4	3.0	0.0*
刺激反応	接近反応：反応なし	1	4	6*	10*	0	1	3*	11*
	軽度の反応	11	8	6*	2*	12	11	9*	1*
	接触反応：反応なし	0	2	0	2	0	0	0	8*
	軽度の反応	12	10	11	9	12	12	11	4*
	軽度より反応あり	0	0	1	1	0	0	1	0*
	聴覚反射：反応なし	0	0	0	4	0	0	0	3
	軽度の反応	12	12	11	7	12	12	12	9
	軽度より反応あり	0	0	1	1	0	0	0	0
	尾ピンチ反応：反応なし	0	0	0	3	0	0	0	10*
	軽度の反応	12	12	12	9	12	12	12	2*
	立ち直り反応：軽度の失調	0	0	1	5*	0	1	1	9*
	横に着地	0	0	0	0	0	0	0	1*
体温	36.6	36.7	36.6	32.3*	36.9	36.2	36.3	30.1*	

*：対照群と有意差あり (p<0.05; Dunnett) 太字：投与に起因するもの +：統計分析をしなかった。

全ての3用量群で、検体に起因する影響は投与日(day 0)において認められた。これらの影響は、全般的に上述した臨床所見と一致していた。すなわち、22mg/kg群では、雄における眼瞼下垂及び軽い振戦と、1匹の雌における空中立ち直り反応不全に限定されていた。53mg/kgの雌雄群に見られた影響は、軽微な振戦、眼瞼下垂、軽い空中立ち直り反応不全及び接近反応の減退等であった。これらの症状に加えて、雌では瞳孔拡大がみられた。両群にみられたこれらの症状は、統計学的に有意でないものもあるが、対照群動物にはみられないこと、用量依存であること、また症状

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。

発現日の点等から投与に起因するものであった。109 mg/kg群の雌雄における投与関連の症状は、歩行不整、振戦、活動性低下、眼瞼下垂、瞳孔拡大、空中立ち直り反応不全、及び体温低下であった。雌雄共、一般的に多くの刺激（すなわち、接近、接触、聴覚及び尾を挟むこと等）に対して、用量依存的に僅かに無反応となった。更に、同群の2匹の雌には、明らかな流涙が見られ、複数の雌では対照群動物に比し、立ち上がり回数の減少と、オープンフィールド試験中に坐ったり横臥していることが多いことが観察された。全用量群における雌雄の毒性症状は、次の試験時、すなわち投与7日後までに消失した。

これらの結果から、FOBに対するNOAELは、雌雄共に22mg/kg未満であった。

運動能及び移動運動能

8の字型迷路における運動能及び移動運動能の、合計90分間の試験セッションでの検体投与前の測定値（表参照）は、運動能では、対照群に比し雄で+0~17%を、雌で-11%~+18%を、また移動運動能では、雄で-3%~+16%を、雌で-12%~+18%をそれぞれ示した。このことから、一般的な規準としては、22%以下の差異は、本実験室でのラット10-20匹/性/用量の試験群において通常の変動値の範囲であり、生物学的に有意なものではないと判断される。また、対照群の動物では、投与0日には他の試験日と比べ、運動能及び移動運動能は明らかに低レベルを示しており、この試験日（投与日）における運動能の低下は、急性経口毒性試験でみられる絶食に起因する所見と一貫している。

検体に起因する低下は、109mg/kgの雄群及び全用量群の雌で投与0日に認められた。

合計90分間の試験セッションでの結果を下表に要約した。

運動能試験結果の要約（対照群との対比%）

雄				
用量	処理前	投与0日	投与7日	投与14日
0mg/kg	463±72	205±78	539±218	573±186
22mg/kg	462±143(-0.2)	249±84(+21)	587±179(+9)	696±330(+21)
53mg/kg	543±146(+17)	169±89(-18)	499±155(-7)	610±327(+6)
109mg/kg	515±131(+11)	89±51(-57)	416±173(-23)	534±121(-7)

雌

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。

用量	処理前	投与0日	投与7日	投与14日
0mg/kg	762 ± 151	514 ± 202	772 ± 220	1016 ± 168
22mg/kg	677 ± 189 (-11)	375 ± 115 (-27)	686 ± 317 (-11)	840 ± 230 (-17)
53mg/kg	811 ± 234 (+6)	302* ± 136 (-41*)	773 ± 385 (+0.1)	1089 ± 315 (+7)
109mg/kg	902 ± 313 (+18)	147* ± 111 (-71*)	611 ± 242 (-21)	801 ± 215 (-7)

試験セッションにおける遮光回数：平均値 ± 標準偏差 N=12

表中の()値は、対照群に対する変動率(%)

* 対照群と運動能に有意差あり (p<0.05; ANOVA)

移動運動能試験結果の要約 (対照群との対比%)

雄

用量	処理前	投与0日	投与7日	投与14日
0mg/kg	178 ± 46	70 ± 32	192 ± 87	205 ± 72
22mg/kg	173 ± 47 (-3)	83 ± 27 (+19)	218 ± 73 (+14)	244 ± 115 (+19)
53mg/kg	206 ± 68 (+16)	58 ± 26 (-17)	187 ± 64 (-3)	220 ± 134 (+7)
109mg/kg	191 ± 41 (+7)	3 ± 3 (-96)	156 ± 53 (-19)	194 ± 40 (-5)

雌

用量	処理前	投与0日	投与7日	投与14日
0mg/kg	278 ± 83	162 ± 69	282 ± 109	346 ± 83
22mg/kg	244 ± 91 (-12)	103* ± 25 (-37*)	272 ± 146 (-4)	295 ± 104 (-15)
53mg/kg	295 ± 97 (+6)	97* ± 38 (-40*)	258 ± 134 (-9)	365 ± 118 (+5)
109mg/kg	329 ± 121 (+18)	2* ± 2 (-99*)	204 ± 90 (-28)	266 ± 110 (-23)

試験セッションにおける遮光回数：平均値 ± 標準偏差 N=12

表中の()値は、対照群に対する変動率(%)

* 対照群と運動能に有意差あり (p<0.05; ANOVA)

合計90分間のセッションでは53 - 109mg/kg群の雌において、投与0日目に運動能(41%、71%)及び移動運動能(40%、99%)の低下が対照群に対し統計的に有意に見られた。雄では、どの群でも有意な行動性の低下は認められなかった。

試験セッション内の各々のインターバルにおける行動性の解析を行った結果、雄では、投与日0日の109mg/kg群で最初の2回のセッションでは対照群に比較すると低下した。またいくつかのセッションでの有意に高い行動性の変動がみられたが、馴化後の対照群動物における著しい行動の低下に由来するものと考えられた。雌では、運動能及び移動運動能値は全投与群において最初のいくつかのインターバルで対照群に比し低下し、その差に用量相関性が認められた。これらの低下は、次回の試験セッション、すなわち投与7日後までに完全に回復した。

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。

順応性は、検体の投与によっては影響されなかった。

これらの結果から、運動能及び移動運動能に対し、NOAELは雄で53mg/kg、雌で22mg/kg未満であった。

剖検

剖検において、雌雄共に検体投与に起因する所見は認められなかった。

脳重量

脳重量に、雌雄共に検体投与に起因する影響は認められなかった。

病理組織学的検査

109mg/kg 群の雌雄共に、検体投与に起因する病理組織病変は認められなかった。

以上のことから、本試験では、検体の単回経口投与後に現れる毒性は用量相関的に増大することが確かめられた。投与により発現した症状は、神経毒性を示すものではなく、むしろ急性経口投与後にみられる一般的な毒性徴候と考えられ、全用量群において速やかに回復した。投与後7日まで持続した毒性症状は、対照群に比し109mg/kg 雄群に見られた一過性の僅かな体重増加抑制のみであり、最終時には対照群との間に差異は認められなくなった。この群でその他の何らの病理組織学的所見が認められなかったことから、神経病理に対するNOAELは、雌雄共、109mg/kgすなわち最高投与用量であった。一過性の一般臨床症状より、急性経口投与後における検体に対する全体のNOAELは、22mg/kg未満であった。

本試験では、一般臨床症状に対する全般的な NOAEL は確立出来なかったので、22mg/kg 設定用量で影響を受けた評価項目に対して NOAEL を確立するため、より低用量での追加試験を計画した。

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。

(2) チアクロプリドのラットにおける急性経口神経毒性 スクリーニング試験
(追加試験) (資料 No. 毒性-7-1)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日： 1998年5月4日

検体の純度： 97% (1997年4月)、96.8% (1997年10月)

試験動物： Fischer344 ラット、1群雌雄各12匹

試験開始時；雄9週齢(154~207g)

雌9週齢(108~139g)

試験期間： 14日間観察

投与量設定理由：

先に実施した試験(毒性資料No. 5) 0(担体)、22、53及び109mg/kgの用量での急性経口神経毒性スクリーニング試験において、低用量である22mg/kg群にFOBで軽微な検体に起因した影響がみられ、また雌で8字型迷路の運動能及び移動運動能に低下が認められたことにより、全体のNOAELを設定することができなかった。このことから、再度急性経口神経毒性スクリーニング試験における全般的なNOAELを得るために、より低用量(2.5及び10mg/kg)を設定した。

【試験方法】

検体調製

検体を所定量秤量し、0.5%メチルセルロース・0.4%Tween80を含有する脱イオン水中に懸濁させた。

投与方法

投与前約16~18時間絶食させたラットにカテーテルを用い、0(担体)、2.5及び10mg/kgの用量で強制的に単回経口投与した。

投与容量は、体重100gあたり1mLとした。

臨床症状の観察及び体重の測定

観察期間は14日間とし、少なくとも1日1回、詳細な身体検査を含め臨床観察を行った。

体重は、投与直前に測定し、個々の投与容量を決定した。

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。

運動機能評価試験 (FOB) 及び運動能試験

前回の試験結果より、FOB は、投与後 4 時間（神経行動学的作用のピーク時間）に開始し、投与後約 7 時間にその測定を終了した。運動能試験は、雌のみで投与後約 4 時間に行った（雄に関しては前試験で NOAEL が得られている）。

運動機能評価試験は、握力、着地開脚幅、立ち直り反応など *により記載された一連の試験法に準拠し、個体別に調べた。

運動能試験は、8 の字型迷路法を用い自動化運動能測定装置で行った。

運動能及び移動運動能は、90 分間のセッション、及び各々 10 分のインターバルで試験した。運動能は、セッション中に赤外線のパームを遮った回数により測定した。移動運動能は、ラットが迷路中で新しい場所へ移動し、別のパームの中の一つを遮る回数を計測した。

順応性はセッション内での運動量の減少として評価した。

* : , "Screening Approaches to Neurotoxicity : A Functional Observational Battery",

J. Am. Coll. Toxicol., 1989, 8, pp. 85-93.

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。

【結果】

検体中の被験物質濃度

2.5 及び 10mg/kg の 2 用量群の化学分析の結果、3.1 及び 11mg/kg であった。以下の結果は分析値で示す。

臨床観察及び死亡率

検体投与に関連した臨床症状は、全ての用量群で認められなかった。

したがって、臨床症状に関する無毒性量 (NOAEL) は、雌雄ともに 11mg/kg であった。

死亡した動物は、認められなかった。

機能観察試験 (FOB)

全ての群の雌雄に、検体に起因する影響は投与日 (day 0) においても認められなかった。

これらの結果から、FOBに対するNOAELは、雌雄共、11mg/kgであった。

運動能及び移動運動能試験

8の字型迷路における雌の運動能及び移動運動能の結果は、下表に要約した。

運動能及び移動運動能試験結果の要約 (対照群との対比%)

用量	運動能	移動運動能
3.1mg/kg	- 1	-18
11mg/kg	-21*	-27*

+ : 対照群より大、- : 対照群より小 N=12

運動能に対照群との有意差がない (p<0.05 ; ANOVA)

* : 生物学的に有意な差を示す

投与0日に11mg/kgの雌群において認められた差は、検体に起因する低下と考えられた。これは、投与後7日までには完全に回復していた。

順応性は、検体の投与によって影響されなかった。

これらの追加試験結果から、運動能及び移動運動能でのNOAELは、雌では3.1mg/kgであった。

以上の2つの試験結果から、急性経口投与後の検体の総括的なNOAELは、雄で11mg/kg、雌で3.1 mg/kgであった。また、観察された一過性の活動性の低下は、種々の非神経毒性物質においてみられることから、それ自体は、神経毒性によるものではなく、急性な経口投与試験に一般的にみられる非特異的な症状と判断する。

[申請者追記]ARfDの設定に際し、JMPR(2006年)およびEU(2004年)の評価では、本急性神経毒性試験を設定の根拠とし、NOAEL 3.1mg/kg、安全係数100として、0.03mg/kgを設定した。なお、米国でも本試験を設定根拠試験のひとつとしている。

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

5. 急性遅発性神経毒性

ニワトリを用いた急性遅発性神経毒性試験

(資料 No. 原体-8)

13 生産第 3986 号「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成 12 年 11 月 24 日付け 12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知) の運用についての「4. 試験成績の除外について」(2) ⑧ア及びイの規定に基づき下記の理由により試験を省略した。

- ・ 急性毒性試験等他の試験成績から、当該農薬の有効成分がコリンエステラーゼ阻害性を有さず、また、遅発性神経毒性を有する既知の化学物質との化学的構造上の相関等からみて、遅発性神経毒性を有するおそれはない。

6. 90日間反復経口投与毒性

(1) チアクロプリドのラットを用いた飼料混入投与による亜急性経口毒性試験 (資料No. 原体-9)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1997年5月6日

検体の純度：98.6%

試験動物：ウィスター系ラット、1群雌雄各10匹 [0ppm及び1600ppm群については、回復群として更に雌雄各10匹を設定]

試験開始時；雄5～6週齢(78～113g)

雌5～6週齢(77～102g)

試験期間：13週間+5週間[回復期間](1994年4月13日～1994年8月15日)

【投与方法】

検体を、0(対照群)、25、100、400及び1600ppmの濃度で飼料(1%のピーナッツ油添加)に混入し、12週間にわたって摂食させた。その後、対照群と1600ppm群については検体を混入していない調製飼料を5週間投与した。検体を混入した飼料は週毎に調製した。

投与用量設定の根拠；

投与用量は、バイエル社で実施した予備試験(予備試験1、資料No. 原体-9に添付)に基づいて設定した。この試験では、0、5、10、20、60及び120mg/kgの用量で2週間投与した。5mg/kg以上の用量では、肝臓の酵素誘導が観察された。20mg/kg以上の用量では、飲水量の増加、リンパ節における細胞数の減少及び活性化したマクロファージの増加が認められた。60mg/kg以上の用量では、摂餌量、体重及び白血球数が減少した。そして120mg/kg群の動物は、外部刺激に鈍感、肝臓に対する軽度の作用、無機リン濃度の増加、脾臓における細胞数の減少及び肝臓組織における細胞増殖の亢進を示した。

この試験の結果に基づいて、本試験の投与用量を上記のように設定した。

なお、本亜急性毒性試験の予備試験の結果、肝臓の酵素誘導が観察されたため、混餌投与(0、25、100、500、2000ppm)による追加試験(予備試験1-1、資料No. 原体-9に添付)を実施した。この試験より、肝臓の酵素誘導(500ppm以上の用量：49.2mg/kg/

日) が観察されることを確認した。

【試験項目及び結果】

1) 臨床症状及び死亡率

臨床症状及び生死を少なくとも1日2回(週末と休日は1回)観察した。個体別の詳細な観察として例えば体表、天然孔、姿勢、一般行動、呼吸及び排泄などについて週1回実施した。

その結果、動物の健康状態および一般行動については、いずれの投与群にも異常所見は認められなかった。

1600ppm 群の雄の1匹では、一過性の蒼白、腹部膨満、斜頸、呼吸困難及び眼瞼の半閉鎖が観察された。すべての用量群の雌雄で、体の異なる部位に脱毛の発生する例が散見された。

また試験期間中に死亡例は認められなかった。

2) 体重(図1, 図2)

投与開始前とその後週1回14週時まですべての生存動物の体重を測定した。

主群では、400ppm以下の投与群で体重増加に投与の影響はなかった。1600ppm群では雌雄ともに体重が軽く体重増加抑制が観察された。その結果、試験終了時まで対照値と比較して統計学的有意差がみられた。投与期間終了時の平均体重は、1600ppm群の雄では、対照動物の体重値の約84%、1600ppm群の雌では約86%であった。

主群と同様に、回復群の雌雄でも投与期間中、統計学的に有意な低体重と体重増加の抑制が観察された。回復期間中は、1600ppm群の体重は低値ではあったが、対照群との差は時間の経過とともに縮小し、雄の最終体重においては有意な差は認められなくなった。

図 1

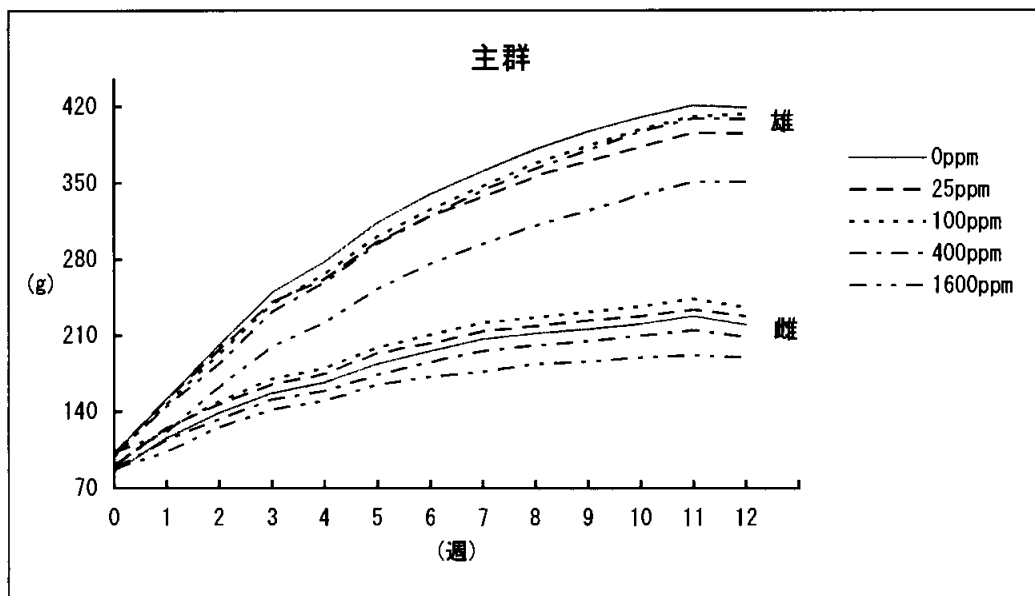
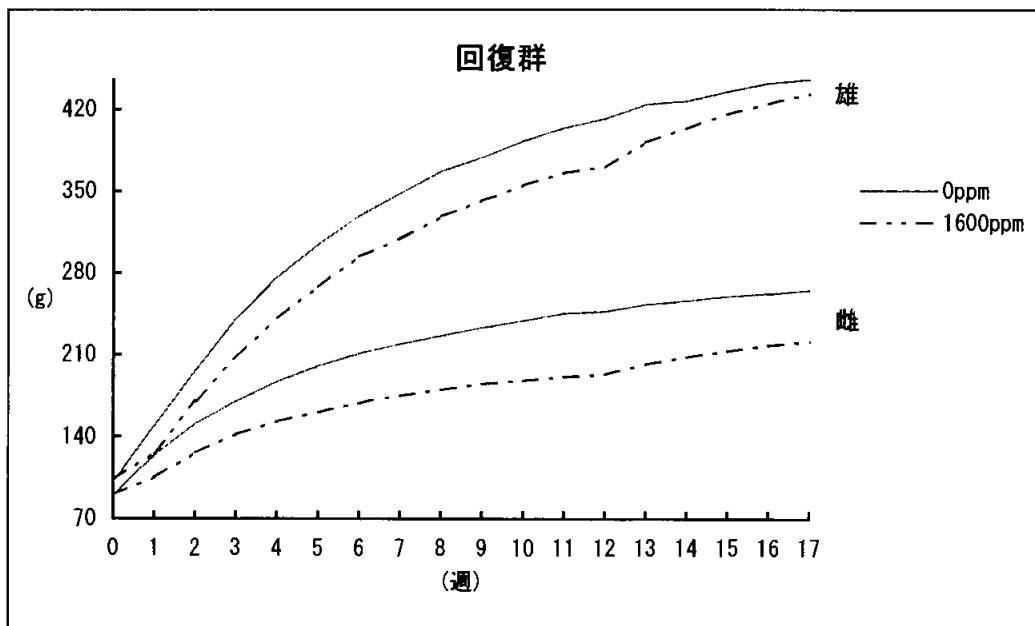


図 2



3) 摂餌量及び検体摂取量

全動物の摂餌量を週1回個体毎に測定した。

1600ppm 群までの投与群では、摂餌量に毒性学的に意義のある変化はみられなかった。

検体摂取量は、次の表1に示した。

表1 検体摂取量(mg/kg/日)

投与量(ppm)		25	100	400	1600
検体摂取量	雄	1.9	7.3	28.6	123.2
(mg/kg/日)	雌	2.0	7.6	35.6	160.6

4) 飲水量

飲水量を週1回個体毎に測定した。

1匹あたりの平均総飲水量及び毎日の飲水量は、1600ppm 群の雄で減少したが、体重あたりの飲水量に減少は認められなかった。

1600ppm 群の雌では、飲水量が1匹あたりでも体重1kgあたりでも多かったが、その差は小さく、更に1匹あたりでは、用量相関性のある傾向はみられなかった。したがって、雌における飲水量には投与による毒性学的に有意な影響はないものと考えられる。

5) 臨床検査

血液サンプルについての血液学的検査及び臨床化学的検査は、第3週、11ないし12週(主群)及び第17週(回復群)に実施した。いずれの検査でも、各群のすべてのラットを検査に使用した。

5-1) 血液学的検査

エーテル麻酔下で、非絶食の動物の眼窩静脈叢から採取した血液を用い、以下の項目について測定又は算定した。また赤血球形態についても観察した。

白血球百分率、赤血球の形態、ハインツ小体、赤血球数、血色素量、ヘマトクリット値、白血球数、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、平均赤血球容積、血小板数、トロンボプラスチン時間 (Hepato-Quick)、網赤血球数
表 2 に統計学的に有意差の認められた項目を示した。

データから分かるように、いずれの検査時期において、1600ppm までの投与群で雌雄を問わず、赤血球関連項目、形態に投与に起因するような差異は認められなかった。1600ppm 群の雄では赤血球数の増加 ($9.43 \times 10^{12}/L$) が認められたが、その差が非常にわずかであり、1回の測定時期にのみ観察されたこと、そして個体別の数値が背景データの正常変動範囲内 ($8.17 \sim 10.39 \times 10^{12}/L$) に納まっていることから、毒性学的に意義のある変化とは考えなかった。

白血球数には、1600ppm までの投与群で用量依存性の変化はみられなかった。白血球分画の指標では、雌雄で第 12 週に単球の減少 (1.0~1.8%) が観察された。対照群 (3.3%) との間には、100ppm 以上の投与群の雌で有意差がみられたが、用量相関性は認められなかった。回復群の雌 (第 17 週) では明らかにリンパ球の百分率が上昇 (92.5%) し、好中球 (6.4%) 及び好酸球 (0.4%) の百分率が減少した。これらの変動は、個々の値が従来からの背景データの正常変動範囲内 (単球: 0~5%, リンパ球: 80~99%, 好中球: 0~17%, 好酸球: 0~2%) にあること、あるいは片性の観察一時期及び投与中止後 4 週間の時点でしか観察されなかったことから、毒性学的な意義を示すものとは考えられなかった。

血小板数には、1600ppm までの投与群で影響はみられなかった。凝固時間には、400ppm 以下の投与群で毒性学的に有意な変化は認められなかった。1600ppm 群の雌 (第 3 及び 12 週) のみで、平均凝固時間 (21.8~25.0sec) の短縮が有意に認められた。しかし、用量との関連性がみられず、背景データ (21.1~40.6sec) 内であったことから特に毒性学的な意味を示すものとは考えられなかった。

表2 血液学的検査（有意差の認められた項目）

性別	雄				雌			
投与量 (ppm)	25	100	400	1600	25	100	400	1600
検査時期	3週				3週			
トロンボプラスチン時間								↓90
白血球百分率 /単球			↓42					
検査時期	12週				12週			
赤血球				↑106				
トロンボプラスチン時間								↓94
白血球百分率 /単球						↓45	↓30	↓55
検査時期	17週(回復)				17週(回復)			
網状赤血球	—	—	—	↓85				
白血球百分率 /リンパ球	—	—	—		—	—	—	↑105
/分葉核好中球	—	—	—		—	—	—	↓74
/好酸球	—	—	—		—	—	—	↓36

↑↓ : p<0.05 , ↑↓ : p<0.01 (U検定)

表中の数値は、対照群に対する変動率 (%)

5-2) 血液生化学的検査

以下の項目について測定を行った。

アルカリホスファターゼ (APh)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALAT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ASAT)、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GLDH)、アルブミン、(総)蛋白質、(総)ビリルビン、コレステロール、クレアチニン、グルコース、トリグリセリド、尿素、カルシウム、塩素、カリウム、ナトリウム、リン、トリヨードチロニン、(総)チロキシン、チロキシン結合能 (TBC)

なおこれら項目のうち、グルコースは無麻酔下、非絶食の動物の尾静脈から採血し除蛋白処理した全血を用い測定した。その他の項目の測定には、エーテル麻酔下で、非絶食のラットの後部眼窩静脈叢から採血した末梢血の血漿を用いて行った。

表 3 に統計学的に有意差の認められた項目を示した。

表からもわかるように、トランスアミナーゼ活性に著しい増加は認められなかった。1600ppm 群の雄で GLDH 及び ASAT、同群の雌で ASAT 活性の減少が認められた。これらの差異は単発的、偶発的なものであり、毒性学的な意義を示すものとは考えられなかった。

400ppm 以上の投与群では雌雄共に、コレステロール値ないし蛋白質濃度の増加が観察され、その理由は解明されなかったが、脂質及び蛋白質の代謝に対する一時的な作用を示すものと考えられた。さらに、1600ppm 群の雄(第 12 週)では、クレアチニン濃度が増加した。回復期間後には、これらの所見に回復性がみられた。

100ppm 群の雌では第 3 週に蛋白質濃度が増加(65.8g/L)したが、対照群(63.1g/L)との差が非常にわずかであり(約 4%)、用量相関性がなく、また第 3 週のみ統計学的な有意差がみられたことから、毒性学的な意義を示すものとは考えられなかった。さらに、すべての個体別の値は背景データの正常変動範囲内(55.9~67.6g/L)にあった。

血清または血漿中の電解質(カリウム、塩素及び無機リン)濃度の測定では、毒性学的な意義のある差は認められなかった。散発的な変動は偶発性のものであり、投与とは無関係と考えた。

*T3 については、雄の第 3 週的全投与群及び第 12 週の 1600ppm 群で明らかに増加した。1600ppm 群では、甲状腺の重量増加が認められたが組織学的な変化は認められなかった。この甲状腺ホルモン濃度の軽度の変化は、高用量の投与後に観察された酵素(特に肝 UDP-GT)誘導による二次的な結果として、甲状腺ホルモンの代謝が変化したものと推察された。また 400ppm 以下の雄投与群での増加(1.81~1.94nmol/L)は、投与第 3 週のみ知見であり、自然発生性のものと考えられた。その理由は、この測定項目の背景データの正常変動範囲内(1.00~1.93nmol/L)にあること、また甲状腺重量や甲状腺の形態に影響が認められなかったことである。さらに追加試験(資料 No. 原体-9-4)においても投与後第 3 週の T3 は増加していないことから、自然発生性のものであることが確認された。雌の T3 では統計学的に有意な変化は認められなかった。

T4 については、雄の 400 および 1600ppm 群の第 3 週のみで増加し、投与に起因

* 甲状腺ホルモンの変動に関しては追加で実施した試験(資料 No. 原体-9-4)も参照。

する影響と考えられた。

TBC の増加が、雄では第 3 週の 1600ppm 群(0.84)と第 12 週的全投与群(0.93～0.95)に、雌では第 3 週の 400ppm 以上の投与群(0.88～0.89、ただし第 12 週には消失)に観察された。1600ppm 群雄では、第 3 週および第 12 週両方とも増加し、UDP-GT の誘導がみられ、さらに甲状腺重量も増加していることから、肝酵素誘導の二次的な結果としての投与による軽度の甲状腺への作用と考えられた。雄の 400ppm 以下の投与群および雌では、これらの変動は統計学的に有意であったが、用量関連性がほとんどみられず、対照群との差がきわめて小さく、また 100ppm 群雄の第 12 週の 1 匹のデータを除けば個別の数値は同年齢の動物における背景データの正常変動範囲内 (0.68～1.00) にあったことから、投与に関連したものとは考えらず偶発的な所見と考えられた。

回復期間の終了時には、毒性学的に意義のある変動は認められなかった。TBC 値が雌でわずかに増加 (0.84 : 5%) したが、その差はきわめて小さく、個別の数値は同年齢の動物における背景データ範囲内 (0.68～1.00) にあった。従ってこれらは毒性学的に意義のあるものとは評価されず、この投与に関連した影響は可逆的なものであると考えられた。

[申請者追記]

甲状腺ホルモンについては直近の背景対照データを用いて分析し直し、以下の変動を投与による変化と判断した。日周性リズムを考慮して背景対照データの 2s-範囲内の変動であれば投与に関連した変化とは考えなかった。

- ・ T3 : 1600ppm 群雄で増加

表3 血液生化学的検査（有意差の認められた項目）

性別	雄				雌			
	25	100	400	1600	25	100	400	1600
検査時期	3週				3週			
ASAT								↓ 78
GLDH				↓ 7				
コレステロール				↑ 136			↑ 115	↑ 157
トリグリセリド								↑ 148
蛋白			↑ 104	↑ 107		↑ 104	↑ 105	↑ 104
Na				↓ 98				
Ca				↓ 98				
CL	↑ 101							
T3	↑ 114	↑ 118	↑ 122	↑ 142				
T4			↑ 115	↑ 112		↑ 135		
TBC				↑ 106			↑ 105	↑ 106
検査時期	11/12週				11/12週			
ASAT				↓ 80				
GLDH				↓ 2				
コレステロール				↑ 137			↑ 115	↑ 184
クレアチニン				↑ 114				
蛋白			↑ 106	↑ 111				↑ 107
Ca				↑ 104				
T3				↑ 130				
TBC	↑ 106	↑ 108	↑ 107	↑ 108				
検査時期	17週(回復)				17週(回復)			
GLDH	—	—	—	↓ 43	—	—	—	
コレステロール	—	—	—	↓ 83	—	—	—	
総ビリルビン	—	—	—	↓ 85	—	—	—	

↑ ↓ : p<0.05 , ↑ ↓ : p<0.01 (U検定)

表中の数値は、対照群に対する変動率 (%)

6) 肝臓ホモジネートを用いた薬物代謝酵素測定

投与 89 日後及び 124 日後の剖検の際に、各群雌雄 5 匹ずつのラットから肝臓の標本を採取し、以下の検査項目を測定した。

N-デメチラーゼ (N-DEM)、O-デメチラーゼ (O-DEM)、チトクローム P450 (P450)、アルドリンエポキシダーゼ (ALD)、7-エトキシクマリンデエチラーゼ (ECOD)、7-エトキシレゾルフィンデエチラーゼ (EROD)、エポキシドヒドロラーゼ (EH)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GS-T)、UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ (UDP-GT)。

表4に統計学的に有意差の認められた項目を示した。

主群の肝臓組織の検査結果からは、400ppm以上の投与群の雌雄でN-DEM、O-DEM及びP450の値に有意な変化が認められた。100ppm群の雄ではP450の値が増加(43.7nmol/g)したが、その差はきわめて小さく、個体別の数値が同年齢の動物における背景データ範囲内(22.0~55.4nmol/g)にあったため、毒性学的に意味のあるものとは考えなかった。

さらに、チトクロームに依存するモノオキシゲナーゼ類(ECOD, EROD, ALD)、EH及び抱合酵素(GS-T, UDP-GT)の活性が、1600ppm群の雌雄で一部顕著な増加を示した。400ppm群ではこれらの酵素誘導はわずかであり、2倍を超えるものはまったくなかった。

回復期間の終了時には、これらの酵素活性は雌雄ともに完全に元に戻っていた。

表4 肝薬物代謝酵素の測定(有意差の認められた項目)

性別	雄				雌			
	25	100	400	1600	25	100	400	1600
投与量(ppm)								
検査時期	13週				13週			
N-DEM			↑172	↑202		↓86	↑124	↑200
O-DEM			↑179	↑498				↑222
P450		↑120	↑173	↑310			↑123	↑203
ECOD			(167)	(715)			(174)	(502)
EROD				(247)			(138)	(138)
ALD			(137)	(393)			(182)	(418)
EH			(144)	(453)			(234)	(678)
GS-T			(135)	(248)			(123)	(224)
UDP-GT			(138)	(528)			(191)	(459)
検査時期	17週(回復)				17週(回復)			
O-DEM	—	—	—		—	—	—	↓80

ECOD, EROD, ALD, EH, GS-T, GLU-Tについては有意差検定を行わなかった。

↑↓: p<0.05, ↑↓: p<0.01 (U検定), 表中の数値は、対照群に対する変動率(%)

7) 尿検査

尿を、約16時間(一晚)の期間で採取した。各採取時期は、血液サンプル採取の前後数日とした。尿採取に先立って、ラットには20ml/kg体重の水を胃ゾンデを用いて投与した。尿採取の期間中は、飼料及び飲水は与えなかった。

尿検査は、第3週、11/12週(主群)及び第17週(回復群)に以下の項目について実施した。いずれの検査でも、各群のすべてのラットを検査に供試した。

定量検査

尿比重、カルシウム、カリウム、ナトリウム、尿量

半定量検査

ビリルビン、潜血、ブドウ糖、ケトン体、pH 値、蛋白質、ウロビリノーゲン、尿沈渣(顕微鏡検査)

表 5 に統計学的に有意差の認められた項目を示した。

定量的な尿検査の測定結果からは、1600ppm 群の雄で第 3、11/12 及び 17 週後にナトリウム及びカルシウムの増加がみられた。その他単発的に統計学的有意差を示す所見があったが、毒性学的な意義があるとは考えられなかった。

尿沈渣に異常は観察されなかった。

剖検、組織学的検査、臓器重量測定及び細胞増殖検査では、腎臓に影響はみられなかった。

表 5 尿検査 (有意差の認められた項目)

性別	雄				雌			
	25	100	400	1600	25	100	400	1600
検査時期	3 週				3 週			
Na				↑167				
検査時期	11/12 週				11/12 週			
比重						↓ 99		↓ 99
Na				↑200	↓ 51	↓ 54		
Ca				↑168				
検査時期	17 週(回復)				17 週(回復)			
尿量	—	—	—		—	—	—	↓77
比重	—	—	—	↑101	—	—	—	
Na	—	—	—	↑140	—	—	—	
Ca	—	—	—	↑122	—	—	—	

↑ ↓ : p<0.05 , ↑ ↓ : p<0.01 (U 検定) , 表中の数値は、対照群に対する変動率 (%)

8) 眼科学的検査

眼検査は、試験開始時に全群のすべての動物について実施し、第 12 週には 0 及び 1600ppm 群の主群のすべての動物について実施した。いずれの検査時にも、眼検査は採血の前に行った。

検体投与に関連のある異常は認められなかった。

9) 臓器重量

試験終了時、全生存動物を対照として、脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、甲状腺、精巣、卵巣の臓器重量を測定し、それらの対体重比も算出した。

表6に統計学的に有意差の認められた項目を示した。

試験成績から、400ppmまでの用量群では検体に起因すると考えられる変化は、雄の平均肝重量のわずかな増加だけであった。1600ppmの投与では、雌雄の肝重量の著しい増加、雄の甲状腺及び精巣重量の増加、そして卵巣の体重比重量の増加が認められた。この1600ppm群の精巣及び卵巣の重量増加は、13週間後の体重の低下に伴い、臓器の実重量が減少し体重比重量が増加したもので、これらの変動に毒性学的な意義は認められないと考えられた。回復期間終了後の臓器の実重量及び対体重比の測定結果には、重量測定によって明らかとなる新たな影響や遅発性の影響は示されなかった。他に1600ppm群で脳や心臓の体重比重量の増加などの変動が散見されたが、体重増加抑制に伴う変動であり、これらに毒性学的な意味はないと考えられた。

10) 剖検

投与終了時に主群のすべての動物を、また回復期間終了時に残りのすべての動物(回復群)を、エーテルの深麻酔下で放血後、剖検した。次に動物を解剖し、臓器・組織の詳細な病理解剖学的検査を実施した。変化が認められた場合には、その位置、大きさ、色及び硬さについて記録した。

投与終了時あるいは回復期間終了時に剖検した動物には、検体に起因するような所見は認められなかった。

表6 臓器重量 (有意差の認められた項目)

性別		雄				雌			
投与量(ppm)		25	100	400	1600	25	100	400	1600
検査時期		13週				13週			
体重					↓ 84				↓ 85
脳	実重量				↓ 94				
	対体重比				↑ 112				↑ 112
副腎	実重量				↓ 81				↓ 76
甲状腺	実重量				↑ 167				
	対体重比		↑ 200		↑ 300				
心臓	実重量				↓ 81	↑ 113			
	対体重比					↑ 109		↑ 111	↑ 110
肺	実重量				↓ 85				
肝臓	実重量				↑ 121				↑ 117
	対体重比			↑ 108	↑ 144				↑ 138
脾臓	実重量	↓ 80			↓ 81				
	対体重比								↑ 126
精巣	対体重比				↑ 118	/	/	/	/
検査時期		17週(回復)				17週(回復)			
体重		-	-	-		-	-	-	↓ 84
脳	対体重比	-	-	-		-	-	-	↑ 116
心臓	対体重比	-	-	-		-	-	-	↑ 115
肺	実重量	-	-	-		-	-	-	↓ 86
肝臓	対体重比	-	-	-		-	-	-	↑ 118
脾臓	実重量	-	-	-		-	-	-	↓ 89
腎臓	実重量	-	-	-		-	-	-	↓ 89
	対体重比	-	-	-		-	-	-	↑ 107
卵巣	対体重比	/	/	/	/	-	-	-	↑ 123

↑ ↓ : p<0.05, ↑ ↓ : p<0.01 (U検定)

表中の数値は、対照群に対する変動率(%), 検体の影響と考えられる数値を下線で示した。

11) 病理組織学的検査

以下の臓器について鏡検した。

大動脈、副腎、骨髄(大腿骨及び胸骨)、脳、盲腸、結腸、十二指腸、精巣、精のう、精巣上部、外涙腺、眼、大腿骨及び膝関節、ハーダー氏腺、心臓、空腸、回腸、腎臓、肝臓、肺、リンパ節(腸間膜及び下顎)、乳腺、筋肉(大腿部)、食道、視神経、卵巣、卵管、膵臓、脳下垂体、前立腺、直腸、唾液腺、坐骨神経、皮膚、脊髄(脊柱-頸部、胸部及び腰部)、脾臓、胸骨、胃、胸腺(もしあれば)、甲状腺及び上皮小体、気管、膀胱、子宮、膈、外耳道腺、肉眼的異常組織

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。

肺及び肝臓の1葉は、10%ホルムアルデヒド溶液中で固定した(あらかじめ10%ホルムアルデヒド溶液で還流固定後)。骨組織はまずEDTAで脱灰した。次にヘマトキシリン・エオジン染色(H&E)を施した。一部の肝臓については、オイルレッドO(ORO)染色を施した。

病理組織学的検査は下記のように実施した。

肝臓 : 全用量群、回復群を含む

腎臓、肺、甲状腺、食道、気管、肉眼所見 : 全用量群、回復群を除く

その他の臓器 : 対照群、高用量群

主要な病理組織学的所見は表7に示した。

表7 主要な病理組織学的所見

性	雄					雌				
	0	25	100	400	1600	0	25	100	400	1600
主群										
臓器/所見										
肝臓 検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
肝細胞肥大	0	0	0	9*	10*	0	0	0	2	10
細胞質変化	0	0	0	9*	10*	0	0	0	2	10
脂肪変化	5	8	4	7	10	4	4	3	5	0
細胞質封入体	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
クッパー細胞肉芽腫	0	0	3	1	2	1	0	0	1	1
副腎 検査動物数	10	-	-	-	10	10	-	-	-	10
リンパ球浸潤	0	-	-	-	0	1	-	-	-	0
甲状腺 検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
のう胞/外側甲状腺	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
子宮 検査動物数	/	/	/	/	/	10	-	-	-	10
拡張	/	/	/	/	/	3	-	-	-	3
回復群										
臓器/所見										
肝臓 検査動物数	10	/	/	/	10	10	/	/	/	10
肝細胞肥大	0	/	/	/	3	0	/	/	/	1
クッパー細胞肉芽腫	5	/	/	/	1	2	/	/	/	0

※ : $p < 0.01$ (χ^2 検定-申請者)

主群では、1600ppm群の全動物及び400ppm群雄10匹中9匹と雌10匹中2匹で、中程度の肝細胞肥大が観察された。この肥大は、核周辺の細胞質の変化を伴っていた。細胞質には微細な顆粒状ないし小胞状の構造が認められたが、変性を示す所見

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。

は認められなかった。これらの所見は検体投与によって引き起こされたと考えられたが、この肝細胞肥大は、生体外異物を除去するなどのような解毒作用(適応反応)の結果であると考えられた。

回復群の動物の肝臓について病理組織学的検査を実施したところ、雄 10 匹中 3 匹できわめて軽度の肝細胞肥大がみられた。細胞質の変化はすでに認められなかった。この様に、回復群では肝細胞肥大の発生頻度及び程度が明らかに減少したことから、この所見は可逆性のものであることが示唆された。

その他の所見は、すべての投与群に均等に分布しており、自然発生性のものと考えられる。

12) 免疫毒性学的検査

投与期間終了時の剖検の際に、血液(心臓穿刺)、腸間膜リンパ節、大腿骨及び骨髄、そして脾臓の半分を、各群 5 匹の動物から摘出し、以下の検査項目を測定した。

細胞数、FAC スキャン分析、PMA 刺激後のマクロファージ活性、mitogen 刺激、血清中の抗体価

細胞数計数:

リンパ節、脾臓及び骨髄の総細胞数の計数では、明白に被験物質と関連する影響はみられなかった。

FAC スキャン分析:

脾臓及びリンパ節の細胞の大きさの分布には何の影響もなく、蛍光解析でも種々のマーカーについて明白な影響は認められなかった。

マクロファージ活性:

脾臓では、1600ppm 群の雌雄でマクロファージ活性の軽度の増加がみられた。

mitogen 刺激:

1600ppm 群の雄では、LPS によって刺激された脾臓細胞の有意な増加がみられた。

抗体価:

IgA、IgG 及び IgM については、投与に関連した抗体価の変化は観察されなかった。性差は明確には示されなかった。

以上に示すように、1600ppm 群において、マクロファージ活性がわずかに増加し、

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。

脾臓の mitogen 刺激の亢進(LPS 刺激細胞の増加)が観察され、これらは検体投与と関連した変化と考えられた。記載した試験成績からは、性差があることを示すような所見は得られなかった。これらの用量群では、その他の臓器・組織に障害があったことから、記載されたこれらの変化は二次的な作用であり、被験物質による一次的あるいは特異的な免疫毒性の現れととらえないのが妥当と考えられた。

13) PCNA検査

投与期間及び回復期間の終了時の剖検の際に、肝臓及び腎臓を摘出して試験に供した。

肝臓の PCNA 測定結果は表 8 に示した。

データからは、1600ppm の検体を 12 週間投与した群において、肝臓及び腎臓に投与と因果関係のある細胞増殖所見は認められなかった。

表 8 肝組織の PCNA 測定

	測定領域			
	中心静脈域		門脈域	
	雄	雌	雄	雌
対照群	7.92 ± 2.48	8.80 ± 2.30	18.32 ± 3.83	16.89 ± 4.92
1600ppm	8.28 ± 2.88	9.91 ± 7.37	15.73 ± 2.81	18.50 ± 5.23

平均値±標準偏差

本試験において、1600ppm 群でみられた所見は、体重増加抑制(雌雄)、コレステロール(雌雄)、蛋白濃度(雌雄)、クレアチニン、T3(雄)の増加、P450、チトクロームに依存するモノオキシゲナーゼ類(N-DEM, O-DEM, ECOD, EROD, ALD)、EH 及び抱合酵素(GS-T, UDP-GT)等の増加(雌雄)、肝(雌雄)及び甲状腺(雄)重量の増加、そして肝の組織学的変化(雌雄)であった。また、マクロファージ活性(雌雄)及び脾臓 mitogen 刺激(雄)の亢進が観察された。400ppm 群では、コレステロール(雌雄)及び蛋白濃度(雌雄)の増加、P450、チトクロームに依存するモノオキシゲナーゼ類(N-DEM, O-DEM, ECOD, EROD, ALD)、EH 及び抱合酵素(GS-T, GLU-T)等の増加(雌雄)、肝重量の増加(雄)そして肝の組織学的変化(雌雄)であった。

従って、本試験における無毒性量は、100ppm(雄 7.3mg/kg/日, 雌 7.6mg/kg/日)であると判断した。

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。

(1-1) ラットにおけるチアクロプリドによるアロマトラーゼ誘導及びトキシコ
キネティクス試験（4週間混餌投与試験）（資料No. 原体-9-1）

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：1998年7月27日

【目的】

本試験の目的は、4週間混餌経口投与した雌雄のラットの肝臓のアロマトラーゼ活性の反応性を評価し、検体のトキシコキネティクスの情報を得ることであった。なお、本報告書は、検体をラットに4週間にわたって混餌投与により摂取させた2つの連続して実施した試験の成績をまとめたものである。

検体の純度：96.2～97.2%

試験動物：ウィスター系ラット

試験開始時体重：

試験番号	雄ラット		雌ラット	
	体重 (g)	週齢(週)	体重 (g)	週齢(週)
試験 1	218-257	7-8	200-223	11
試験 2	—	—	147-163	7-8

試験期間：試験 1 4週間(1997年9月29日～1997年11月7日)

試験 2 4週間(1998年1月23日～1998年3月27日)

【投与方法】

用量の概要及び各群への動物の割り当てを以下の表に示す。

	用量 (ppm)	雄		雌	
		群	動物数	群	動物数
試験 1	0	1	15	4	15
	100	2	15	5	15
	1000	3	15	6	15
試験 2	0	—	—	1	10
	200	—	—	2	10
	500	—	—	3	10

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。

投与用量設定の根拠；

最低用量には、アロマターゼ誘導に対して、無影響量と予想される用量である100ppmを選択した。他の用量は200、500及び1000ppmとし、この酵素の反応性を評価するための試験を行った。

【試験項目及び結果】

観察及び検査項目

検査/測定の実施項目を以下の表に示した。

	試験 1	試験 2
飼料中の有効成分の濃度測定	+	-
動物の観察	+	+
死亡率	+	+
飼料摂取量	+	+
検体摂取量	+	+
体重	+	+
臓器実重量	+	+
臓器対体重比	+	+
肝組織中のアロマターゼ測定	+	+
卵巣組織中のアロマターゼ測定	+	-
トキシコキネティクス	+	-
肉眼的病理所見	+	-

1) 臨床症状及び死亡率

臨床症状及び生死を少なくとも週1回観察した。

試験2試験では、検体の投与に関連する臨床症状は観察されなかった。1000 ppm (試験1)では数匹の動物に軽度の退色糞が認められた。

死亡率

検体投与に関連する死亡は、認められなかった。

2) 体重

各動物の体重は、試験開始前及び毎週測定し、さらに試験終了時に測定した。

体重増加の抑制が1000 ppm群の雄(-10%)、雌(-6.4%)及び500 ppm群の雌(-9.0%)で認められた。

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

体重平均値 (g) - 試験 1 -

用量 (ppm)	0 日目	7 日目	14 日目	21 日目	28 日目
雄					
0	236	264	300	320	341
100	236	258	291	306	323
1000	236	242 ⁺⁺	273 ⁺⁺	288 ⁺⁺	314 ⁺⁺
雌					
0	214	214	222	228	230
100	214	216	226	229	234
1000	214	203 ⁺⁺	210 ⁺⁺	213 ⁺⁺	217 ⁺⁺
- 試験 2 -					
雌					
0	155	174	187	193	201
200	154	168	178	183	188
500	155	162 ⁺⁺	173 ⁺	179 ⁺	183 ⁺

+ : p<0.05 , ++ : p<0.01 (Dunnett's Test)

3) 飼料摂取量及び検体摂取量の測定

個々のラットの飼料摂取量は毎週測定した。

100ppm の雄及び 1000ppm の両性において、一過性の飼料摂取量の減少が認められたが、それは投与第 1 週に最も顕著であった。しかし、1000ppm を含む全群で飼料摂取量に統計的に有意な変化は認められなかった。

検体摂取量を以下の表に示す。

各試験とも検体摂取量は飼料中濃度におおよそ比例していた。

	用量 (ppm)	雄				雌			
		mg/動物		mg/kg 体重		mg/動物		mg/kg 体重	
		計	/日	計	/日	計	/日	計	/日
試験 1	0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	100	55	2.0	187	6.7	42	1.5	184	6.6
	1000	521	18.6	1869	66.7	358	12.8	1692	60.4
試験 2	0	—	—	—	—	0	0.0	0	0.0
	200	—	—	—	—	102	3.6	570	20.4
	500	—	—	—	—	231	8.3	1331	47.5

4) 試料の採取

トキシコキネティクス試験に用いる血液は、眼窩静脈叢からエーテル麻酔下で採取した。遠心してリチウムヘパリン処理した血漿サンプルを作成し、トキシコキネティクスの分析を実施する実験室に移動するまで超低温で凍結保存した。エーテル深麻酔下でラットの肝臓（試験1及び試験2）及び卵巣（試験1）を摘出し、引き続き腋窩からの放血により屠殺した。試料はドライアイスで凍結させ、酵素測定する実験室へ移した。

5) アロマターゼ活性の測定（卵巣・肝臓）^注

卵巣

全ての操作は約4°Cで行った。1匹の動物から取り出した1対の卵巣（約80 - 190 mg）を、0.05 M. pH 7.4のリン酸緩衝液40mLに加えてホモジネートを作成した。ホモジネートは、1050 gで22分間遠心分離した。得られた上清は、分離し、インキュベーションに用いた。

卵巣のアロマターゼ活性は、発情間期の卵巣を用い「トリチウム化水分析法 (tritiated water assay)」により測定した。

雌ラットから得た卵巣のアロマターゼ活性（試験1）は、検体の100または1000ppm投与群のいずれにおいても検体投与の影響は認められなかった。

用量 (ppm)	平均活性値 (pmol/g/min.)	対照群を100としたときの値 (%)
0	4.2	100
100	4.3	102
1000	4.4	104

肝臓

全ての作業は約4°Cで行った。マイクロソーム分画は1.0 gの湿肝臓組織から調製した。組織を5 mLのpH 7.5のトリス/蔗糖緩衝液にいれ、ホモジネートを調製した。ホモジネートは、20000gで20分間遠心分離を行い、上清を更に100000gで1時間遠心分離した。沈澱物ペレットに1.0 mLのトリス/蔗糖緩衝液を加え、懸濁することにより洗浄し、ついで100000gで1時間遠心分離した。得られた沈澱ペレットは500 µLのトリス/蔗糖緩衝液に懸濁した。マイクロソームの濃度は、約1.5-2.0g湿潤組織/mLマイクロソームであった。

^注 [申請者追記]：その後実施した結果（資料 No.原体-18-7）から「トリチウム化水分析法」によるトリチウム化水の増加は非特異的な肝酵素活性の増加による可能性が高いことが示唆された。

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

肝臓ミクロソームのアロマターゼ活性は、「トリチウム化 水分析法」により測定した。

測定結果は下表に示した。

全体的に見て、100ppm群では雌雄共に肝アロマターゼ活性の増加は認められなかった。しかし、200ppm群（雌）では統計学的に有意（ $p < 0.05$ ）な増加、最高用量の1000 ppm群では雌雄共に有意（ $p < 0.01$ ）な活性の増加（雄 1.8倍、雌 2.4倍）がそれぞれ認められた。

試験 1				
用量 (ppm)	雄		雌	
	平均活性値 (pmol/g/min.)	対照群を 100 とし たときの値 (%)	平均活性値 (pmol/g/min.)	対照群を 100 と したときの値 (%)
0	45.5	100	10.4	100
100	55.1	121	9.3	89
1000	81.5**	179	23.0*	221

* : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$ (Student's t 検定)

試験 2		
用量 (ppm)	雌	
	平均活性値 (pmol/g/min.)	対照群を 100 とし たときの値 (%)
0	9.1	100
200	16.4**	180
500	19.2*	211

* : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$ (Student's t 検定)

試験 1 と試験 2 の総合評価 (雌)

用量 (ppm)	平均活性値 (pmol/g/min.)	対照群を 100 とした ときの値 (%)
0	9.8	100
100	9.3	96
200	16.4**	169
500	19.2**	196
1000	23.0**	237

* : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$ (Student's t 検定)

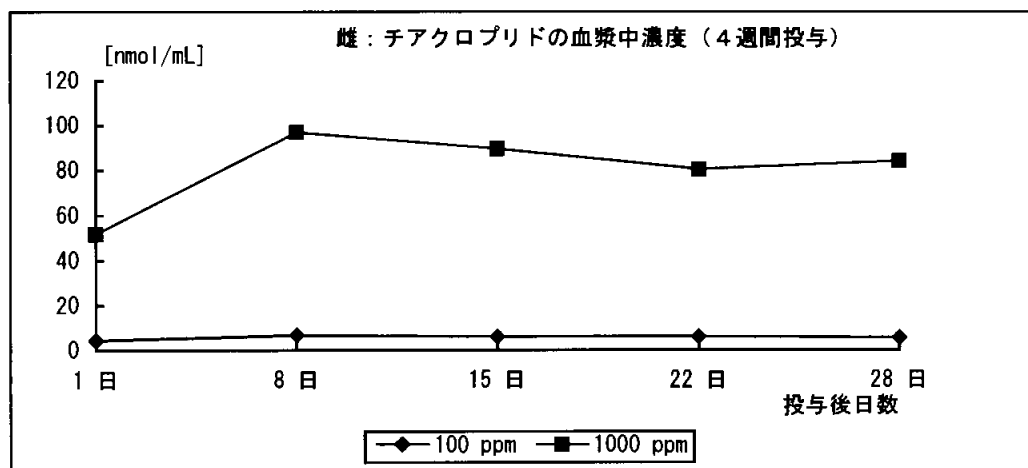
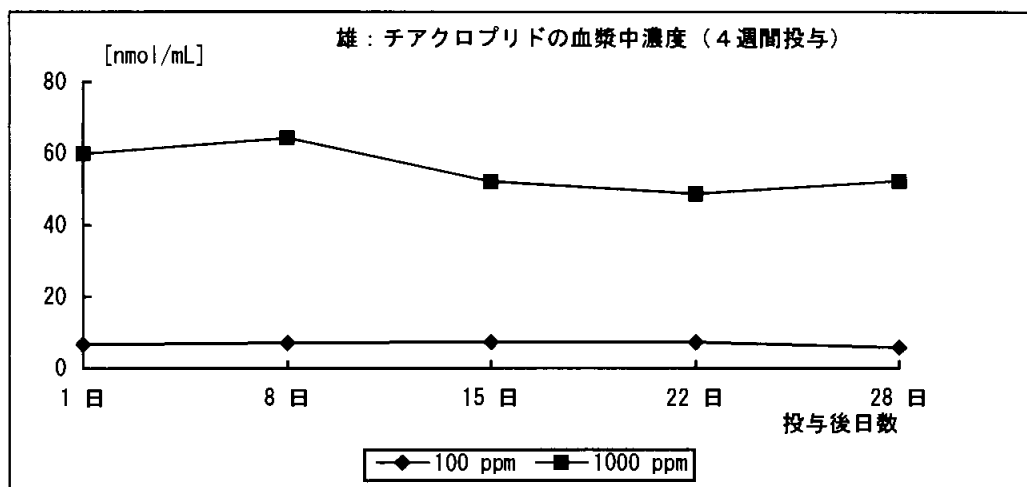
これらのことから、検体の卵巣アロマターゼ活性に対する影響はみられなかった。

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

6) トキシコキネティクス試験

雌雄ウイスターラットに、100及び1000 ppmの検体を含む飼料を4週間投与した。投与開始1、8、15、22、及び28日後の同時刻（約午前8時）に採取した血漿中の検体の濃度測定を行った。

測定は、抽出後にHPLC法によった。



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。

末梢血液中の検体濃度を測定した結果、雄ラットにおいて用量に比例した増加が認められたが、雌ラットにおいては用量に比例する以上に増加していた。1000 ppm群において、投与後1日で雄はプラトー(40-50nmol/mL)に達した。雌では、1日後の血漿中の検体濃度は雄と同程度であったが、投与7日後でより高い値(80-100nmol/mL)となり、プラトーに達した。投与期間中に血漿中のレベルが酵素の影響で減少する可能性があったが、減少は起こらなかった。

また雌動物の投与8日後の平均濃度は、雄ラットより1.6倍高かった。

したがって、血漿中の検体は、強い肝酵素の誘導が認められているにも拘わらず、特に雄ラットでは減少することなく、また雌ラットでは逆に増加が観察された。

7) 剖検

試験1の雌動物は発情休止期に剖検した。雄ラット及び試験2の雌ではそれぞれの投与期間終了後剖検した。動物はエーテル麻酔下で放血殺後剖検した。

1000ppm投与群の雌1例(動物番号78)で肝臓の分葉異常が認められた以外、1000ppm投与群を含み、いずれの群でも肉眼的病変は認められなかった。

8) 臓器重量

剖検時に以下の臓器重量を測定した。

脳、副腎(両側)、卵巣(試験1)及び肝臓(試験1、試験2)

投与に関連する臓器重量の変化としては、1000ppmの雌雄群で肝実重量及び対体重比の増加、500ppmの雌群で肝対体重比の増加が認められた。

雄の1000ppm群で副腎の実重量の低下が認められたが対体重比に変動がみられなかったことから、これは偶発的なもので体重増加の抑制に関連したしたものと考えられた。

臓器重量

性別		雄		雌			
		100	1000	100	200	500	1000
投与量(ppm)		100	1000	100	200	500	1000
体重			(94)			↓91	↓95
脳	実重量				—	—	
	対体重比				—	—	↑110
副腎	実重量		↓84		—	—	
	対体重比				—	—	
肝臓	実重量		↑120				↑111
	対体重比		↑127			↑110	↑117

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

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、最初の試験では、ウィスターラット雄15匹雌15匹の群に検体を0、100または1000ppmの用量で4週間混餌投与し、続く試験ではウィスターラット雌10匹に検体を0、200または500ppmの用量で4週間投与した2つの試験の結果、1000ppm群雌雄および500ppm群雌で体重増加の抑制、1000ppm群雌雄に肝臓重量の増加が明らかに検体投与による影響として認められた。

血漿中の検体の濃度の測定から、雄ラットでは投与量に比例した血漿中の濃度の増加が、雌ラットではより高い増加が認められた。雄ラットでは、1000 ppm投与1日後にすでにプラトー（40-50nmol/mL）に達した。雌ラットでは、1000 ppm投与1日後の血漿中の検体の濃度は雄と同程度であったが、投与7日後にプラトー（80-100nmol/mL）に達した。なお、反復投与期間中に酵素誘導によって血漿中濃度の減少が起こることも予想されたが、実際には減少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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(1-2) チアクロプリドの肝マイクロソームのチトクローム P450 依存性モノオキシゲナーゼの誘導に関する研究(in vitro) (資料No. 原体-9-2)

試験機関：

報告書作成年月日： 1998年7月20日

【目的】

検体は、ゲッ歯類の肝マイクロソーム酵素の強い誘導剤である。この誘導にも関わらず、検体の血漿中濃度の明らかな減少は認められていない。このことは、検体にはチトクローム P450 依存性モノオキシゲナーゼの阻害能もあることが考えられた。

これらのことから、検体のチトクローム P450 依存性モノオキシゲナーゼの阻害能の有無を確認するため、7-エトキシマリン-脱エチル化 (ECOD) 及びテストステロンの水酸化に対する影響について調べた。

【方法】

1) 7-エトキシマリンデエチラーゼ (ECOD)

検体の ECOD の阻害能を調べるために、雄ラットとフェノバルビタールで前処置した雄ラット及び雄イヌの肝マイクロソームを用い IC_{50} を測定した。 IC_{50} は、検体の 0、0.1、1、10 及び 100 μ M 濃度について測定した。検体は DMSO に溶解した。

7-エトキシマリンの酸化的脱エチル化は、7-ヒドロキシマリン固有の蛍光を測定することによって効率よく調べた。すなわち室温での細胞内の7-ヒドロキシマリンの形成は、蛍光光度法 (γ EXCIT 375nm、 γ EMIS 453nm) によって測定し、その蛍光をレコーダーに 10 分間プロットした。5 分間の蛍光の増加を用いて評価した。

2) テストステロンの水酸化

テストステロンの水酸化に対する検体による阻害を調べるために、雄ラットの肝マイクロソームで IC_{50} を測定した。雄ラットの肝臓における主な反応は、 16α 、 2α 、 6β 及び 7α 水酸化ならびにアンドロステンジオンへの酸化である。生成したこの代謝物を HPLC 法によって測定した。 IC_{50} 値は、検体の 0、10、100、500 及び 1000 μ M 濃度の測定から求めた。

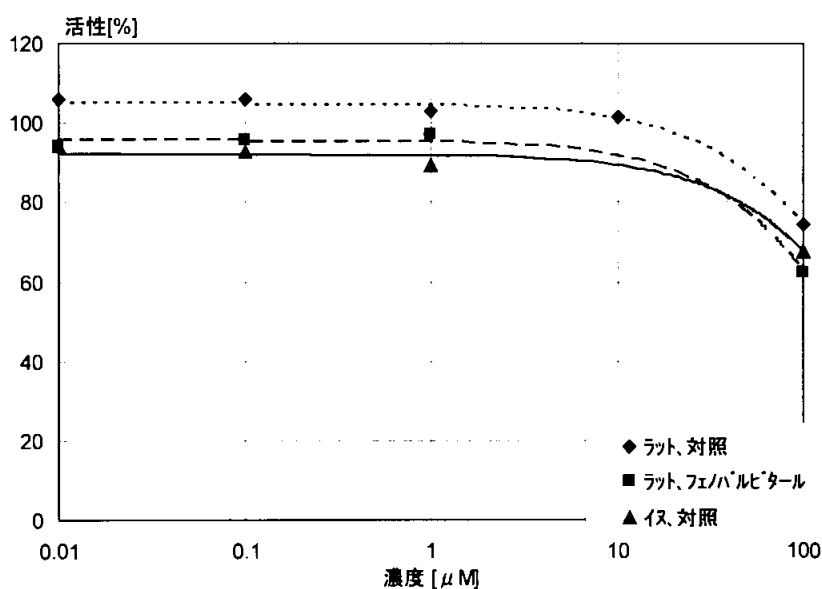
一方、検体は、ゲッ歯類のチトクローム P450 の各亜種に強い誘導を示すことから、1000ppm の検体を前処置したラットの肝臓を用いてテストステロンの水酸化を調べた。雌ラットに検体を 0 または 1000ppm の濃度で 2 週間混餌投与し、投与終了後全動物から摘出した肝臓の肝マイクロソームを用いた。

【試験結果】

1) 7-エトキシマリンドエチラーゼ (ECOD)

図 1 に示すように、検体は、用いたマイクロソーム試料において極めて弱い阻害を示した。いずれの動物種でも検体濃度 100 μ M では、50%阻害率を得ることはできなかった ($IC_{50} > 100\mu$ M)。

図 1. チアクロプリドの肝マイクロソームの 7-エトキシマリンドエチラーゼ活性に対する阻害能



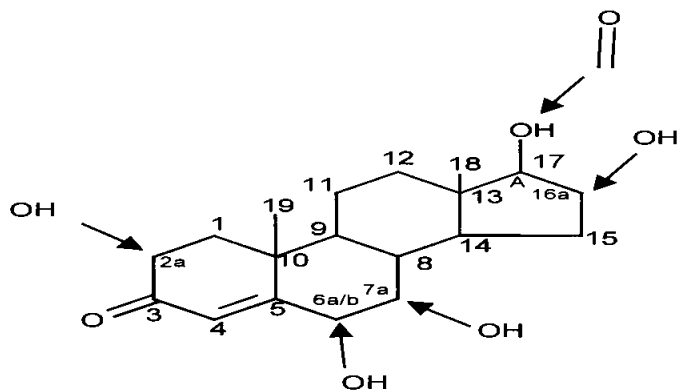
2) テストステロンの水酸化

肝マイクロソームにおけるテストステロンの主要な水酸化と酸化反応系及びテストステロン代謝における水酸化反応とチトクローム P450 の亜種との関連性を図 2 に示した。

テストステロンの水酸化に対する検体による阻害の測定より、 16α 、 2α 、 6β 及び 7α 水酸化ならびにアンドロステンジオンへの酸化反応のいずれも阻害を示さなかった (図 3)。検体の 50%阻害濃度は、いずれの反応でも $IC_{50} > 1000\mu$ M であった。したがって、検体にはステロイド基質の水酸化に対する阻害能は認められなかった。

図2. 肝ミクロソームにおける主要な水酸化反応及び酸化反応

テストステロンの水酸化
Hydroxylation of Testosterone



テストステロン代謝/水酸化反応とチトクローム P450 の亜種との関連性

Correlation of hydroxylation reactions and cytochrome P450 subtypes

Testosterone Metabolism

Metabolites	CYP
2 α	2 C 11
2 β	
6 α	2 A 1
6 β	3 A 3, 3 A 5, 3 A 4 (human), (1 A 1, 2 C 13)
7 α	2 A 1
11 β	
15 α	2 C 13
16 α	2 B 1, 2 C 11, 2 C 13
16 β	2 B 1
18	
19	
A	2 B 1, 2 C 11, 3 A 2

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。

図3. チアクロプリドのテストステロン代謝の阻害能 (in vitro)

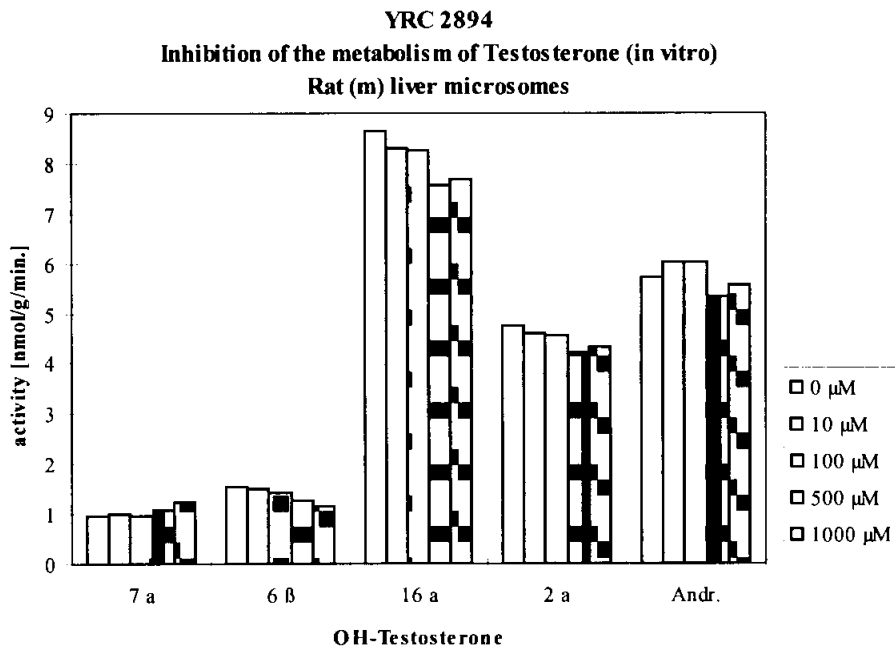
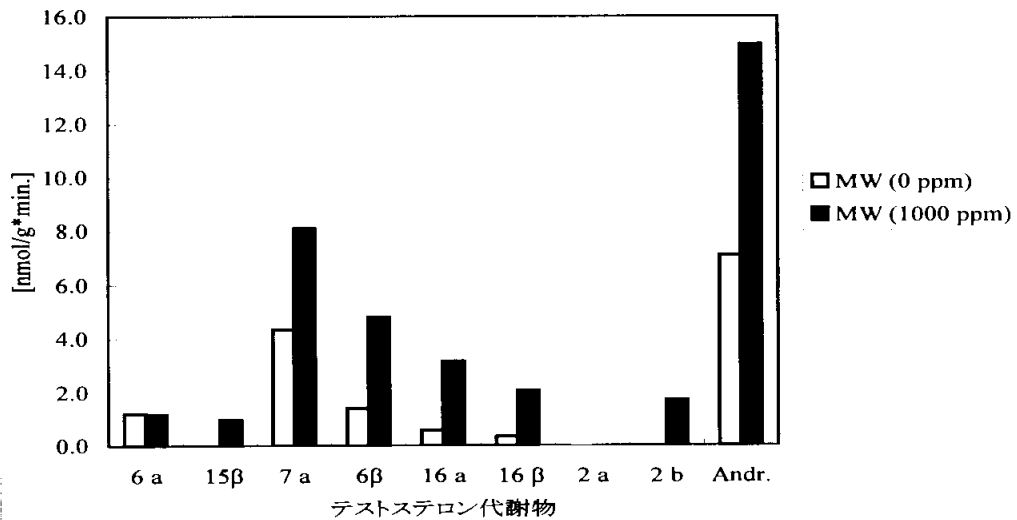


図4. チアクロプリド投与後のテストステロン代謝物の反応性



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

一方、検体は、ゲッ菌類のチトクローム P450 の各亜種に強い誘導を示すことから、1000ppm の検体を前処置したラットの肝臓を用いてテストステロンの水酸化を調べた。

その結果、テストステロン代謝に強い亢進が認められた(図 4)。

以上、チトクローム P450 依存性モノオキシゲナーゼに対する検体の阻害能について調べた結果、本剤は、ラット及びイヌの肝ミクロソームの7-エトキシマリンドエチラーゼ(ECOD)に対して、弱い阻害($IC_{50} > 100 \mu M$)を示した。またラット肝臓におけるテストステロンの代謝阻害に対して、本剤の影響($IC_{50} > 1000 \mu M$)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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(1-3) チアクロプリドならびに関連代謝物による *in vitro* 甲状腺ペルオキシダーゼ触媒反応の阻害に関する試験 (資料No. 原体-9-3)

試験機関：

報告書作成年月日： 1994年11月24日

検体の純度 : 97.2%

試験系 : ブタの可溶化マイクロソーム

【目的】

ラットを用いた亜急性毒性試験 (毒性資料No.26 の予備試験の追加試験) から、検体が甲状腺ホルモン量や甲状腺機能に影響を及ぼすかもしれない幾つかの証拠 (肝臓での酵素誘導、コレステロール値の上昇、最高用量群の1例で甲状腺濾胞細胞の有糸分裂像) が見つかった。二次的影響 (肝 UDP-グルクロニルトランスフェラーゼの誘導) の他に、検体が環状構造に部分的にチオウレア骨格 (ラクチム型) を有していることから、甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO) への直接的影響が考えられた。多くのチオウレア誘導体は、既知の甲状腺刺激作用を有し、また TPO と相互に作用することが知られている。

そこで今回、TPO への検体の作用を調査するため、また TPO との相互作用におけるチオウレア ラクチム型の遊離チオール基の持つ機能の役割について明らかにする目的で、検体ならびに各チオウレア ラクチム型誘導体について、ブタ甲状腺マイクロソームを用いた *in vitro* 条件下における TPO 触媒反応試験を行った。さらに、検体からの代謝物 (加水分解産物であるシアナミドを含む)、ならびに検体投与ラットより採取した血漿について、それらの TPO 阻害特性について試験を行った。

【試験項目及び結果】

- 1 *in vitro* 条件下、検体、3種のチオウレア誘導体 (プロピルチオウラシル、メルカプトベンゾイミダゾール、メチルメルカプトベンゾイミダゾール) 及びシアナミドの TPO 触媒反応に対する影響

1-1 TPO 触媒反応によるグアヤコール酸化及びヨウ素体生成の解析

グアヤコール酸化は、ペルオキシダーゼ活性の指標として用いた。反応は、室温、pH 7.4、0.1 M リン酸カリウム緩衝液中にて、全量 1.0mL の条件で実施し、グアヤコール (5mM)、TPO (グアヤコール酸化法による触媒活性値 0.1ΔE/min.) 及び検体を、1分間のプレインキュベーション後、過酸化水素 (200μM) を添加して反応を開始した。検体は DMSO 40μL に添加し、さらに検体を含まない対照反応では、同容量の溶媒を入れた。470nm での吸収の初期の直線的な増加を、ペルオキシダーゼ活性の算出に用いた。

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。

グアヤコールをヨウ化カリウム (10mM) に、また過酸化水素の濃度をプレインキュベーション後 150 μ M に置き換えて、上記条件で反応を実施した。350nm での吸収の初期の直線的な増加を、ペルオキシダーゼ活性の算出に用いた。

S-アルキル化チオウレア ラクチム型誘導体と考えられる検体は、TPO 触媒グアヤコール酸化もまたヨウ化物からの TPO 触媒下におけるヨウ素体生成も阻害しなかった。この結果は、検体がそれ自身酵素を阻害しないこと、ヨウ素中間体 (TPO 低ヨウ素酸複合体) も捕捉しないことを表わしている。一方、陽性対照化合物である 2-メルカプトベンゾイミダゾールと 2-メチルメルカプトベンゾイミダゾールを用いた試験では、チオウレアラクチム型誘導体の S-アルキル化が、その化合物の持つ TPO 阻害特性を強く抑制もしくは消失させることを示唆した。

TPO 触媒グアヤコール酸化における IC₅₀ 値及び TPO 触媒によるヨウ素体生成に関する IC₅₀ 値は、下表に要約した。

化合物	甲状腺ペルオキシダーゼ - IC ₅₀ (μ M)	
	ヨウ素体生成	グアヤコール酸化
チアクロプリド	>> 870	>> 870
プロピルチオウラシル	-	2.7
2-メルカプトベンゾイミダゾール	-	4.2
2-メチルメルカプトベンゾイミダゾール	250	>> 1000
シアナミド	1.1	7.7

これらの所見は、検体が TPO 触媒反応に直接作用をもたないことを示した。

1-2 チアクロプリド加水分解物と代謝物の TPO 触媒反応に対する影響

加水分解による検体由来のシアナミドあるいは他の阻害物質の産生を検索するために、検体を 50 $^{\circ}$ C で 20~45 時間インキュベーションした。

加水分解処理した検体の TPO 触媒によるグアヤコール酸化反応は無処理の検体のそれとほぼ同程度のものではあった (下表)。

濃度 (μ M)	インキュベーション時間 (h)	活性 (% of control)
-	-	100
870	0	76
870	20	69
870	45	73

2. *in vivo* 条件下、チアクロプリド由来 TPO 阻害代謝物の産生についての検索

検体の代謝過程における TPO 阻害物質の産生を検索するために、検体の非投与ならびに投与ラット（2000ppm を 14 日間摂餌）からの血漿を酢酸エチルで抽出し、抽出物の TPO 触媒によるヨウ素体生成への影響を調べた。この反応系は、酵素及びヨウ素中間体への両方の影響を調べることができることから、このヨウ素体生成反応系を試験指標として選択した。

測定値の平均値は、全ての群でほぼ同程度であり、検体の非投与ならびに投与ラットから得られた抽出物に TPO 阻害物質は検出されなかった。このことは、検体の代謝物に阻害物の産生が認められなかったことを示している。

用量(ppm)	動物数	性	IC ₅₀ 値 (%)
0	5	雄	34±2
2000	5	雄	32±6
0	5	雌	39±7
2000	5	雌	27±8

以上の結果は、検体やその代謝産物が TPO 触媒反応に対して直接的な阻害作用を有していないことを示した。また、TPO 阻害物質になると考えられる加水分解物もしくは代謝物の産生は明らかに認められなかった。また別試験（亜急性毒性試験の予備試験）での高用量群（120mg/kg あるいは 2000ppm の 2 週間投与）のラットで、UDP-GT 活性が増加したことを報告[#]し、検体がこの酵素活性の強力な誘導物質であるとの特性を示した。

従って、本剤の甲状腺への作用は、グルクロン酸抱合の増加に伴うチロキシンの代謝的分解が、甲状腺刺激へのメカニズムであり、甲状腺ホルモン合成に対する本剤の直接的な作用ではないことが確認された。

・ YRC2894 ラットを用いた予備試験（2 週間強制経口投与による亜急性毒性試験）

Report No. 23861（試験番号：T405536）、1995 年 3 月 22 日、

・ YRC2894 ラットを用いた亜急性経口毒性試験（2 週間混餌投与試験）

Report No. 25720（試験番号：T6058111）、1996 年 12 月 9 日、

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。

(1-4) チアクロプリドのラットを用いた3週間混餌投与試験 (資料No. 原体-9-4)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：2000年3月14日

検体の純度：96.8%

試験動物：ウィスター系ラット、1群雌雄各10匹

試験開始時；雄 6週齢(165~191g) 雌 6週齢(122~147g)

試験期間：3週間(2000年1月19日~2000年2月14日)

【目的】

本試験の目的は、検体の投与初期における甲状腺機能に及ぼす影響を再確認することである。すなわち、検体0、25、100、400及び1600ppmの投与用量で実施したラット亜急性経口毒性試験(資料No. 原体-9)において、トリヨードチロニン(T3)やチロキシシン(T4)等の甲状腺機能に関連する項目の検査結果に、いくつかの統計学的に有意な変動が検体投与後3週の測定時から認められた。これらは、検体による肝薬物代謝酵素の誘導に関連する一連の変動と考えられたが、特に検体の投与初期におけるこれらの変動を再度確認し、機序の解明に供する。

【投与方法】

検体を、0(対照群)、25、100、400及び1600ppmの濃度で飼料(1%のピーナッツ油添加)に混入し、3週間にわたって摂食させた。検体を混入した飼料は週毎に調製した。

投与用量及び試験期間の設定根拠；

投与用量は、ラット亜急性経口毒性試験(資料No. 原体-9)で使用した用量(0、25、100、400及び1600ppm)と同一とした。

この試験では、検体投与後3週時の測定において、雄の25ppm以上でトリヨードチロニン(T3)、400ppm以上でチロキシシン(T4)及び1600ppmでチロキシシン結合能(TBC)の増加がそれぞれ認められた。また雌の100ppmでT4と400ppm以上の群でTBCの増加が認められた。一方、12週時では、雄の25ppm以上でTBCと1600ppmでT3の増加が認められた。これらのことから、この試験で認められたT3、T4等の変動と投与用

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。

量との関連性を再度確認するため、上記の用量を設定した。

なお、この確認試験は、低用量での変動が検体投与後3週時でみられていることから、試験期間は3週間と設定した。

【試験項目及び結果】

1) 臨床症状及び死亡率

臨床症状及び生死を少なくとも1日2回（週末と休日は1回）観察した。個体別の詳細な観察として例えば体表、天然孔、姿勢、一般行動、呼吸及び排泄などについて週1回実施した。

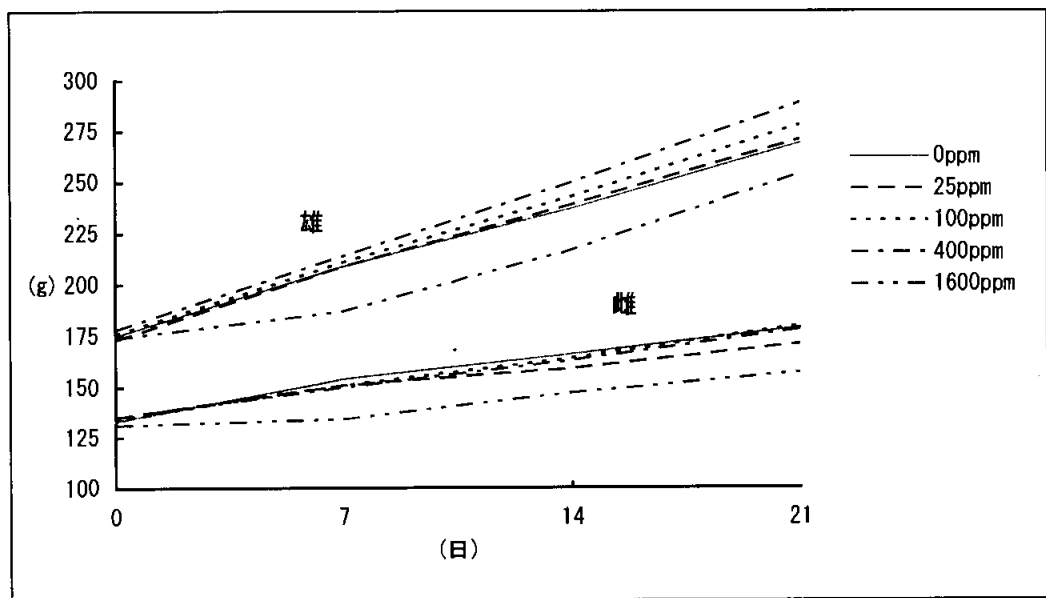
その結果、1600ppmの雌群の1例に2及び3週時に水様状の便排泄がみられた以外、何らの症状も認められなかった。また試験期間中に死亡例は認められなかった。

2) 体重(図1)

投与開始前とその後週1回3週時まですべての動物の体重を測定し、その結果を図1に示した。

1600ppm群は、対照群に比し雄14.9%、雌43.5%の体重増加抑制を示し、統計学的に有意であった。400ppm以下の用量群で体重増加に検体投与の影響は認められなかった。

図1 体重曲線



3) 摂餌量及び検体摂取量 (表 1)

全動物の摂餌量を週 1 回 個体毎に測定した。

1600ppm の雄群で、摂餌量の低下が投与 1 週で認められたが、他の用量群では検体に起因する変動は認められなかった。

検体摂取量は、表 1 に示した。

表 1 検体摂取量 (mg/kg/日)

投与用量 (ppm)		0	25	100	400	1600
検体摂取量	雄	—	2.6	9.0	36.9	145.1
	雌	—	3.1	12.3	44.6	190.8

4) 臨床検査

トリヨードチロニン、(総)チロキシン、チロキシン結合能 (TBC)、甲状腺刺激ホルモン (TSH) 及び蛋白量の検査は、ヘパリン加血漿を検査試料として用いた。採血は、ジエチルエーテルにより深部麻酔した動物の後方眼窩静脈叢 (2、7、14 日目) または心臓穿刺 (21/22 日目) により定めた時間に行った。

肝 UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ (UDP-GT) は、剖検時に採取した肝試料を用いて測定した。

表 2 に甲状腺関連項目の検査結果を統計学的な有意差の表示で記した。また表 3 に T3、T4 及び TSH について、投与前値に対する投与後の各測定時での平均値を比較し、相対的な結果として示し、図 2 にその変動の推移を示した。さらに血漿蛋白及び UDP-GT の測定値を表 4 及び表 5 に示した。

① 甲状腺関連項目の測定 (表 2、表 3)

T3 において、1600ppm 雌雄群では投与 2 日後に有意に減少したが、その後対照群と同等かむしろ増加傾向の T3 値を示し、投与後 21 日の値は雌雄とも対照群の値を上回っていた。この変動は、投与 7 日からみられた TSH の増加または増加傾向と極めてよく関連していた。また、400ppm 及び 100ppm の雌群の T3 は投与後 7 日と 22 日 (最終時) に増加したが、400ppm の 7 日後においては TSH の増加傾向がみられ、検体投与との関連性が窺われた。しかし、100ppm 群での両測定日や 400ppm 群の 22 日後でみられた T3 の増加は、TSH の変動を伴ってはいなかったことから検体投与との関連性は否定できると思われた。

一方、TBC 値は、1600ppm においては投与後半の 14、21 日後に有意な増加又は増加傾向を示し、検体に投与に関連する変動と窺われた。400ppm 以下の群には有意な変動は認められなかった。

T4 では、1600ppm 雄群では試験期間中減少あるいは減少傾向、雌群では試験前

半に減少傾向をそれぞれ示し、T3の減少あるいはTSHの増加や後述のUDP-GTの誘導と関連した変動もみられたことから、T4の減少あるいは減少傾向はこの検体投与の影響と窺われた。

一方、TSHは、1600ppmの雌雄群及び400ppm雄群で投与7日以降有意な増加あるいは増加傾向が認められた。これらの変動は、投与前半のT3やT4の減少あるいは減少傾向、さらに試験終了時に甲状腺濾胞上皮細胞肥大がみられていることから検体投与との関連性が示唆された。またTSHの有意な増加は、100ppmの雄群でも投与14日目にみられたが、UDP-GTの誘導、T3やT4の減少さらに甲状腺濾胞上皮細胞肥大が認められなかったことから順応的な変動と考えられた(表2)。

表2 甲状腺関連項目の検査

性別	雄				雌			
	投与量(ppm)	25	100	400	1600	25	100	400
検査時期	投与前2日							
T3	100	104	106	100	96	100	104	99
T4	108	103	109	106	97	88	104	90
TBC	98	98	98	99	99	103	102	104
TSH	↑143	84	101	79	72	90	87	98
検査時期	投与後2日							
T3	100	107	109	↓84	93	105	103	↓73
T4	100	102	113	↓76	96	94	117	↓68
TBC	98	100	99	99	99	102	100	102
TSH	110	79	68	↓36	69	82	92	83
検査時期	投与後7日							
T3	101	99	99	96	101	↑110	↑111	99
T4	105	104	104	↓82	95	94	105	78
TBC	97	103	102	104	100	99	98	99
TSH	140	119	192	154	83	98	125	↑232
検査時期	投与後14日							
T3	106	103	106	97	96	100	111	↑111
T4	113	103	110	87	111	104	115	96
TBC	98	101	103	↑107	99	101	102	↑104
TSH	132	↑187	↑171	↑302	64	72	67	117
検査時期	投与後21日(雄)				22日(雌)			
T3	98	105	103	105	101	↑109	↑117	↑119
T4	100	98	99	↓79	110	121	↑119	82
TBC	99	102	101	103	98	102	99	↑105
TSH	183	172	164	208	84	77	87	↑264

↑↓: p<0.05, ↑↓: p<0.01 (U検定)

表中の数値は、対照群に対する変動率(%)

各測定時における平均値での比較においては、各時点での対照群内で著しいばらつきも認められたことから、検体投与との関連性は一部の用量で不明確であった。しかし、より意味のある関連性を得るために相対的な比較を試みた。

すなわち、T3、T4 及び TSH について、投与前の値（-2日目）に対する各測定時点での値との比較を行い、このデータを分散分析により解析した。

この相対的変動の比較（表3、図2、3）より、T3、T4 及び TSH の有意な変動は 1600ppm 群のみに認められた。T3 では、雌雄共に投与2日目に有意な低下がみられた（図2）。T4 では、雄で試験期間中、雌では投与2、7日及び22日目に低下を示した。TSH では、雄で投与14日目、雌では投与7日及び22日目にそれぞれ有意な増加が認められた（図3）。

表3 甲状腺関連項目の投与前値との比較による相対的変動（有意差のみられた項目）

性別	雄				雌				
	投与量 (ppm)	25	100	400	1600	25	100	400	1600
検査時期	投与後 2 日								
T3				↓					↓
T4				↓					↓
TSH									
検査時期	投与後 7 日								
T3									
T4				↓					↓
TSH									↑
検査時期	投与後 14 日								
T3									
T4				↓					
TSH				↑					
検査時期	投与後 21 日 22 日								
T3									
T4				↓					↓
TSH									↑

↑ ↓ : 95%信頼限界は同時に他のどの値の95%の信頼限界と僅かにもオーバーラップする
 ↑ ↓ : 95%信頼限界は同時に他のどの値の95%の信頼限界ともオーバーラップしない
 対照群（投与前2日測定値）に対する変動率から分散分析による最小二乗平均推定値で算出

【申請者追記】 甲状腺ホルモンについては直近の背景対照データを用いて分析し直し、以下の変動を投与による変化と判断した。日周性リズムを考慮して背景対照データの2s-範囲内の変動であれば投与に関連した変化とは考えなかった。

- ・ T3 および T4 : 1600ppm 群雌雄で減少傾向
- ・ TSH : 1600ppm 群雌雄で増加

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。

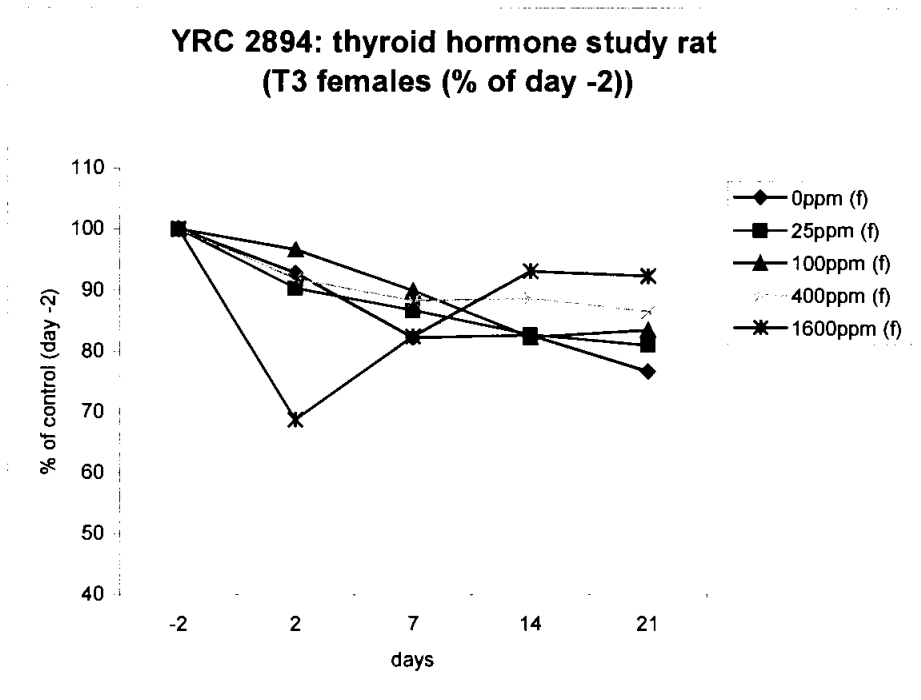
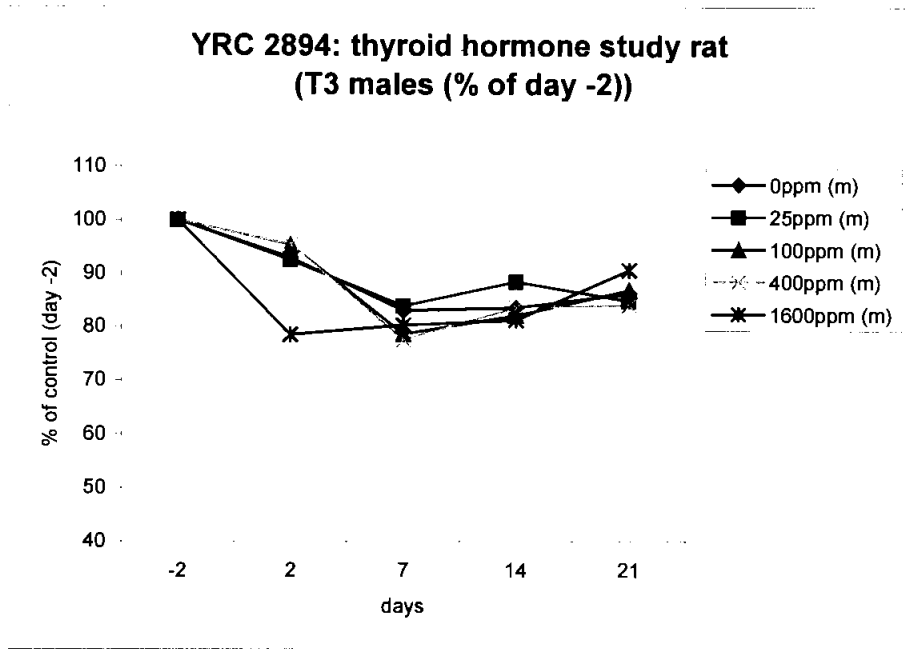
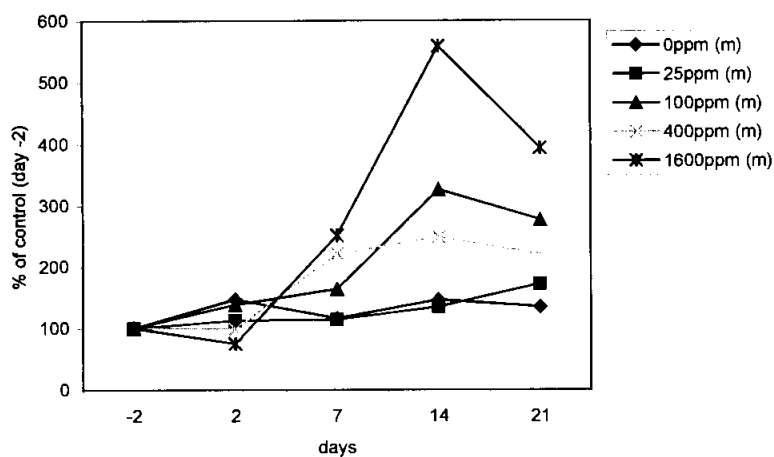


図 2. T3 の経時的推移

YRC 2894: thyroid hormone study rat
(TSH males (% of day -2))



YRC 2894: thyroid hormone study rat
(TSH females (% of day -2))

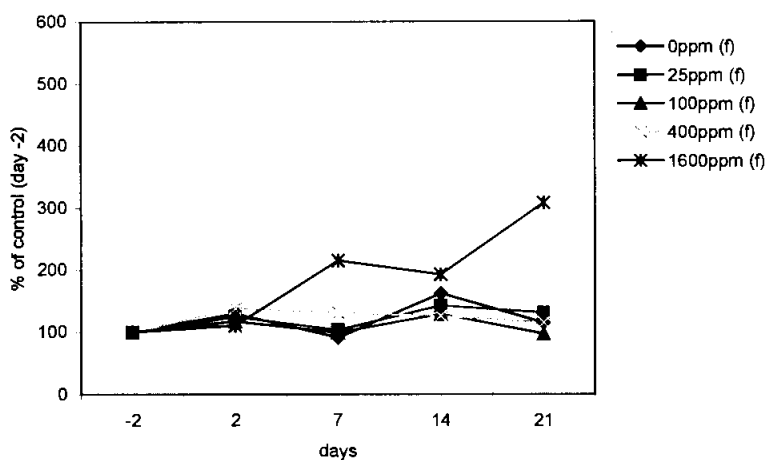


図 3. TSH の経時的推移

②血漿蛋白の測定（表4）

血漿蛋白の測定結果を表4に示した。

雄では、投与2日目の統計学的に有意な低下は、投与前（-2日目）と概ね同じ程度に見られ、投与に関連はないものと思われた。雌では、投与7日目に僅かな蛋白の低下みられた。投与終了時に1600ppmの雌雄群に、僅かな投与関連の増加が認められた。

表4 血漿蛋白測定（有意差のみられた項目）

性別	雄					雌				
	0ppm	25	100	400	1600	0ppm	25	100	400	1600
-2日		↓96	↓95		↓95					
2日		↓96		↓96	↓93					↓95
7日										↓91
14日										
21/22日					↑105					↑106

↑↓：p<0.05，↑↓：p<0.01（U検定）

表中の数値は、対照群に対する変動率（%）

③ UDP-GT の測定（表5）

UDP-GT の測定結果を表5に示した。

400ppm以上の雌雄群で、用量に相関した有意な増加が認められた。この酵素の誘導は、100ppm以下の群では認められなかった。

表5 UDP-GT の測定（有意差のみられた項目）

性別	雄					雌				
	0ppm	25	100	400	1600	0ppm	25	100	400	1600
21/22日				↑198	↑352				↑164	↑421

↑↓：p<0.05，↑↓：p<0.01（U検定）

表中の数値は、対照群に対する変動率（%）

5) 臓器重量（表6）

試験終了時、全生存動物を対照として、肝臓、甲状腺（左甲状腺葉）及び子宮の臓器重量を測定し、それらの対体重比も算出した。結果は、表6に示した。

高用量群において、肝臓の実重量及び対体重比の増加が見られた。雌における甲状腺重量の統計学的に有意な低下（400ppm以上の群における実重量、400ppm群における対体重比）は、片側の葉を測定したことによる技術的変動要因に加え、対体

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。

重比に用量相関性が認められなかったこと、病理組織学的検査において、甲状腺の機能亢進を伺わせる組織像（濾胞上皮細胞の肥大）が認められ、重量低下とは矛盾する所見と考えられたことから、投与に起因するものではないと思われた。

表6 臓器重量（有意差の認められた項目）

性別	雄					雌				
	0ppm	25	100	400	1600	0ppm	25	100	400	1600
	実重量									
体重										↓88
甲状腺									↓57	↓57
肝臓				↑114	↑133					↑123
	対体重比									
甲状腺									↓50	
肝臓					↑141					↑139

↑ ↓ : p<0.05 , ↑↓ : p<0.01 (U検定)

表中の数値は、対照群に対する変動率(%) 検体の影響と考えられる数値を下線で示した。

6) 剖検

動物の剖検はエーテルによる深麻酔下で放血後行った。肝臓、甲状腺及び子宮は、10%ホルマリン液で固定した。

1600ppm の雌雄群では、肝臓肥大が認められ、また雌群に明瞭な小葉像が認められた。400ppm 以下の雌雄群では、投与に起因する肉眼的変化は何ら認められなかった。

7) 病理組織学的検査（表7）

病理組織学的検査は、甲状腺のみについて行い、下表に認められた濾胞上皮細胞の肥大の出現頻度を示した。

表7 濾胞上皮細胞の肥大の出現頻度

用量 (ppm)	0	25	100	400	1600
雄	1	1	3	5	8**
雌	0	0	1	2	5*

* : p<0.05, ** : p<0.01 (Fisher 検定)

1600ppm の雌雄群でみられた有意な出現頻度の増加（雄： p<0.01, 雌： p<0.05）は、検体投与に起因したものと思われた。また 400ppm 雄群での出現頻度は、有意ではないものの UDP-GT の増加がみられていることから検体投与の影響が窺われた。他用

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。

量群における濾胞上皮細胞の肥大の出現頻度は、投与には関連なく、むしろ若齢動物にみられる自然発生所見と考えられた。

本試験において、1600ppm 群でみられた所見は、水様状の排泄異常（雌）、体重増加抑制、摂餌量の低下（雄）、T3 の減少、T4 の減少、TSH の増加、蛋白量の増加、UDP-GT の増加、肝重量の増加、肝の肉眼的変化そして濾胞上皮細胞肥大の出現頻度の増加であった。

400ppm 群では、UDP-GT の増加（雌雄）、肝重量の増加（雄）及び濾胞上皮細胞肥大の出現頻度の増加（雄）であった。

従って、本試験における無毒性量は、100ppm（雄 9.0mg/kg/日、雌 12.3mg/kg/日）であると判断した。

これらの得られた結果は、検体投与後 3 週までの甲状腺に関するホルモンの推移及び関連する肝酵素 特に肝 UDP-GT の誘導状況を明確にするものであった。すなわち、検体により誘起された肝酵素誘導に伴い、T3 及び T4 のいずれもが投与 2 日頃から減少し、14 日頃にはこの減少を補完すると考えられている TSH の増加が 21 日/22 日まで持続してみられていること、この変動は、最高用量 1600ppm で明らかであり、甲状腺濾胞上皮細胞肥大の出現頻度の増加との関連も含めその影響は否定できなかった。

以上のことから、本試験の所見は、検体により誘起された酵素誘導に伴う甲状腺ホルモンの代謝分解の亢進に関連するものとした既報告のラット亜急性経口毒性試験等の総括と相違するものではなかった。

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

(2) チアクロプリドのマウスを用いた飼料混入投与による亜急性経口毒性試験
(資料No. 原体-10)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1995年3月14日

検体の純度：98.6～98.7%

試験動物：B6C3F1系マウス、1群雌雄各10匹

試験開始時平均体重 雄22g、雌18g

試験期間：14週間(1994年4月27日～1994年8月5日)

【投与方法】

検体を、0(対照群)、50、250、1250及び6250ppmの濃度で飼料(1%のピーナツ油添加)に混入し、14週間にわたって摂食させた。検体を混入した飼料は週毎に調製した。

投与用量設定の根拠：

バイエル社でB6C3F1系マウスを用い、0(対照群)、100、1000及び10000ppmの用量で実施した、予備試験(資料No. 原体-10に添付)結果に基づいて設定した。この試験では、10000ppm群の雄で体重増加抑制がみられた。また1000及び10000ppm群の雌雄で肝臓重量増加が、そして10000ppm群の雄ではそれに伴って肝臓の肥大が観察された。

この試験の結果に基づいて、本試験の投与用量を上記のように設定した。

【試験項目及び結果】

1) 臨床症状及び死亡率

臨床症状及び生死を少なくとも1日2回(週末と休日は1回)観察した。個体別の精査は週1回実施した。

その結果、体表面と天然孔、一般行動、姿勢、呼吸及び排泄物に関していずれの投与群にも異常所見は認められなかった。

試験途中に1匹の動物(対照群の雌)が死亡した。別の1匹(1250ppm群の雄)は瀕死状態であったため屠殺した。7匹の動物(0ppm群の雄2匹、250ppm群の雄1匹、6250ppm群の雄2匹、50ppm群の雌1匹、250ppm群の雌1匹)は血液採取のために死亡した。

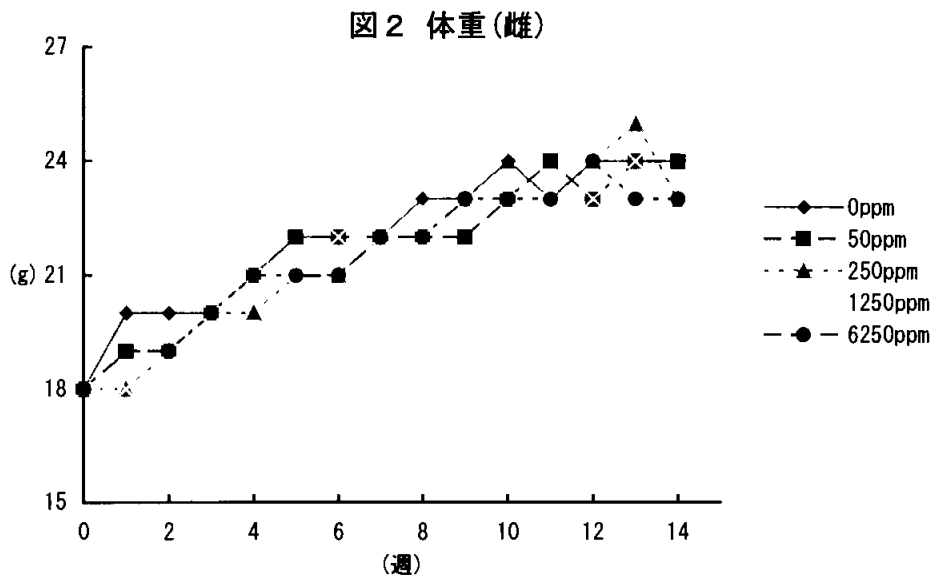
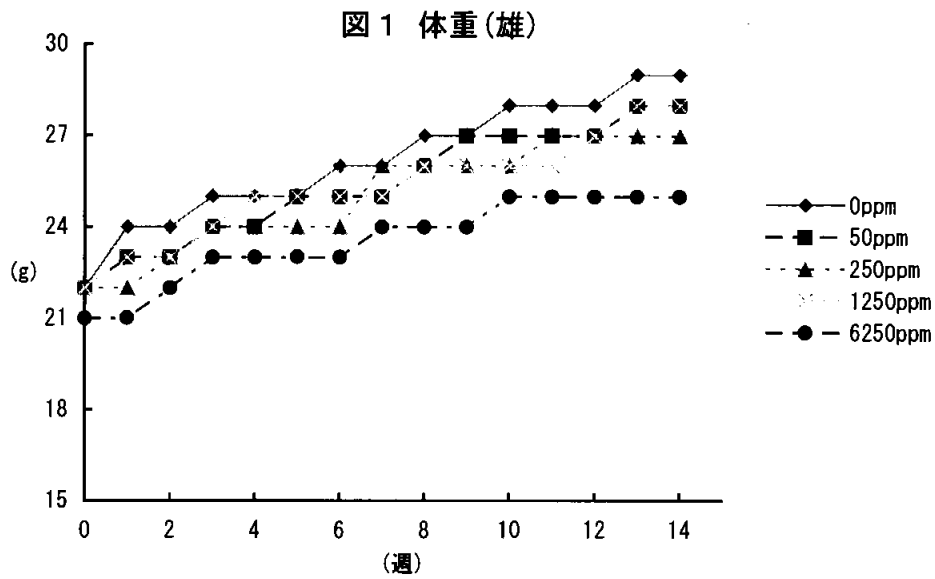
投与に起因する死亡は認められなかった。

2) 体重 (図 1, 図 2)

投与開始前とその後週 1 回 14 週時まですべての生存動物の体重を測定した。

雌の全投与群、雄の 1250ppm 以下の群は、対照群の体重と同様な増加を示した。

雄の 6250ppm 群では、対照群に比べ有意な体重増加抑制が認められた (対照群との差; 14%以内)。



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。

3) 摂餌量及び検体摂取量

全動物の摂餌量を週 1 回個体毎に測定した。

雄の 250ppm 以下の投与群及び雌の全投与群には、摂餌量で対照群との差はなかった。

雄の 1250 及び 6250ppm 群では、各個体の摂餌量が軽度増加し、飼料効率が低下した。

検体摂取量は、次の表 1 に示した。

表 1 検体摂取量 (mg/kg/日)

投与用量 (ppm)		0	50	250	1250	6250
検体摂取量	雄	—	19.9	102.6	542.4	2819.9
	雌	—	27.2	139.1	704.3	3351.0

4) 飲水量

飲水量を週 1 回個体毎に測定した。

1250ppm 以下の投与群では、雌雄共に対照群と同等であった。6250ppm 群では雄 (13 週) に 30% 以下、雌 (11 週) に 12% 以下の平均飲水量の低下が認められた。雌に認められたこの軽度な低下は、他に関連する影響が観察されなかったため、毒性学的に意味のある変化とは考えられなかった。また雄の 6250ppm 群の飲水量低下は、生理学的なストレスに対する非特異的な反応ではないかと考えられた (臓器重量及び病理の項参照)。

5) 臨床検査

全群の全動物から得た血液サンプルについて、血液学的検査を投与 12 週時に、臨床化学的検査を投与 13 週時に実施した。

5-1) 血液学的検査

エーテル麻酔下で、非絶食の動物の眼窩静脈叢から採取した血液を用い、以下の項目について測定又は算定した。また赤血球形態についても観察した。

白血球百分率、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、白血球数、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球容積 (MCV)、血小板数、トロンボプラスチン時間

表 2 に統計学的に有意差の認められた項目を示した。

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。

赤血球数及び赤血球関連パラメーター値において、雄 250ppm 群以下及び雌 1250ppm 群以下では、対照群と差は認められなかった。雄 1250ppm 群及び雌雄 6250ppm 群では軽微だが統計学的に有意なヘマトクリット値の低下が認められ、検体による肝機能の低下に派生した変化であると考えられた。その他の統計学的に有意な変化は、それらに用量関連性が見られなかったこと、あるいは各個体の値が $\pm 2s$ 範囲内にあったことから、投与との関連はないと考えられる。

雌雄のいずれの投与群においても、赤血球形態に対照群との差は認められなかった。

雌全投与群及び雄 1250ppm 群以下では、白血球数及び白血球百分率において異常は認められなかった。雄 6250ppm 群では、対照群と比較して核陰影 (nuclei shadows) が顕著に減少した。一般に、不安定なリンパ球の増加が病理学的に問題であると考えられるため、この所見に毒性学的な意義を見出すことはできなかった。その他の統計学的に有意であった所見も、毒性学的意義は認められなかった。

血液凝固能を調べるためのパラメーター (血小板数、トロンボプラスチン時間) には、毒性学的に問題となる影響は認められなかった。

表 2 血液学的検査 (有意差の認められた項目)

性別	雄				雌			
	50	250	1250	6250	50	250	1250	6250
投与量 (ppm)	50	250	1250	6250	50	250	1250	6250
検査時期	12 週				12 週			
ヘモグロビン			↓ 97					
ヘマトクリット			↓ 96	↓ 96				↓ 97
MCV		↓ 98	↓ 98	↓ 98		↓ 98	↓ 98	↓ 98
MCH		↓ 97						
血小板数				↑ 110				
トロンボプラスチン時間	↓ 93	↓ 94						
白血球百分率								
/リンパ球					↓ 91			↓ 92
/分葉核好中球					↑ 145			↑ 141
/核陰影				↓ 64				

↑ ↓ : $p < 0.05$, ↑ ↓ : $p < 0.01$ (U-検定)

表中の数値は、対照群に対する変動率 (%)

5-2) 血液生化学的検査

以下の項目について測定を行った。

アルカリホスファターゼ (APh)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALAT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ASAT)、グルコース、総ビリルビン、

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

クレアチニン、アルブミン、コレステロール、総蛋白、尿素、トリグリセリド

なおこれら項目のうち、グルコースは無麻酔下、非絶食の動物の尾静脈から採血し除蛋白処理した全血を用い測定した。その他の項目の測定には、エーテル麻酔下で、非絶食のマウスの後部眼窩静脈叢から採血した末梢血の血漿を用いて行った。

表3に統計学的に有意差の認められた項目を示した。

表3 血液生化学的検査（有意差の認められた項目）

性別	雄				雌			
	50	250	1250	6250	50	250	1250	6250
投与量 (ppm)	50	250	1250	6250	50	250	1250	6250
検査時期	13 週				13 週			
ASAT	↓ 79							
Aph				↑ 116	↓ 86		↓ 88	
グルコース	↑ 110	↑ 111						
コレステロール				↓ 70		↓ 92	↓ 92	↓ 77
トリグリセリド				↑ 161				
クレアチニン						↓ 79	↓ 85	
総ビリルビン			↓ 72	↓ 50			↓ 68	↓ 55
総蛋白					↓ 95	↓ 95	↓ 96	↓ 94
アルブミン								↓ 91

↑ ↓ : p<0.05, ↑ ↓ : p<0.01 (U 検定)

表中の数値は、対照群に対する変動率 (%), 検体の影響と考えられる数値を下線で示した。

ASAT、ALAT、Aph の測定結果には、雌雄のいずれの投与群においても毒性学的に問題となる変化は認められなかった。統計学的に有意と判定された差には用量関連性が認められないため、それらは偶発所見と考えられる。

クレアチニンと尿素値については、いずれの投与群においても毒性学的に問題となる変化は認められなかった。統計学的に有意と判定された平均クレアチニン値（雌）には用量関連性が見られず、各個体の値も±2s 範囲内(14~35μmol/L)にあった。

グルコース、コレステロール及びトリグリセリド濃度を測定した結果、1250ppm 以下では、雌雄共に毒性学的に問題となる対照群との差は認められなかった。雌において、250 及び 1250ppm 群で平均コレステロール値に統計学的に有意な低下がみられたが、各個体の値が±2s 範囲内(雌;1.94~3.13mmol/L)にあったため、問題となる変化とは考えられなかった。6250ppm 群では、コレステロール値が雌雄共に明らかに減少し、トリグリセリド値が雄で増加した。

血漿ビリルビン濃度に、250ppm 以下の群では、雌雄共に投与に関連する変化は認められなかった。1250 及び 6250ppm 群では、平均ビリルビン濃度が雌雄において有意かつ用量に依存して低下した。雄全投与群及び雌 1250ppm 以下の群では、

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

蛋白及びアルブミン濃度に投与に関連した変化は認められなかった。平均蛋白濃度は、雌の 50、250 及び 1250ppm 群で有意な低下が認められたが、投与群の個体別値 (50ppm 群の 1 例を除く) が正常範囲内 (48.9~66.0g/L) にあり、加えて対照群における値が相対的に高かったため、生物学的に問題のある変化であるとは考えられなかった。雌 6250ppm 群では、軽度に低い血漿蛋白及びアルブミン濃度が認められた。

6) 肝臓ミクロソームを用いた薬物代謝酵素測定

剖検時に肝臓のサンプルを全動物から採取しホモジネート後、 -15°C 以下に凍結した。そのミクロソーム中の N-デメチラーゼ (N-DEM: 基質/アミノピリン) とチトクローム P450 (P450) の活性を測定した。

表 4 に統計学的に有意差の認められた項目を示した。

肝臓組織中の N-デメチラーゼ活性は、雄の 250ppm 以上の群、雌の 1250ppm 以上の群で有意かつ用量に関連して増加した。P450 量では雌雄の 1250 ppm 以上の群で同様の増加を示した。250ppm 雌群に認められた有意な差は軽微ながら、検体の影響が窺われた。

表 4 肝薬物代謝酵素の測定 (有意差の認められた項目)

性別	雄				雌			
	50	250	1250	6250	50	250	1250	6250
投与量 (ppm)								
N-DEM		↑134	↑180	↑211	↓78		↑147	↑130
P450			↑162	↑249		↑111	↑159	↑236

↑↓: $p < 0.05$, ↑↓: $p < 0.01$ (U 検定)

表中の数値は、対照群に対する変動率 (%), 検体の影響と考えられる数値を下線で示した。

7) 臓器重量

試験終了時、全生存動物を対照として、脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、卵巣の臓器重量を測定し、それらの対体重比も算出した。

表 5 に統計学的に有意差の認められた項目を示した。

対照群と比較した時、脳、副腎、脾臓、精巣及び卵巣の実重量と体重比重量には、いずれの投与動物においても、投与に関連すると思われる差は認められなかった。いくつかの平均値に認められた有意差は、用量との関連が見られない (脳実重量; 雄の 1250ppm 群) か、体重増加抑制に起因する (精巣実重量; 雄の 6250ppm 群, 脾臓; 雄の 6250 及び 50ppm) と考えられるものであった。また、心臓実重量では、雄の 6250ppm 群で体重増加抑制に起因する有意な低下が認められ、体重比重量では、

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

雌の 6250ppm 群で有意に増加した。この雌の増加は 1 例が高値を示したためであり、肉眼的及び病理組織学的検査において異常は認められなかった。また、雄の 250ppm 以上の群には腎臓実重量の有意な低下が認められたが、この低下は主に体重差に起因するものであった。肝臓実重量は、雄では 6250ppm 群で、雌では 1250ppm 及び 6250ppm 群で有意に増加した。また肝臓体重比重量は、1250ppm 及び 6250ppm 群で雌雄共に有意に増加した。この変化は、病理組織学的に、肝細胞肥大と呼応していた。他の有意差の認められた平均値は、用量関連性を欠いていたため毒性的に意義がないと考えられた。

表 5 臓器重量 (有意差の認められた項目)

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		50	250	1250	6250	50	250	1250	6250
体重		↓ 93			↓ 87				
脳	実重量			↓ 96					
	対体重比				↑ 113				
心臓	実重量				↓ 87				
	対体重比								↑ 112
肝臓	実重量	↓ 90	↓ 90		↑ 119			↑ 108	↑ 140
	対体重比			↑ 109	↑ 139			↑ 110	↑ 142
脾臓	実重量	↓ 89			↓ 85				
腎臓	実重量		↓ 88	↓ 86	↓ 80			↓ 94	
	対体重比			↓ 91			↓ 94	↓ 95	
精巣	実重量				↓ 93	/	/	/	/
	対体重比				↑ 108	/	/	/	/

↑ ↓ : p<0.05, ↑ ↓ : p<0.01 (U 検定)

表中の数値は、対照群に対する変動率 (%), 検体の影響と考えられる数値を下線で示した。

8) 剖検

試験終了時に、全生存動物をエーテル麻酔下で放血致死させ剖検した。試験途中に死亡した動物及び瀕死動物についても剖検した。

試験途中の死亡及び瀕死動物、また試験終了時に屠殺した動物に検体に起因するような所見は認められなかった。

9) 病理組織学的検査

以下の臓器について鏡検した。

- ・ 肝臓、腎臓、副腎 - 全用量群
- ・ 卵巣、卵管、子宮、膣 - 雌全用量群
- ・ 甲状腺、下垂体、精巣上体、精巣 - 0、6250ppm 群

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。

・肉眼的に異常の認められた臓器

更に雌の 0 及び 6250ppm 群の下垂体について、プロラクチン検出のため免疫組織学的検査を行った。主要な病理組織学的所見は表 6 に示した。

死亡動物の群間での分布状況は、検体の用量とは関連がなかった。大部分の動物の場合、死亡には採血との明らかな関連があった。投与後 8 1 日に死亡した 1 例（対照群 雌）では、腎臓に重度の糸球体アミロイド症が認められた。投与後 8 6 日に殺処分した動物（1250ppm 群 雄）では、一方のハーダー氏腺に重度の外傷性変化が認められ、この動物の不良な健康状態には、眼窩後部からの採血も起因していると考えられた。

最終屠殺動物については、以下の所見が認められた。

250ppm 以上を投与した群の雄及び 1250ppm 以上を投与した群の雌では、肝細胞肥大の発生頻度が増加した。また、この所見の程度も用量依存性に上昇した。大部分の例では、肝細胞肥大は小葉中心性に認められたが、高用量群の 2、3 例の雌動物では、それはよりびまん性に観察された。肝細胞の細胞質は正常ではグリコーゲンの貯留のために不透明感があるが、肥大した肝細胞はより無構造に見えた。異物に対する肝細胞の適応性の反応としてしばしば認められる滑面小胞体の増加によって生じたものと考えられた。この所見にはアポトーシス、壊死あるいはクッパー細胞の限局性増殖といったような変性変化は伴わなかった。

雄マウスの腎臓では、1250ppm 以上の群に近位尿細管の上皮に空胞の減少ないしは消失が認められた。これらの空胞は、今回用いた系統（B6C3F1 系）の成熟雄マウスに正常で認められる。雄腎臓で観察された投与に関連する空胞の減少は、バイエル毒性研究所で B6C3F1 を用いてこれまでに行われた多くの試験（出現頻度／亜急性毒性試験：90～100％）で観察されてきた。化学構造相関をもたないいろいろな種類の異物で処理した時に、高用量群でこの空胞の減少が認められていることから、これは投与に対する非特異的反応であると考えられた。

雌の副腎で X 帯空胞化域の拡張の程度に用量関連性の変化が認められた。この副腎皮質の最深部における空胞化域の拡張の程度は、対照群のほとんどで軽微から軽度であった。50ppm 以上の群では、この X 帯空胞化域の拡張は肥大し、また、雌の 1250ppm 以上の群では、この変化は重度あるいは極めて重度と評価された。雌では、最初の妊娠まで存在し、非妊娠雌ではその遺伝的なバックグラウンドに依存して、成熟後に消失することが知られている。Swiss albino マウスで調べた結果、X 帯の形成及び消失は、下垂体や性腺機能の影響をうけていることがわかっている。雄の場合、性成熟に達すると X 帯は消失するため、この変化は認められなかった。

卵巣では、好塩基性黄体（幼若黄体）と胞状卵胞に各用量間で差は認められな

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。

った。しかし、1250ppm以上の群では好酸性黄体（成熟黄体）量があきらかに減少した。更に、間質腺の活性化が認められた。後者の所見は、1250ppm群の雌2匹と6250ppm群の雌全例で観察された。これらの腺はほとんど胞状卵胞に由来しており、性腺刺激ホルモンの刺激に反応しているが、これらの機能の意義については知られていない。

乳腺、卵管、子宮及び膣では検体投与に起因した変化は認められなかった。

卵管中の排卵前の胞状卵胞及び卵母細胞の存在は、性周期に依存しており、その性周期は、膣上皮を調べることによって決定した。性周期に関しては、6250ppmを含む全ての群で検体投与に関連した変化は認められなかった。

下垂体前葉において、免疫組織学的にプロラクチンを調べた結果、6250ppmの雌と対照群の雌の間に差は認められなかった。

副腎と卵巣は複雑な内分泌調節機構に依存しているので、検体が雌の副腎及び卵巣形態にどのように影響しているかについては別に考察する。

本試験において、6250ppm群で増体重抑制（雄）、ヘマトクリット値の低下（雌）、コレステロールの減少（雌雄）、トリグリセリドの増加（雄）、総蛋白量とアルブミン量の減少（雌）、1250ppm群以上でヘマトクリット値の低下（雄）、総ビリルビンの減少（雌雄）、肝重量増加と肝細胞肥大（雌雄）、尿細管上皮空胞の減少（雄）および卵巣好酸性黄体量の減少（雌）、250ppm群以上における肝薬物代謝酵素誘導（雌雄）、50ppm群以上に副腎X帯空胞化域の拡張（雌）がそれぞれ認められた。

従って、本試験における無毒性量は、雄で50ppm（19.9mg/kg/日）であると判断した。雌では設定できなかった。

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。

表 6-1 主要な病理組織学的所見

性	雄					雌				
	0	50	250	1250	6250	0	50	250	1250	6250
臓器/所見										
心臓 検査動物数	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
壊死/限局性	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
肺 検査動物数	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
うっ血	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
浮腫/肺胞	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
肝臓 検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
肝細胞肥大	0	2	6*	9**	10**	0	0	1	10**	10
微小空胞化	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
うっ血	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
壊死/限局性	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
円形細胞浸潤	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
腎臓 検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
自己貪食性空胞	10	10	10	9	1	0	0	0	0	0
好塩基性皮質尿管	3	0	0	0	2	0	0	0	0	0
うっ血	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
皮質尿管拡張	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
蛋白円柱	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
円形細胞浸潤	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
アポト`沈着/糸球体	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
鉍質沈着	0	0	0	0	0	1	1	0	3	0
副腎 検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
うっ血/出血	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
X 帯空胞増加	0	0	0	0	0	9	10	10	10	10
GRADE 1	-	-	-	-	-	3	1	0	0	0
GRADE 2	-	-	-	-	-	6	3	0	0	0
GRADE 3	-	-	-	-	-	0	6	6	0	0
GRADE 4	-	-	-	-	-	0	0	4	5	2
GRADE 5	-	-	-	-	-	0	0	0	5	8
副副腎	1	1	2	0	1	0	0	0	0	0
脾臓 検査動物数	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
萎縮	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
皮膜線維化	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

* : P<0.05、** : P<0.01 (χ²検定 申請者)

GRADE 1 = Minimal / Very few / Very Small

GRADE 2 = Slight / Few / Small

GRADE 3 = Moderate / Moderate Number / Moderate size

GRADE 4 = Marked / Many / Large

GRADE 5 = Massive / Extensive Number / Extensive Size

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。

表 6-2 主要な病理組織学的所見

性	雄					雌				
	0	50	250	1250	6250	0	50	250	1250	6250
臓器/所見										
卵巣 検査動物数	-	-	-	-	-	10	10	10	10	10
好酸性黄体	-	-	-	-	-	10	10	10	10	10
GRADE 1	-	-	-	-	-	0	0	0	1	10
GRADE 2	-	-	-	-	-	2	1	1	5	0
GRADE 3	-	-	-	-	-	8	9	9	4	0
好塩基性黄体	-	-	-	-	-	10	10	10	10	10
胞状卵胞	-	-	-	-	-	10	10	10	10	10
巨大胞状卵胞	-	-	-	-	-	5	2	8	6	6
間質腺の亢進	-	-	-	-	-	0	0	0	2	10
のう胞	-	-	-	-	-	0	1	0	1	0
鈣質沈着	-	-	-	-	-	0	0	1	0	0
炎症	-	-	-	-	-	0	1	0	0	0
卵管 検査動物数	-	-	-	-	-	10	10	9	10	10
成熟卵胞	-	-	-	-	-	0	0	3	2	5
子宮 検査動物数	-	-	-	-	-	10	10	10	10	10
のう胞性腺	-	-	-	-	-	3	1	1	2	0
膣 検査動物数	-	-	-	-	-	10	10	10	10	10
自己融解	-	-	-	-	-	1	0	0	0	0
発情後期/発情休止期	-	-	-	-	-	7	7	4	5	4
発情前期	-	-	-	-	-	2	3	2	4	1
発情期	-	-	-	-	-	0	0	4	1	5
精巣上体 検査動物数	10	0	0	1	10	-	-	-	-	-
精子性肉芽	1	0	0	0	0	-	-	-	-	-
精子残渣	0	0	0	1	0	-	-	-	-	-
胸腺 検査動物数	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
萎縮	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
ハーダー氏腺検査動物数	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0
外傷性病変	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
眼 検査動物数	3	0	1	1	0	1	0	0	0	1
外傷性病変	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1

* : P<0.05、** : P<0.01 (χ²検定 申請者)

GRADE 1 = Minimal / Very few / Very Small

GRADE 2 = Slight / Few / Small

GRADE 3 = Moderate / Moderate Number / Moderate size

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。

(2-1) マウスにおけるチアクロプリドによるアロマターゼ誘導のメカニズム
説明試験 (13 週間混餌投与試験) (資料No. 原体-10-1)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年月日 : 1998 年 7 月 27 日

検体の純度 : 97.0%、97.2%
試験動物 : B6C3F1 系マウス、1 群雌 30 匹
試験開始時平均体重 : 18.4g
試験期間 : 13 週間(1997 年 2 月～1997 年 5 月)

【目的】

本試験は、亜急性毒性試験 (資料 No. 原体-10) において、250ppm 以上の雌群でみられた副腎の X 帯空胞化域の拡張の程度に、用量関連性のある増大がみられたことから、その再確認と肝臓中のアロマターゼ活性を測定し、検体のホルモンへの影響を調べ、この所見のメカニズムを知ることを目的とした。

【投与方法】

検体を雌の B6C3F1 系マウスに 0 (対照群)、10、30、250 及び 2500ppm の濃度で飼料に混入し、13 週間にわたって摂食させた。さらに 2500ppm 混餌投与と同時に、ニコチン類似物質であるメカミラミン (0.005%濃度) を飲水投与する群 (併用投与群) を追加した。このメカミラミンは、検体による副腎の X 帯空胞化域の拡張がニコチン様作用によるか否かを調べるために設定した。なお、投与後 4 週に半数の動物を屠殺し、調べた。

投与用量設定の根拠 ;

亜急性毒性試験マウス (0, 50, 250, 1250 及び 6250ppm の用量群 : 資料 No. 原体-10) において、250ppm 以上の雌群で副腎皮質に肥大を伴うあきらかな X 帯空胞化域の拡張がみられたことを根拠として、本メカニズム試験では 0, 10, 30, 250 及び 2500ppm の用量を設定した。この高用量の 2500ppm は、マウスにおける発がん性試験 (資料 No. 原体-19) の高用量として選択されている。低用量の 10 及び 30ppm は無毒性量と予想される濃度である。

【試験項目及び結果】

1) 臨床症状及び死亡率

臨床症状及び生死を少なくとも 1 日 1 回観察した。

臨床症状

検体投与に関連すると考えられる臨床症状の変化が運動性と反応性に見られた。

反応性の減少が試験 28 日より 2500ppm で見られ、途中屠殺群では 6/15 例が、最終屠殺群では 5/15 例が本所見を示したが、250ppm 投与群及び拮抗剤の併用群では、それぞれ 2/15 及び 3/15 例に見られたに過ぎなかった。

運動性の増加は、250ppm 投与群の 4/15 例及び 2500ppm 投与の 2 群ではそれぞれ 1/15 ないし 2/15 例に試験 49 日より見られた。運動性の減少は、2500ppm 投与群の 2 例に試験 57 日より見られた。

死亡率

検体投与に関連する死亡は、認められなかった。

2) 体重

各動物の体重は、投与開始前 (0 週と表示) 及び毎週 1 回測定した。

体重変化には、検体投与に関連する毒性学的な影響は認められなかった。

統計学的に有意な変化 (10ppm 投与群における投与 4 週後の体重増加及び 2500ppm 投与の 2 群における投与 2-4 週後の軽度で一時的な体重減少) は、偶発的な変化 (下表) と判断した。

投与量 [ppm]	平均体重 [g]								
	0 日	7 日	14 日	28 日	42 日	57 日	70 日	84 日	91 日
0									
10					↑106	↑106	↑106	↑105	↑105
30									
250									
2500			↓97	↓97					
2500*			↓94	↓96					

+ : 併用群 ↑ ↓ : p<0.05、 ↑ ↓ : p<0.01 (Dunnett's test)

表中の数値は、対照群に対する変動率 (%)

3) 摂餌量及び検体摂取量

動物の摂餌量は毎週測定し、検体摂取量についても算出した。

1 日あたりの平均摂餌量を要約した (次表)。

250ppm 以下の群の摂餌量に検体投与の影響は認められなかった。2500ppm 群では

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

摂餌量の減少が認められた。この程度は、検体単独群で-22%、メカミラミン併用群で-12%であった。

平均摂餌量				
投与量 [ppm]	g/ 動物		g/kg 体重	
	合計	1日当たり	合計	1日当たり
0	1129.4	12.4	51469.5	565.6
10	1136.7	12.5	50260.8	552.3
30	1162.3	12.8	53487.4	587.8
250	1100.9	12.1	50501.2	555.0
2500	874.1	9.6	40067.0	440.3
2500 ⁺	968.8	10.6	45271.9	497.5

+ : 併用群

平均検体摂取量は、250ppm以下の投与群では設定濃度と比例していたが2500ppm投与群では減少した。

平均検体摂取量				
投与量 [ppm]	mg/動物		mg/kg 体重	
	合計	1日当たり	合計	1日当たり
0	0	0	0	0
10	11	0	503	6
30	35	0	1605	18
250	275	3	12625	139
2500	2185	24	100167	1101
2500 ⁺	2422	27	113180	1244

+ : 併用群

4) 飲水量

動物の飲水量は毎週測定した。

飲水量に検体投与に関連する毒性学的な影響は認められなかった。

平均飲水量				
投与量 [ppm]	g/ 動物		g/kg 体重	
	合計	1日当たり	合計	1日当たり
0	479	5.3	21881	240.4
10	483	5.3	21359	234.7
30	490	5.4	22450	246.7
250	472	5.2	21567	237.0
2500	466	5.1	21322	234.3
2500 ⁺	473	5.2	22083	242.7

+ : 併用群

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。

5) 剖検

動物は発情休止期にエーテルの深麻酔下で動物を放血殺し剖検した。各群 15 匹を試験 28-32 日に、その他を試験 91-102 日に剖検した。自然死した動物及び瀕死動物は計画殺に先立ってその時点で剖検した。

計画剖検時まで生存した動物に、被験物質投与に関連する肉眼病理所見は認められなかった。

6) ホルモン測定及びアロマトラーゼ測定

途中及び最終解剖時に動物をエーテルで麻酔し、心臓より採血し測定に供した。ヘパリン処理し遠心後、血漿を得た。ホルモン測定は、最終解剖動物のみについて行った。

ホルモン測定

エストラジオール及びプロゲステロンの測定を、50 μ L (前抽出しない) 及び 100 μ L (前抽出する) の試料について、ラジオイムノアッセイ法を用い、20259 Hamburg において単回測定した。

投与 13 週に発情休止期のマウスについて、エストラジオールとプロゲステロンの濃度を測定した。以下の表に群平均を示す。

dose [ppm]	estradiol [pg/mL]	progesteron [ng/mL]	estradiol/progesteron ratio	number of values
0	35.2	1.48	26.1	15
10	37.8	1.57	28.8	14
30	37.5	1.43	28.0	15
250	32.3	1.45	32.0	14
2500	31.5	2.02	17.4	14
2500 ⁺	28.3	2.10	15.5	14

+ : 併用群

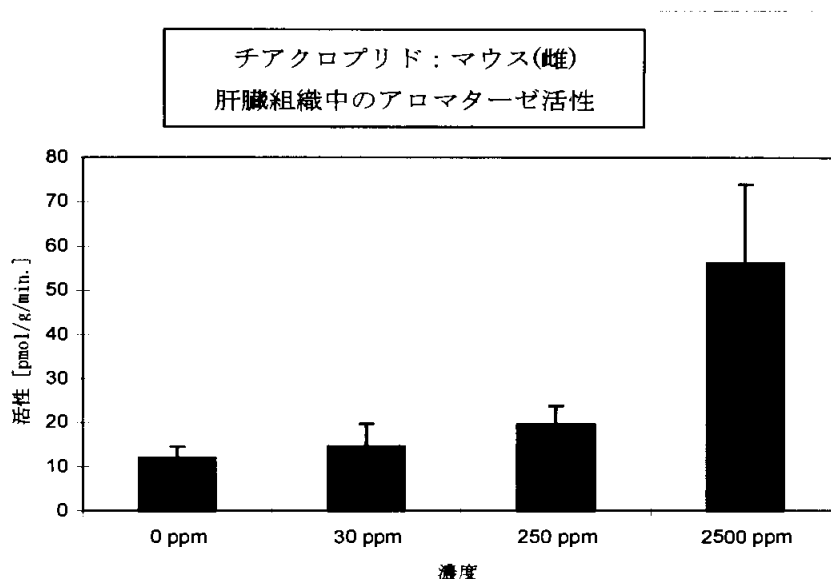
ホルモン濃度を各群 14-15 匹の動物について測定したところ、大きな個体差が認められたが、2500ppm 投与群でプロゲステロン濃度が増加した。2500 ppm 投与群におけるエストラジオール/プロゲステロン比の減少はこの変化に起因するものだった。250ppm 投与群においても、エストラジオール濃度が軽度に減少したが、エストラジオール/プロゲステロン比には異常がなかった。メカミラミンを併行投与しても、2500ppm 投与群における検体のエストラジオール/プロゲステロン比に対する影響を完全に防ぐことはできなかった。ホルモンに対する影響における無毒性量は、エストラジオール/プロゲステロン比の変化から 250ppm と判断した。

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。

アロマトラーゼ測定^{注)}

最終解剖時に、動物をエーテルで深麻酔して肝臓を取出し、ドライアイス上で凍結し、測定に用いた。肝臓組織のアロマトラーゼ活性の測定は、0、30、250 及び 2500ppm 群の各 6 匹を用いた。

13 週間投与終了後に、軽度だが統計学的に有意なアロマトラーゼ活性の誘導が 250 及び 2500ppm 群で見られたが、30ppm 群では対照群に比較し誘導の増加は見られなかった (図参照)。



7) 臓器重量

剖検時に以下の臓器の重量を測定した。

脳、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、胸腺、副腎、卵巣、子宮、下垂体

2500ppm 群 (単独群、メカミラミン併用群共) において、検体投与に関連する唯一の臓器重量の変動は、肝臓の絶対及び相対重量の増加だった。

この変動は、4 週間投与終了後にすでに見られ、拮抗剤であるメカミラミン併用群で 2500ppm 単独群よりも小さい変化を示した (投与 4 週時の絶対/相対重量が、

^{注)} [申請者追記] その後に実施した結果 (資料 No. 原体-18-7) から「トリチウム化水分析法」によるトリチウム化水の増加は非特異的な肝酵素活性の増加による可能性が高いことが示唆された。

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

メカミラミン併用群で+18/+25%、検体単独群で+30/+32%)。250ppm群において、軽度な肝臓の相対重量の増加(+8%)が4週間投与終了後に見られたが、試験終了時にはこの変化は消失した(次表)。

実重量				
投与量 [ppm]	体重 [g]	脳 [mg]	肝臓 [mg]	腎臓 [mg]
中間屠殺				
0				
10				
30				
250				
2500			↑130	
2500*	↓96		↑119	↓94
最終屠殺				
0				
10	↑108			
30				
250				
2500			↑126	
2500*			↑118	

+: 併用群 ↑↓: p<0.05、↑↓: p<0.01 (Dunnett's test)

表中の数値は、対照群に対する変動率(%)

体重比重量				
投与量 [ppm]	体重 [g]	脳 [mg/100g]	肝臓 [mg/100g]	腎臓 [mg/100g]
中間屠殺				
0				
10				
30				
250			↑108	
2500			↑132	
2500*	↓96		↑125	
最終屠殺				
0				
10	↑108	↓96		
30				
250				
2500			↑123	
2500*			↑120	

+: 併用群 ↑↓: p<0.05、↑↓: p<0.01 (Dunnett's test)

表中の数値は、対照群に対する変動率(%)

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。

8) 病理組織学的検査

すべての動物の副腎について病理組織学的検索を実施し、結果を以下に示した。

投与前における対照群の雌の屠殺

これらの動物には明らかな空胞化を伴わないよく発達した X 帯が認められた。

中間屠殺

全例の副腎皮質で広い好酸性の X 帯が認められた。副腎皮質の X 帯空胞化域の拡張（軽微または軽度）は、250ppm 以上の投与群で認められた。2500ppm の検体単独群及びメカミラミン併用群では、2500ppm 投与群と同程度の空胞化域が認められた。

検体の 4 週間投与後の無毒性量は 30ppm である。

投与 4 週に屠殺した動物における“空胞化/X 帯”所見のグレード及び発生率の要約を以下に示す。

器官/所見	性： 投与群 (ppm) : 動物数 :	雌					
		0	10	30	250	2500	2500 ⁺
		15	14	15	15	15	15
副腎	観察数 :	15	14	15	15	15	15
空胞化/X 帯	グレード ⁺ : 1	2	3	2	6	11	9
空胞化/X 帯	グレード ⁺ : 2		1		1	2	1
	影響のみられた組織の総数 :	2	4	2	7	13	10
	影響のみられた組織のグレードの平均 :	0.1	0.3	0.1	0.7	1.0	0.7

+ : 併用群 グレード⁺ : 1 = Minimal / Very few / Very Small
2 = Slight / Few / Small

投与期間終了時(解剖時)

投与期間終了時での所見は、X 帯はまだよく発達していた。大部分の動物の X 帯に空胞化域が観察された。250ppm 以上では、空胞化域の拡張の程度が増加した。2500ppm では著明な空胞化域の拡張が観察され、X 帯の肥大がみられた。ORO 染色した凍結切片では X 帯に観察された空胞に脂質が含有されていることが証明された。検体の 2500ppm と共にメカミラミンを投与した動物では、検体単独群で観察されたのと同程度の空胞化域の拡張がみられた。

検体の 13 週間投与による無毒性量は 30ppm である。

投与 13 週で屠殺した動物の、グレード付けした“空胞化/X 帯”の頻度の要約を以下の表に示す。

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

器官/所見	性 :	雌					
	投与群 :	0	10	30	250	2500	2500*
	動物数 :	15	16	15	15	15	15
副腎	観察数 :	15	14	15	15	15	15
空胞化/X 帯	グレード ⁺ : 1	9	9	10	1		1
空胞化/X 帯	グレード ⁺ : 2	3	5	4	7	1	1
空胞化/X 帯	グレード ⁺ : 3				7	2	5
空胞化/X 帯	グレード ⁺ : 4					10	7
空胞化/X 帯	グレード ⁺ : 5					2	1
影響のみられた組織の総数 :		12	14	14	15	15	15
影響のみられた組織のグレード ⁺ の平均 :		1.0	1.3	1.2	2.4	3.9	3.4

+ : 併用群 グレード : 1 = Minimal / Very few / Very Small
 2 = Slight / Few / Small
 3 = Moderate / Moderate Number / Moderate size
 4 = Marked / Many / Large
 5 = Massive / Extensive Number / Extensive Size

2500ppm で認められた副腎皮質 X 帯の変化に及ぼすメカミラミンの影響は認められなかった。

病理学的観点から、4 週間または 13 週間投与後の検体の無毒性量は 30ppm であると判断した。

以上のことから、2500ppm 群では、摂餌量減少、肝重量の増加およびエストロジェン/プロゲステロン比の減少として観察された軽度のホルモンの変動が認められた。250ppm 以上の群では臨床症状が認められた。また、副腎皮質内側の X 帯空胞化域の拡張の程度が 4 及び 13 週投与終了後に用量に関連して増大し、2500ppm 群では 13 週間投与終了後に、顕著な空胞化域の拡張を示し、肥大を伴っていた。メカミラミンの併用投与は、検体単独投与群で見られたエストラジオール/プロゲステロン比の変動及び摂餌量の減少を抑制しなかったことから、検体投与による X 帯空胞化域の拡張及びホルモンの変化は、ニコチン様物質であるメカミラミンが拮抗するような中枢神経を介した変化ではないことが示された。

したがって、本試験条件下、雌マウスへの 4 週間または 13 週間投与のおける無毒性量は、30ppm (18mg/kg/日) であると判断された。

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

(3) チアクロプリドのイヌにおける亜急性経口毒性試験 (資料 No. 原体-11)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：1998年5月8日

検体の純度：97.2%(1994年9月)

試験動物：ビーグル犬、1群雌雄各4匹

試験開始時；19～20週齢

試験期間：15(13)週間(1995年1月～1995年5月)

【投与方法】

検体を0(対照群)、250、1000、2000ppmとなるように均質に飼料に混ぜ13週間投与した。飼料は制限給餌(1日当たり300g)とし、水は自由に摂取させた。検体を添加した飼料は、1週間に1回調製した。なお、試験開始時の最高投与量は4000ppmであったが、4000ppm群において摂食拒否を含む飼料摂取量低下と食餌の嘔吐および体重減少が観察された。そこで、投与4日後に4000ppm群の給餌を中止し、対照群の飼料に切り替え、動物を回復させるために10日間継続した。その後、動物には2000ppmの飼料を与えた。試験ガイドラインにある13週間の投与期間を満たすために、全ての動物の試験期間を2週間延長した。

投与用量設定の根拠；

投与用量は、予備試験(資料No. 原体-11に添付)の結果に基づき設定した。検体をビーグル犬に0、100、300及び1000ppmの濃度で10週間混餌投与した。明確な毒性を把握するために1000ppmの濃度を試験期間中2500ppmまで増加させた。投与4週から2500ppm群を本試験に追加的に設け、検体飼料に動物が順応するかどうか調べた。この間飼料摂取量に対する軽度の影響を除き、明らかな臨床的毒性兆候が認められなかったため、本亜急性混餌投与試験の高用量は4000ppmとした。

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。

【試験項目及び結果】

1) 臨床症状

全動物の外観と行動を毎日数回観察した。

試験期間中対照群および投与群で均等に軟便および粘液状便が認められた。

4000ppm 群の投与初日に雄 2、雌 3 例で嘔吐が観察された。嘔吐は 4 日目までに雄 1 例、雌 1 例で再び観察された。2000ppm への投与量の減少後に嘔吐は第 3 週に雌雄各 1 例で観察されただけであった。

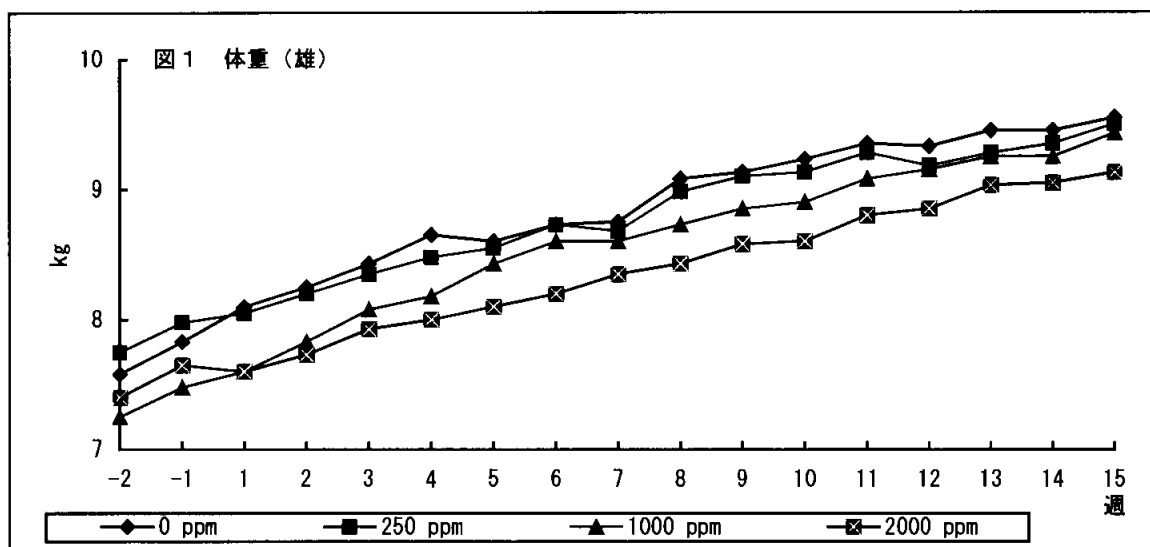
2) 死亡率

15 週間の試験期間中、全動物が生存し、死亡は認められなかった。

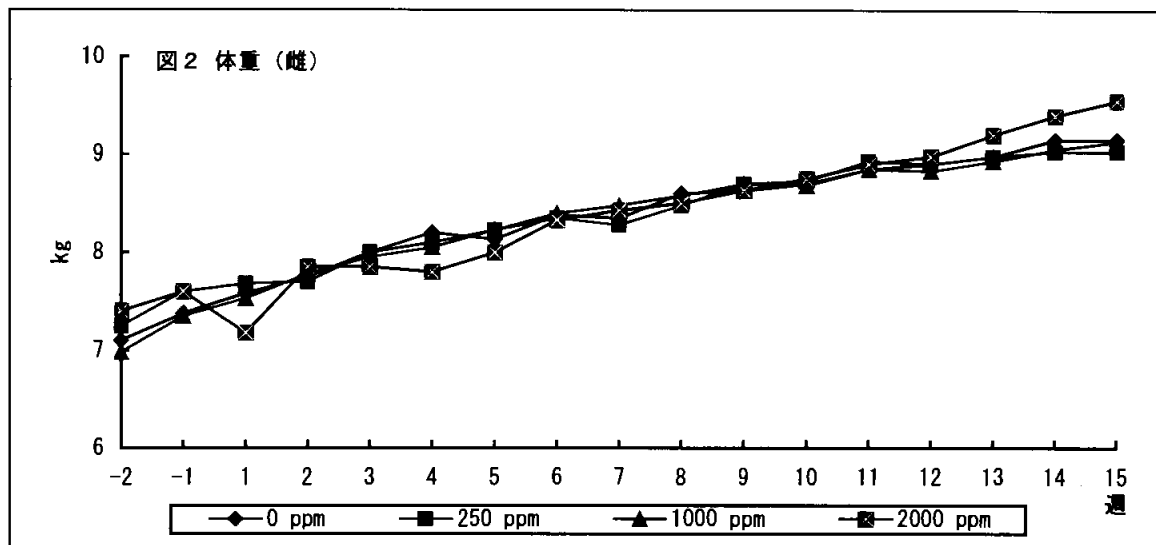
3) 体重変化 (図 1, 図 2)

週に 1 回体重を測定した。

体重は、2000ppm 群の雄で対照群に比較して低下した。雌では全投与群とも対照群と同等であった。



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



4) 摂餌量及び検体摂取量

毎日、摂餌量を測定した。平均摂餌量は週毎に集計して比較した。

摂餌量について、2000ppm 群の雌雄で試験の前半に減少したが、後半は対照群と同等となった。

投与期間中の平均検体摂取量は以下のとおりであった。

表 1 検体摂取量

投与用量 (ppm)		250	1000	2000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	8.5	34.9	68.0
	雌	8.9	34.7	65.3

5) 眼科学的検査

各動物の眼科学的な検査について、試験開始前、投与後 7、15 週に実施した。

どの検査時においても、検体に起因する所見は認められなかった。

6) 心電図

心電図 (ECG) およびその他の測定を試験開始前 (-2 週)、投与後 7 および 15 週時にそれぞれの投与開始前と 2 時間後に実施した。心電図は犬を右側に寝かせて測定した。また、心拍数も測定した。

どの検査時においても、検体に起因する所見は認められなかった。

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

7) 臨床神経学的検査

反射（瞳孔、角膜、膝蓋腱、伸筋、屈筋、背筋）と体温、脈拍数の測定を試験開始前と投与後 7、15 週に実施した。

どの検査時においても、検体に起因する所見は認められなかった。

8) 血液学的検査

試験開始前（-3、-2 週）、投与後 2、7、15 週に血液を頸静脈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、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量 (MCHC)、平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCH)、メトヘモグロビン量、血小板数、トロンボプラスチン時間 (PT) および部分トロンボプラスチン時間 (PTT)、網状赤血球数、ハインツ小体および血沈 (ESR)

対照群に比較し投与群に異常を認めなかった。

また、桿状核好中球、分葉核好中球、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球および正赤芽球の百分比についても同様に検査した。

対照群と投与群の動物で大差はなかった。

9) 血液生化学的検査

試験開始前（-3、-2 週）、投与後 2、7、15 週に血液を頸静脈から採取し、以下の項目の測定を行った。

アスパギン酸アミノトランスフェラーゼ (ASAT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALAT)、アルカリホスファターゼ (APh)、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GLDH)、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT)、ラクテートデヒドロゲナーゼ (LDH)、クレアチンキナーゼ (CK)、血糖、コレステロール、トリグリセリド、クレアチニン、尿素、ビリルビン (総)、総蛋白、アルブミン、血清電解質 (ナトリウム、カリウム、カルシウム、塩素、無機リン、鉄分およびマグネシウム) 並びに甲状腺ホルモンのトリヨードチロニン (T3)、チロキシシン (T4)、チロキシシン結合能 (TBC)。

2000ppm 群の雄で投与後 2 週に ALAT および GLDH の増加が観察された。試験後半の検査ではこれらの値は正常に復した。

チロキシシン (T4) は 1000 および 2000ppm 群 (雌雄) において試験期間中 軽度に減少 (10~18nmol/L) した。これに付随して、TBC が軽度に増加 (0.84~0.98) した。250ppm 群 (雄: 0.87、雌: 0.89) の TBC も増加したが、T4 に変動がみられず、

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。

背景データの 2SD の範囲内 (0.70~1.01) にあったことから、検体に起因する変動とは考えられなかった。

その他には臨床生化学的検査において異常を認めなかった。

表 2 臨床生化学的検査 (変化の認められた項目)

検査時期	2 週			7 週			15 週		
投与量 (ppm)	250	1000	2000	250	1000	2000	250	1000	2000
—雄—									
ALAT	(262)								
GLDH	(215)								
T4							↓ 52		
TBC				↑ 112			↑ 109	↑ 111	↑ 114
—雌—									
T4	↓ 65	↓ 61					↓ 66	↓ 62	
TBC	↑ 112						↑ 110	↑ 111	↑ 112

表中の値は、対照群に対する変動率(%), () 内数字は有意差は認められなかった。

↑ ↓ : p<0.05, ↑ ↓ ↓ : p<0.01 (Dunnett 多重比較検定)

10) 尿検査

試験開始前 (-3、-2 週)、投与後 2、7、15 週に全動物で尿量、外観、比重、ビリルビン、潜血、糖、ケトン体、pH、ウロビリノーゲン、クレアチニン、白血球、蛋白、亜硝酸及び尿沈渣について尿検査を実施した。

その結果、本検体に関連した変動は認められなかった。

11) 剖検

試験終了時に、全動物を Narcoren® 麻酔下で放血致死させ剖検した。

その結果、本検体に関連した変動は認められなかった。

12) 臓器重量

全例について、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、卵巣、甲状腺、副腎、胸腺、前立腺、脳、下垂体、膵臓、子宮の重量を測定すると共に、対体重比についても算出した。

前立腺重量が 1000ppm と 2000ppm 群で増加したが、検体投与による影響とは考えられなかった (15) 項 病理組織学的検査で考察)。他に軽度ながら肝臓重量の増加が認められたが、用量依存性がなく毒性学的に意味のある変動とは考えられなかった。

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

表 3 臓器重量 (変化の認められた項目)

性別 群		雄			雌		
		250	1000	2000	250	1000	2000
前立腺	実重量		↑248	↑280	/	/	/
	比重量		↑252	↑294	/	/	/
肝臓	実重量	↑126	↑122	↑119			
	比重量	↑128	↑126	↑126		↑119	

表中の値は、対照群に対する変動率(%)

↑↓ : p<0.05、↑↓ : p<0.01 (Dunnett 多重比較検定)

13) 肝臓の酵素活性

試験終了時に全動物の肝臓組織のチトクローム P450、チトクローム P450 依存性モノオキシゲナーゼ (7-エトキシマリンデエチラーゼ ; ECOD、7-エトキシレゾルフィンデエチラーゼ ; EROD、アルドリンエポキシダーゼ ; ALD、N-デメチラーゼ (N-DEM)、O-デメチラーゼ (O-DEM)、エポキシドヒドロラーゼ (EH) および抱合酵素 (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ ; GS-T、UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ ; UDP-GT) を測定した。

2000ppm 群の雄において EH の有意な増加及び雌において EROD の有意な減少が認められた。また、2000ppm 群において N-デメチラーゼ活性、O-デメチラーゼ活性、EH(雌)、第 II 相薬物代謝酵素 GS-T (雌) 及び UDP-GT (雌雄) の僅かな増加傾向がみられた。最高用量 2000ppm における肝ミクロソームの酵素誘導は、検体起因と考えられたが、その程度はごく軽度であった。

表 4 肝薬物代謝酵素の測定 (有意差の認められた項目及び明らかな変動のみられた項目)

性別 群	雄			雌		
	250	1000	2000	250	1000	2000
N-DEM*			(↑)157			
O-DEM**			(↑)120			(↑)137
EROD			(↓)45		(↓)55	↓30
EH			↑137			(↑)130
GS-T						(↑)137
UDP-GT			(↑)127			(↑)158

表中の値は、対照群に対する変動率(%)

↑↓ : 有意な増加または減少 (p<0.05 ; Bonferroni の多重検定)、(↑) (↓) : 増加傾向または減少傾向

* : 基質/アミノピリン ※※ : 基質/ニトロアニゾール

14) 血漿中の検体濃度

毒性学的影響がごく僅かしか認められなかったことから、被験物質の吸収割合お

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。

よび血漿中濃度の用量依存性を証明するために、血漿を投与 13 週後に採取した。サンプルは給餌後 0, 2, 4, 6 および 24 時間後に採取した。

雌雄の動物とも給餌後 0 および 24 時間の血漿中濃度は低く、多くの例で最高血漿中濃度は給餌後 6 時間でみられた。投与量に比較すると血漿濃度は比較的高かった。従って、検体のごく軽度の毒性は、吸収の低さおよび血漿濃度の低さによるものではなかった。

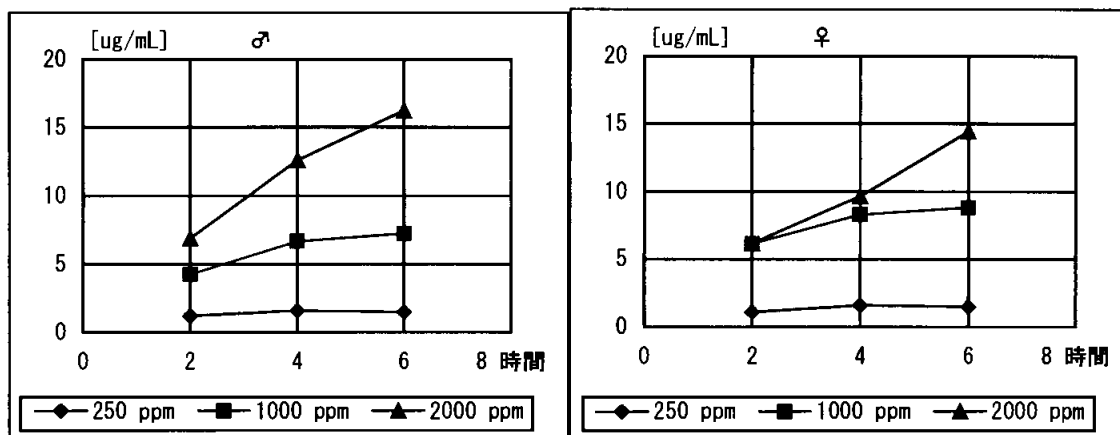


図 1 イヌ血漿中のチアクロプリドの濃度 (投与 13 週後)

15) 病理組織学的検査

全動物を対象として、以下の臓器について病理標本を作製し、鏡検した。

脳 (大脳、小脳、脳幹)、脊髄 (頸部、胸部、腰部)、神経 (視神経、坐骨神経)、心臓、大動脈、気管、肺、舌、食道、胃、小腸 (十二指腸、空腸、回腸)、盲腸、結腸、直腸、肝臓、胆のう、膵臓、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、卵巣、卵管、子宮、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、脾臓、骨 (胸骨、大腿骨、肋骨)、骨髓、胸腺、腸間膜リンパ節、咽頭後方リンパ節、唾液腺、皮膚、眼球、筋肉、乳腺及び肉眼的異常組織

1000 と 2000ppm 群の全例の雄の前立腺の腺上皮に軽度から中等度の肥大が認められた。影響を受けた動物では、前立腺重量 (絶対重量と体重比重量) が対照群や 250ppm 群と比較して 2~3 倍増加したが、2000ppm 群の 1 例の高値を除き、いずれも背景データの範囲 (0.58~21.5g) にあった。若齢成熟イヌの前立腺重量には大きな個体差があることが知られており、また本検体のイヌを用いた慢性毒性試験 (毒性資料 No. 33) において、ソノグラフィーを用いて前立腺の大きさと構造を経時的に 8、17、26、35、44、51 週に検査した結果、何らの変化もみられず、また同試験の最終解剖時にも何らの重量変化を認めていないため、本亜急性毒性試験でみ

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。

られた前立腺重量の増加は、検体投与に起因したものではないと判断した（申請者註）。

2000ppm 群において精子細胞変性の軽度の増加が、精巣（対照群で 0/4 に対して 2/4）および精巣上体（対照群で 1/4 に対して 4/4）にみられた。精巣の Leydig 細胞の増加が 2000ppm 群で 3 例にみられた。若齢成熟雄ではこのような変化は、程度および頻度において大きなばらつきがあることが知られていること、また対照群にもみられているから、検体の投与に起因したものとは考えられなかった。子宮、卵巣、副腎、下垂体には著変はみられなかった。

その他には検体の投与に起因する形態学的な変化は認められなかった。

以上、2000ppm 群でみられた所見は、体重増加の抑制（雄）、肝機能酵素（ALAT, GLDH）の一過性の増加（雄）、T4 の低下と TBC の増加傾向（雌雄）、軽微な肝薬物代謝酵素（O-デメチラーゼ、UDP-GT 等）の誘導（雌雄）であり、1000ppm 群では T4 の低下と TBC の増加傾向（雌雄）が認められた。

これらのことから、本試験における無毒性量は、250ppm（雄；8.5mg/kg/日、雌；8.9mg/kg/日）であると判断した。

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。

表 5 病理組織学的所見

項目	用量 (ppm)	雄				雌			
		0	250	1000	2000	0	250	1000	2000
【検査数】		4	4	4	4	4	4	4	4
副腎									
空胞化/球状帯		2	2		1		1	1	
脾臓									
充血/うっ血		3			1	3		2	
大動脈									
中膜の希薄化					1			1	1
泡沫細胞蓄積					1				
扁桃									
炎症		3	4	3	3	4	3	2	2
腎臓									
円柱		4	4	4	3	1	3	2	3
肝臓									
円形細胞浸潤		2	1					1	1
細胞質内封入体				3	3				3
肺									
円形細胞浸潤		1	1			1	1		
マクロファージ/肺胞		1	3	2	1	1		2	
下垂体									
のう胞/前葉			1		1	1	2	1	
のう胞/後葉					1				1
前立腺									
腺肥大				4	4				
分泌能		2	4	4	4				
精巣									
精子細胞変性				1	2				
Leydig 細胞増加		1			3				
精巣上体									
精子細胞変性		1		1	4				
卵巣									
のう胞							2		
子宮									
膿瘍									1
胸腺									
充血/うっ血				1					2
甲状腺									
リンパ球浸潤		1		1				1	
鯨後部遺残			1	1	1	1	1	1	

* : p<0.05 で有意 (Fisher 検定) ; 申請者が実施

7. 反復経皮投与毒性

チアクロプリドの亜急性経皮毒性試験

(資料 No. 原体-12)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1997年2月7日

検体の純度：97.2%

試験動物：HsdCpb:WU 系統

雌雄 1群各5匹

体重 雄 222~256g(7~8週齢)、雌 208~235g(14週齢)

試験期間：投与期間；4週間、回復期間；2週間(1995年9月~1995年11月)

試験方法：

投与開始の前日にラットの背部と横腹部の毛を剪毛した。その後、試験中に生えてくる毛は、週あたり2回、剪毛した。

投与量は100、300及び1000mg/kgとし、対照として0mg/kgを設けた。また、対照及び1000mg/kg群では回復群を設け、4週間の投与期間終了後、さらに14日間観察した。

検体は水道水を用いて湿らせ、ガーゼパッチ(5.5×5.5cm)に載せて、ラットの背部に伸縮性包帯で固定して6時間暴露した。暴露終了後、水と石けんで皮膚を洗浄した。投与は最初の3週は週5日、4週目は週末も含めて毎日投与し、計22回投与した。

試験項目および結果：

一般症状および死亡率

試験期間中毎日、動物を観察した。

すべての動物において、投与期間中一般症状の変化はみられず、また、死亡例もみられなかった。

体重

投与開始前、その後は週に1回体重を測定した。

各投与群と対照群の間に違いは認めなかった。

摂餌量

各動物について毎週 1 回測定した。

雄では各投与群と対照群の間に違いは認めなかった。雌では 1000mg/kg 群で一過性の減少が認められた。

皮膚の局所所見

投与開始前及び試験期間中は各投与の 24 時間後皮膚を観察し、発赤について Draize の基準に従い、評点した。浮腫については、雄で投与開始前、投与 3、7、10、14、17、21、24 日及び 28 日、雌では、投与開始前 2、6、9、13、16、20、23 および 27 日に、投与部位の中心の皮下脂肪厚を測定して評価した。

いずれの投与群においても、投与に関連した発赤、浮腫、その他の皮膚反応を認めなかった。

血液学的検査

4 週間後（全群）及び投与終了 2 週間後（回復群）に、剖検時にエーテル深麻酔下で心臓穿刺によって採血し、以下の項目について検査した。グルコースは 23/24 日後（全群）、41/42 日後（回復群）に無麻酔下、絶食動物の尾静脈から採血した。

赤血球数、白血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球血色素量（MCH）、平均赤血球血色素濃度（MCHC）、血小板数、白血球百分率

いずれも薬剤に起因する変化は認められなかった。

血液生化学的検査

血液学的検査と同様の血液試料について、以下の項目について検査した。

アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALAT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ASAT）、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ（GTT）、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ（GLDH）、アルカリフォスファターゼ（ALP）、尿素、グルコース、クレアチニン、ビリルビン、コレステロール、総蛋白、アルブミン、トリグリセリド、無機りん、Na、K、Ca、Cl

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。

雄の 300 ないし 1000mg/kg 群で、コレステロール、クレアチニン、総蛋白、アルブミン及びグルコースに統計学的有意差が認められたが、用量関連性もなく片性のみ認められていることから、偶発的なものと考えられた。雌ではいずれの項目にも統計学的な有意差は認められなかった。

剖検および臓器重量

主群は最終投与の翌日、回復群については観察期間終了時にエーテルによる深麻酔下で放血して屠殺し、肉眼的に剖検した。以下の臓器については臓器重量（実重量及び対体重比）を測定した。

脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、副腎、脾、精巣及び胸腺

いずれの投与群においても、投与に関連した肉眼的変化を認めなかった。臓器重量においては、1000mg/kg 群雌雄の肝重量が有意に増加（雄は対体重比のみ）した。

なお、回復群における臓器重量には対照群と比して違いは認めなかった。

対照群と比べ有意差のみられた項目を下表に示す。

臓器名	ppm	雄				雌			
		100	300	1000	(1000)回復群	100	300	1000	(1000)回復群
肝	実重量 対体重比			↑117				↑114 ↑112	

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
↑↓ : $p < 0.05$ (Dunnett test)

病理組織学的検査

剖検した全ての動物について、脳、皮膚、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、甲状腺及び上皮小体、胸腺、精巣及び肉眼的に異常を認めた部位を Davidson 液で固定して、病理標本を作成し、組織学的に検査した。

300mg/kg 群以上の雄および 1000mg/kg 群雌の肝臓に小葉中心性肝細胞肥大が認められた。回復群では 1000mg/kg 群雄の 2/5 例にまだ認められたが、雌ではこの所見は認められなかった。また、1000mg/kg 群雌雄の甲状腺に濾胞上皮細胞肥大が認められた。回復群では雄の 1 例にのみ認められた。

皮膚には投与に関連した所見は認められなかった。

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

主な病理組織学的所見を下表に示す。

項目	mg/kg	雄				雌			
		0	100	300	1000	0	100	300	1000
肝臓 検査動物数		5	5	5	5	5	5	5	5
小葉中心性肝細胞肥大	a	0	1	3	5**	0	0	0	3
	b	0	-	-	2	0	-	-	0
甲状腺 検査動物数		4	5	0	5	5	5	5	5
濾胞上皮細胞肥大	a	0	0	0	3	0	0	0	2
	b	0	-	-	1	0	-	-	0

a:主群

b:回復群

(** : p<0.01 Fisher 検定)

本試験において、1000mg/kg 群に雌雄に肝臓重量の増加、病理組織学的所見として肝臓の肝細胞肥大および甲状腺に濾胞上皮細胞肥大が認められ、300mg/kg 群雄では肝臓に肝細胞肥大が認められた。

以上のことから、本試験による無毒性量は、雄 100mg/kg、雌 300mg/kg であった。

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

8. 反復吸入毒性

(1) チアクロプリドのラットを用いた亜急性吸入毒性試験 (資料No. 原体-13)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1998年7月20日

検体の純度：97.0%

試験動物：ウィスター系ラット、1群雌雄各10匹

試験開始時平均体重 雄245g、雌168g(2~3ヵ月齢)

試験期間：4週間(6時間/日、5日/週、4週間)

(1997年5月5日~1997年6月4日)

曝露量の設定根拠

1群雌雄各10匹のウィスターラットに、エアロゾル化(粉体)した検体(平均分析濃度0、1.97、19及び205mg/m³)を1日あたり6時間で5日間連続して曝露した予備試験(資料No. 原体-13に添付)の結果、19mg/m³群で臨床所見(握力の増加)と剖検所見(脾臓の暗赤色化の出現頻度の増加)が認められた。また205mg/m³群では、体重減少、臨床生化学検査値の変動(血清蛋白や胆汁酸の増加)、臓器重量の変動(胸腺重量の低下、肝臓重量の増加)等がみられた。これらのことから、本試験での濃度は、0、2、20及び200mg/m³とした。なお、200mg/m³群においては、重度の呼吸困難が認められたため曝露2週目から100mg/m³に濃度を変更した。

申請者注：最高用量群の濃度は一貫して200 mg/m³と記す。

【投与方法】

溶媒を使用せずに、ダスト発生装置を用い検体をダストとしてエアロゾル化(粉体)し、流動式吸入装置によりラットの鼻部に4週間(6時間/日、5日/週)曝露した。

設定濃度；0、2、20、200mg/m³(2週目から100mg/m³に変更)

実測濃度；0(空気対照)、2.0、18.2及び143.4mg/m³

暴露空気をセルローサーアセテートフィルターを用いて捕集し、重量測定法により実測濃度を求めた。

表 1 暴露条件

	1群	2群	3群	4群
設定濃度 (mg/m ³)	0	2	20	200
実測濃度 (mg/m ³)	--	2.0 ± 0.28	18.2 ± 2.6	143.4 ± 56.7
供給空気量 (L/min)	30	30	30	30
排気量 (L/min)	24	24	24	24
チャンパー内温度 (°C)	21	21	21	22
湿度 (%)	11	18	14	14
空気力学的質量中位径 (μm) [MMAD]	--	2.850	2.946	2.901
空気力学的個数中位径 (μm) [NMAD]	--	0.973	1.210	1.167
幾何標準偏差 [GSD]	--	1.844	1.720	1.730
呼吸可能な粒子 (<3μm) の割合 (%)	--	54.538	51.615	53.153
回収質量 (mg/m ³)	--	2.284	17.892	164.62

200mg/m³ 群： 0 から 7 日目まで 200mg/m³ の設定濃度で、8 日目以降は 100mg/m³ の濃度で曝露させた。

各群ともに、エアロゾルはラットに十分に吸入可能であった。すなわち、平均空気力学的質量中位径 (MMAD) は約 2.9μm で、幾何標準偏差 (GSD) は約 1.8 であった。これらの濃度は、概算の毎日総曝露用量である 0.7、6.6 及び 52mg/kg/日に相当する。

【試験項目及び結果】

1) 臨床症状及び死亡率

臨床症状及び生死を少なくとも 1 日 2 回 (週末は 1 回) 観察した。個体別の精査は週 1 回実施した。

検体によると考えられる主な症状は、200mg/m³ 群雌雄での呼吸緩徐、運動性の低下、筋弛緩、ラ音、流涎、散瞳、振戦等であった。これらの症状は、200mg/m³ から 100mg/m³ に減ずるまでの曝露 1 週に最も重度に認められた。曝露期間中、この群で認められた症状は、特異的な中枢神経症状 (散瞳、振戦等) というよりも、むしろ主として呼吸困難に関連したものであり、これらは濃度を下げたのち完全に消失した。他の濃度群では症状の発現は認められなかった。

死亡例は、全群の雌雄ともに認められなかった。

2) 神経学的検査 (反射)

(1968)、ら (1988) による方法に従って以下の項目について、曝露 2 日目と 25 日目に検査した。

位置視覚反応、金網による握力、腹筋緊張、角膜及び瞳孔反射、耳介反射、正向反射、尾の触覚反応、音や触刺激による行動の変化、驚きの反応

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。

検査の結果、200 mg/m³ 曝露群の少数例で曝露 2 日目に筋緊張度及び対光反射の低下が認められた。

3) 直腸温

直腸温は、曝露後 30 分以内に、デジタル温度計を用いて直接測定した。

空気対照群に比較して、20mg/m³ 群まで曝露による体温の変化は認められなかった。しかし 200mg/m³ 群の雄で初日に、雌で初日と 4 日目に体温の低下が認められた。

4) 体重

体重は、週 2 回（月及び金曜日）に測定した。

20mg/m³ 群までは体重への影響は認められなかった。200mg/m³ のラットでは 1 週目に体重減少が認められた。曝露濃度を減じた以降（曝露 8 日以降）は、体重に差は認められなくなった。曝露のない週末に動物は顕著に回復した。

5) 臨床検査

臨床化学的検査は、4 週間曝露終了時に 10 匹/性/群について実施した。これらの検査用の最終の血液試料は深麻酔（ペントバルビタール麻酔）したラットの心臓穿刺によって採取した。糖の測定に必要な血液は試験の最終週付近で（採尿後に）非絶食ラットの尾静脈より採取した。

(1) 血液学的検査

血液学的検査は、以下の項目について行った。

ヘマトクリット、ヘモグロビン、白血球、赤血球、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）、平均赤血球ヘモグロビン量、血小板数、網状赤血球、ハインツ小体、白血球分画（リンパ球、顆粒球、分葉核好中球、好酸球、好塩基球、単球、プラズマ細胞、その他の異常細胞）、凝固時間（Hepatoquick）

表 2 血液学的検査（有意差の認められた項目）

性別	雄			雌		
	2.0	20.0	200	2.0	20.0	200
群 (mg/m ³)						
血小板数					↑115	
MCHC				↑102	↑102	
好中球		↑189				
リンパ球						↓65

↑ ↓ : P<0.05 (ANOVA+Dunnet 検定) 表中の数値は対照群に対する変動率 (%)

200mg/m³ 群ではリンパ球数の減少（雌）のみがみられた。20mg/m³ 群では好中球数の増加（雄）、（MCHC）（雌）、血小板数の増加（雌）がそれぞれ有意に認められ

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

た。また 2mg/m³ 群では (MCHC) (雌) がみられたのみであった。これらの有意な変動は、いずれも用量関連性はみられず、相互の項目との関連性も認められなかった。

(2) 血液生化学的検査

血液生化学的検査は、以下の項目で行った。

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ASAT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALAT)、グルタミン酸脱水素酵素 (GLDH)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、アルカリフォスファターゼ (APh)、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT)、アルブミン、血糖、尿素、ビリルビン、胆汁酸、クレアチニン、総蛋白質、トリグリセリド、コレステロール、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、リン、塩素、T3、T4、TBC

表 3 血液生化学的検査 (有意差の認められた項目)

性別	雄			雌		
	2.0	20.0	200	2.0	20.0	200
群 (mg/m ³)						
グルコース			↑107			↑105
コレステロール						↑131
APh						↑120
胆汁酸						↑143
カルシウム				↓98		↑103
リン			↑133			

↑↓ : P<0.05、↑↓ : P<0.01 (ANOVA+Dunnet 検定)

表中の数値は対照群に対する変動率 (%)

4 週間曝露後では、20mg/m³ までは検体に関連があると考えられる濃度依存性の影響は認められなかった。200mg/m³ 群では、グルコースとリンの上昇が雄で、グルコース、コレステロール、アルカリホスファターゼ、胆汁酸及びカルシウム値が雌で統計学的に有意に上昇した。これらの変動に濃度関連性は認められないものの、肝機能への影響に関しては、雌は雄よりもやや感受性であるように思われた。

(3) 蛋白質電気泳動

蛋白質電気泳動は血清を用いて行った。

4 週間曝露後では、病理診断学的に関連があると考えられる濃度依存的な影響は認められなかった。

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

(4) 肝薬物代謝酵素

以下の項目について行った。

N-DEM(N-デメチラーゼ、アミノピリン-N-デメチラーゼ)

O-DEM(O-デメチラーゼ、p-ニトロアニソール-O-デメチラーゼ)

チトクローム P450 (P450)、トリグリセリド

表 4 肝薬物代謝酵素の測定 (有意差の認められた項目)

項目/性	雄			雌		
	2.0	20.0	200	2.0	20.0	200
N-DEM		↑123	↑145	↓78		↑215
O-DEM			↑189			↑205
P450			↑137			↑156

↑ ↓ : P<0.05、 ↑ ↓ : P<0.01 ANOVA+Dunnet 検定)

表中の数値は対照群に対する変動率 (%)

肝モノオキシゲナーゼ酵素の測定では、200mg/m³雌雄及び20mg/m³雄でN-DEM活性の濃度依存的な増加が認められた。O-DEM及びチトクロームP450活性は、200mg/m³群のみで統計学的に有意に増加した。総合的に、誘導の程度は雄よりも雌で著明であるように思われた。

6) 尿検査

一般尿検査は4週間の試験終了前に10匹/性/群について実施した。尿は、試験最終週付近でラットを代謝ケージに個別に収容し(給水瓶を装着し、粉末飼料を自由に摂取させた)、一晚(約4 p.m. ~8 a.m.)採取した。

以下の測定項目について、採取した尿を定量的(Q)または半定量的(SQ)に検査した。

尿浸透圧(Q)、比重(Q)、pH(Q)、尿量(Q)、蛋白質(Q)、糖(SQ)、潜血(SQ)、ビリルビン(SQ)、ウロビリノーゲン(SQ)、ケトン体(SQ)

検査結果に、特異的な濃度依存的な影響は認められなかった。細胞または半定量的検査項目に関しては、病理診断学的に意義のある影響は認められなかった。

7) 眼科学的検査

眼検査は、初回曝露前、曝露期間終了前及び曝露後の試験終了前に実施した。検

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。

査には間接検眼鏡(HEINE)を用いた。検査の5~10分前に、瞳孔を散瞳剤(ROCHE®)で散瞳させた。眼は、網膜、硝子体、水晶体、角膜及び眼の外表面の変化について検査した。

眼科的検査を実施(試験開始前、試験終了前)したが、透光体または眼底には検体による明らかな変化は認められなかった。

8) 剖検

曝露期間終了時(被験物質による最終曝露後1日)に、全生存例をペントバルビタールナトリウム(Nembutal®; 腹腔内注射)を用いて安楽死させ、心臓放血により屠殺した。全例について肉眼的病理検査を行った。特に気道に関連した変化が認められる動物の肉眼的剖検に考慮を払った。

曝露期間終了時の肉眼的病理検査では、群特異的または投与に関連した臓器傷害は認められなかった。

9) 臓器重量

以下の放血した臓器の重量を測定した。

副腎、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、卵巣、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺(半分、病理組織学的検査参照)、子宮

臓器重量-体重の関係は、実重量及び対体重比重量として示す(次頁表参照)。これらの算出の基準として用いた体重は動物の剖検前に測定した。補足的に臓器重量-脳重量の関係についても解析した。

表 5 臓器重量

性別	雄			雌		
	群 (mg/m ³)	2.0	20.0	200	2.0	20.0
実重量						
肝						↑117
肺	↑119		↑112			
対体重比重量						
心臓					↓94	
肝			↑112			↑114
肺	↑123		↑114			
脳比重量						
心臓					↓90	
肝						↑116
肺	↑123		↑113			

↑ ↓ : P<0.05、 ↑ ↓ : P<0.01 (ANOVA+Dunnet 検定)

表中の数値は対照群に対する変動率 (%)

200 mg/m³ 群雌雄の肝臓の実重量及び対体重比重量の増加を除いて、実重量及び対体重比重量では毒性学的に意義のある変化は認められなかった。2 及び 200 mg/m³ 群の雄では、肺重量が統計学的に有意に増加したが、一貫した濃度依存的な影響は認められなかった。また脳比重量においても一貫した濃度依存的な影響は認められなかった。したがって、この所見は検体によるものというより、むしろ偶発的であると思われる。

10) 病理組織学的検査

組織学的検査(少なくとも対照群及び 200 mg/m³ 群)では、以下の臓器を固定した。副腎、大動脈、脳(大脳、小脳、橋/延髄)、精巣、精巣上体、精囊(凝固腺を含む)、食道、眼、眼瞼、眼窩外涙腺、大腿骨、ハーダー氏腺、頭部(鼻及び副鼻腔を含む)、心臓、腸(十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸及び残りの腸)、腎臓、喉頭、肝臓、リンパ節(下顎及び腸間膜)、乳腺、卵巣、卵管、膵臓、下垂体、前立腺、唾液腺、坐骨神経、骨格筋(大腿)、皮膚(乳房部)、皮膚(鼻端)、脊髄(頸部、胸部、腰部)、脾臓、胸骨、胃(前胃及び腺胃部)、胸腺、甲状腺及び上皮小体、舌、気管、尿管、尿道、膀胱、子宮及び頸部、膣、識別部位(入墨した耳)及び肉眼的所見が認められたすべての臓器または組織。固定が予定されてなく肉眼

的变化が認められた臓器についても必要に応じて固定した。

病理組織学的評価の結果(表6)から、気道では検体による所見は認められなかった。全例で肺の炎症性所見の発生率に増加が認められたが、通常の飼育条件に関連したものと考えられる。したがって、検体による呼吸系への所見は認められなかった。

ごく軽微または軽度の肝細胞肥大が雄の20及び200 mg/m³群及び雌の200 mg/m³群で、また、甲状腺の濾胞上皮の軽度肥大が200mg/m³群の雄2例で認められ、これらは検体の曝露に関連したものと考えられる。これらの所見は、先の各投与経路によるラットの試験から、検体に関連していることが知られている。本試験の動物で認められたその他の所見はいずれも自然発生的なものと考えられる。

表6 主な病理組織学的所見

項目	曝露量 (mg/m ³)	雄				雌			
		0	2	20	200	0	2	20	200
【検査数】		10	10	10	10	10	10	10	10
肺									
巢状炎症性細胞浸潤		4	5	3	6	4	5	6	4
巢状中隔の肥厚		4	2	3	2	0	0	3	2
細胞内マクロファージ		2	2	3	4	0	0	3	2
気管									
巢状炎症性細胞浸潤		3	6	5	5	4	4	4	1
肝臓									
肝細胞肥大		0	0	5	7	0	0	0	4
単細胞壊死		3	4	4	5	2	1	3	3
精巣									
精細管変性		2	1	0	0	—	—	—	—
甲状腺									
濾胞上皮の肥大		0	0	0	2	0	0	0	0

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。

以上のことから、 $200\text{mg}/\text{m}^3$ (実測値 $143.4\text{ mg}/\text{m}^3$) では、体重減少 (雄)、体温低下 (雌雄)、アルカリホスファターゼ (雌)、リン (雄)、グルコース (雌雄)、コレステロール (雌)、胆汁酸 (雌) 及びカルシウム値 (雌) の上昇、N-デメチラーゼ、O-デメチラーゼ及びチトクローム P450 活性の増加 (雌雄)、肝臓の実 (雌) 及び対体重比 (雌雄) 重量の増加、軽微または軽度の肝細胞肥大 (雌雄)、甲状腺の濾胞上皮の軽度肥大 (雄) などがそれぞれ認められた。 $20\text{mg}/\text{m}^3$ (実測値 $18.2\text{ mg}/\text{m}^3$) では、N-デメチラーゼ活性の増加、軽微または軽度の肝細胞肥大が雄に認められた。

したがって、本試験における無毒性量は、 $2.0\text{mg}/\text{m}^3$ (実測値 : $2.0\text{mg}/\text{m}^3$, $0.7\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$) であると判断される。

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

(2) ラットを用いた 90 日間反復吸入毒性試験

(資料 No. 原体-14)

13 生産第 3986 号「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成 12 年 11 月 24 日付け 12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知) の運用についての「4. 試験成績の除外について」(2) ⑪のイの規定に基づき下記の理由により試験を省略した。

- ・ 急性吸入毒性試験の結果から、著しく強い吸入毒性が認められない。

9. 反復経口投与神経毒性

チアクロプリドのラットを用いた亜急性神経毒性試験

(資料No. 原体-15)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1997年6月3日

検体の純度：96.6%(1995年4月)、97.5%(1995年10月)、96.7%(1996年4月)

試験動物：Fischer344ラット、1群雌雄各12匹

(12匹全て神経行動学的検査用とし、この内半数は神経病理学的検査に用いた。)

試験開始時平均体重：雄194g、雌131g(9週齢)

試験期間：13週間

試験目的：13週間の連続曝露での混餌投与によって発現する、神経毒性作用の可能性についての情報を得ることを目的とした。

【投与方法】

検体を0(対照群)、50、400及び1600ppmの濃度で飼料に混入し、13週間にわたって摂食させた(主群)。検体を混入した飼料は週毎に調製した。なおコーン油を溶媒として用い1%(w/w)溶液として使用した。

投与用量設定の根拠；

0、25、100、400及び1600ppmを飼料に添加して13週間投与したラット試験(資料No. 原体-9)の結果に基づいて、本試験の投与量が決定された。この試験でのNOAELは、雌雄ともに100ppmであった。100ppm群の雄に肝臓ミクロゾームの酵素活性の増加が観察され、400ppm以上の群では、これに加えて肝臓重量の増加及び肝細胞の肥大が認められた。また、甲状腺に対する影響(T3、TBC及び重量の増加)がみられた。また1600ppm群では、雌雄共に14~17%の体重増加の抑制がみられた。これらの結果に基づき、0、50、400及び1600ppmの用量が提案された。1600ppmは、本試験では、MTDを上回るものであり、毒性症状を発現させるための用量として選択された。

【試験項目及び結果】

1) 飼料中の被験物質の分析

本試験に使用された飼料中の実際の被験物質濃度は、設定濃度0、50、400及び1600ppmに対して平均86.6%から95.4%であった。これらの結果に基づき、分析により確認された飼料中実測濃度は、0、43.3、357及び1527ppmであった。

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

2) 臨床観察、体重及び摂餌量

臨床観察

臨床症状及び生死を少なくとも1日2回（週末と休日は1回）観察した。中毒症状について詳細な身体検査を週1回実施した。

最終計画屠殺以前に死亡した動物はなかった。試験期間中、雌雄共に投与に起因すると思われる所見は認められなかった。

したがって、臨床観察における無毒性量（NOEL）は、雌雄共1600 ppmである。

体重

体重の測定は週1回行った。病理組織学的検査のために灌流固定を行った動物についても、屠殺日に最終体重の測定を行った。

1600 ppm群の雄の体重は、投与7日目に対照群に比し平均12%の増加抑制を示した。それ以後、試験全期間を通してこの群の平均体重は有意に低い傾向を示した。同群の雌では、投与7日目に対照群に比し6%の低下がみられたが、その後対照群と同等の値まで回復した。

摂餌量及び検体摂取量

摂餌量の測定は週1回行った。

400 ppm群における摂餌量の減少は、雌雄共投与第1週に限られ、対照群に比し平均8-10%の減少を示した。以降雌雄共対照群と同等の摂餌量を示した。1600 ppm群では、雌雄共第1週では対照群に比し平均34-37%の減少を示し、残りの週における減少は約6-15%であった。試験期間を通しての同群での体重1 kgあたりの平均摂餌量の減少は、雄は6%、雌は4%であった。

雌雄における平均1日あたりの検体の摂取量は、設定濃度0、50、400及び1600 ppm濃度飼料を分析して得た実測濃度から計算すると次のようであった。

雄 : 0、2.94、24.2、101 mg/kg/日

雌 : 0、3.41、27.9、115 mg/kg/日。

[申請者追記] 400 ppm群雌雄第1週にみられた摂餌量の減少は、一週間毎の測定であり、対照群と比べて10%未満の減少で体重では有意差が認められていないことから、単回投与による急性毒性影響とは判断しなかった。また、亜急性経口毒性試験（資料No. 原体-9）では同じ400 ppm群で影響が認められていない。

3) 機能観察試験（FOB）、運動能及び移動運動能試験

本試験に割り当てられた動物は、全て4回（検体投与前の週に1回、投与4、8及び13週後）にFOB及び運動能試験を行った。

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。

FOB

FOBは、握力、着地開脚幅、立ち直り反応など*により記載された一連の試験法に準拠した。

全用量群において雌雄共投与に起因する影響は見られなかった。多くの用量群で起こった症状は、偶発的なもので投与に関連するものではないと考えられる。見られた偶発的な所見は、涙液の着色及び空中立ち直り反応の不全（雌雄）であった。これらの所見は、対照群を含む用量群でもみられ、その発生頻度も低いものであった。また、1600ppm群雄に後肢の握力低下がみられたが、差はわずかであり、雌では全投与群に見られなかったことから投与に起因するものではないと考えられる。

これらの結果からFOBに対するNOELは、雌雄共1600ppmである。

運動能及び移動運動能

運動能試験は、8の字型迷路法を用い自動化運動能測定装置で行った。

運動能及び移動運動能は、90分間のセッション、及び各々10分のインターバルで試験した。運動能は、セッション中に赤外線のリレーを遮った回数により測定した。移動運動能は、ラットが迷路中で新しい場所に移動し、別のリレーの中の一つを遮る回数を計測した。順応性はセッション内の運動量の減少割合として評価した。

多くの用量群の雌雄でみられた僅かな運動能及び移動運動能の増加あるいは減少は、統計的に有意差はなく、偶発的なもので、投与に関連したものではないと考えられた（表参照）。同様に、順応性も、どの用量においても検体の投与には影響されなかった。

これらの結果から、運動能及び移動運動能に関して、NOELは雌雄共1600ppmである。

*: , "Screening Approaches to Neurotoxicity : A Functional Observational Battery",

J. Am. Coll. Toxicol., 1989, 8, pp. 85-93.

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。

運動能試験結果の要約（対照群との対比%）

雄

用量(ppm)	処理前	投与4週後	投与8週後	投与13週後
0	523±192	505±123	595±145	534±148
50	601±211(+15)	552±135(+9)	504±171(-15)	486±156(-9)
400	584±192(+12)	528±159(+5)	537±168(-10)	491±220(-8)
1600	619±192(+18)	522±149(+3)	500±94(-16)	482±86(-10)

雌

用量(ppm)	処理前	投与4週後	投与8週後	投与13週後
0	795±192	831±281	834±204	880±264
50	953±214(+20)	910±185(+10)	988±319(+18)	1147±585(+30)
400	907±181(+14)	867±339(+4)	971±385(+16)	1062±359(+21)
1600	880±293(+11)	820±187(-1)	928±236(+11)	898±224(+2)

試験セッションにおける遮光回数：平均値±標準偏差 N=12

表中の()値は、対照群に対する変動率(%)

移動運動能試験結果の要約（対照群との対比%）

雄

用量(ppm)	処理前	投与4週後	投与8週後	投与13週後
0	197±76	181±42	223±68	227±81
50	230±89(+17)	196±43(+8)	185±77(-17)	208±88(-8)
400	202±59(+3)	187±61(+3)	207±71(-7)	211±119(-7)
1600	236±78(+20)	183±61(+1)	179±36(-20)	196±40(-14)

雌

用量(ppm)	処理前	投与4週後	投与8週後	投与13週後
0	291±85	267±111	299±97	298±91
50	365±92(+25)	339±88(+27)	363±126(+21)	411±221(+38)
400	320±77(+10)	278±111(+4)	331±140(+11)	365±124(+22)
1600	312±91(+7)	270±70(+1)	324±87(+8)	319±87(+7)

試験セッションにおける遮光回数：平均値±標準偏差 N=12

表中の()値は、対照群に対する変動率(%)

4) 眼科学的検査

投与前及び投与終了前(12週)に眼科学的検査を実施した。

瞳孔反射試験はペンライトあるいは透光器を用いて行い、ついで散瞳剤を各々の眼に点眼し瞳孔を散大させた。散瞳後、眼瞼、結膜、房水、及び水晶体をスリットランプ顕微鏡を用い検査し、ガラス体液、網膜、脈絡膜、及び視神経円板は間接検査眼鏡及び集光レンズを用い検査した。

観察された眼科学的所見は、全て偶発的なものと考えられ、検体の投与に関連するものではなかった。

5) 剖検及び脳重量の測定

各用量群から最初の雌雄各6匹を灌流固定と組織採取のために選び、ペントバルビタールナトリウム(約50mg/kg)の腹腔内注射で深麻酔した。他の動物は、CO₂で窒息死せしめた。

剖検

剖検は、全臓器、体腔、剖面、外部開口部、及び体表の検査を含み行った。

最終屠殺時の全投与群の剖検において、観察された肉眼病変には雌雄共に検体関連のものはみられなかった。

脳重量及び最終体重

いずれの群でも脳重量及び最終体重に有意差は認められなかった。

6) 病理組織学的検査

灌流固定を行った対照群及び1600ppm群の動物から採取した脳及び脊髄(頸部、胸部、腰部)、ガッセル神経節(左右)、脊髄神経根、背根神経節、坐骨神経(左右)、脛骨神経(左右)、腓腹神経(左右)、両眼(視神経共)及び腓腹筋について病理組織学的検査を行った。

なお、神経組織及び骨格筋の検査のため以下の処理が行われた。

脳の8ヵ所の冠状切片、脊髄の3部位(頸部、胸部及び腰部)の横断面及び縦断面切片、及び馬尾状部(縦断面のみ)をパラフィン中に包埋してヘマトキシリン及びエオジン(H&E)で染色。後根神経節(背部及び腹部線維を含む)、ガッセル神経節、眼、視神経及び腓腹筋は、グリコールメタアクリレート(GMA)中に包埋して2-3µm厚に薄切し、改良Lee染色液で染色。末梢神経組織は、エポキシ樹脂中に包埋して1

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。

μm 厚に薄切し、トルイジンブルーで染色。脳及び脊髄の各部位から作製した別の切片は、ルクソールファーストブルー/クレジルバイオレット及びセビアームンガー (Sevier-Munger) 染色液で染色。

1600ppm群の動物には、検体の投与に起因するような神経組織及び骨格筋への何等の病理組織学的病変は認められなかった。従って、これより低用量群の動物の組織の検査は行わなかった。

これらの結果から、神経系及び骨格筋の範囲内での病理組織学的病変におけるNOAELは雌雄共、最高用量である1600ppmと判断される。

以上の結果から、本試験条件下、認められた影響は、400ppm以上の群における摂餌量の減少、1600ppm群での体重増加量の抑制のみであり、本試験における無毒性量NOAELは、50ppm（雄：2.94mg/kg/日、雌：3.41mg/kg/日）と判断した。また、検体のラットでの神経毒性を示す神経行動学的あるいは病理組織学的な所見が認められなかったことから、神経毒性に対する無毒性量（NOAEL）は、1600ppm（雄：101mg/kg/日、雌：115mg/kg/日）であると判断した。

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。

10. 28日間反復投与遅発性神経毒性

(資料 No. 原体-16)

13 生産第 3986 号「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成 12 年 11 月 24 日付け 12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知)の運用についての「4. 試験成績の除外について」(2) ⑬の規定に基づき下記の理由により試験を省略した。

- ・有効成分がリン酸エステル系で、かつ、コリンエステラーゼ阻害性を有する農薬以外の農薬である。