

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. 繁殖毒性及び催奇形性

(1) チアクロプリドのラットの繁殖性に及ぼす影響 (資料 No. 原体-20)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：1997年12月8日

検体の純度：97.5%(1995年10月)、96.7%(1996年4月)、97.0%(1996年11月)  
試験動物：SD系ラット，1群雌雄各30匹，投与開始時7週齢  
世代数：2世代，第一産児で継代  
試験期間：1995年11月～1996年8月  
投与期間：P世代；実験開始からF<sub>1</sub>産児の離乳時までの約19週間，  
F<sub>1</sub>世代；F<sub>2</sub>産児の離乳時までの約19週間

### 【投与方法】

検体をラット用標準飼料に0、50、300及び600ppmの濃度に添加し動物に自由に摂取させた。この調製では、検体をアセトン及びコーンオイル中に溶解／懸濁させ、これを飼料に加えた。アセトンとコーンオイルの使用量は同量とし、いずれの用量においても飼料の1%とした。

### 用量設定の根拠；

本試験の投与用量(0、50、300および600ppm)は、ラットを用いた混餌投与繁殖毒性予備試験(資料No. 原体-20に添付)及びラットを用いた13週間反復混餌投与毒性試験(資料No. 原体-9)の予備的な体重データに基づいて選定した。繁殖毒性予備試験では、0、100、400及び1600ppmの濃度を設定した。その結果、1600ppmでは母動物と児動物の体重増加の有意な抑制、摂餌量の減少、児動物の死亡及び組織学的所見(肝臓／肝細胞肥大と空胞化、甲状腺／ろ胞細胞の拡張)がみられた。400ppmでは組織学的所見において肝臓と甲状腺に各々1例に軽微な変化が認められたのみであった。100ppmでは母動物と児動物に何らの害作用は認められなかった。

【方法及び試験項目】

概要を次表にまとめた。

世代	期間(週間)	作業手順	試験項目
P	生育(10 週間) (交配前)		一般状態の観察(毎日) 体重及び摂餌量の測定(週 1 回), 性周期の判定(交配前 3 週間)
	交配 (最長 3 週間)	雌雄 1 対 1 で交配。 膣栓又は膣垢中の精子 の確認(妊娠 0 日)	交尾率の算定  交配終了時雄親動物の剖検
	妊娠(3 週間)		<u>雌親動物</u> 体重測定(妊娠 0, 6, 13, 21 日) 摂餌量測定(毎週 1 回)
	出産		<u>出産状況の観察</u> 新生児数, 死亡児数, 性比の算定、児動 物の体重測定と外表の観察
	哺育(3 週間)	出産後 4 日目各同腹児 数を雄 4 匹、雌 4 匹に調 整	<u>雌親動物</u> 体重測定(出産 0, 4, 7, 14, 21 日) 摂餌量測定(毎週 1 回) <u>児動物</u> 体重測定(出産 0, 4, 7, 14, 21 日) 児動物の外表及び症状観察, 出産後 4 日 目に淘汰された児動物の異常の観察
.....	離乳		<u>親動物</u> 病理組織学的検査, 臓器重量測定(甲状腺、肝臓、精巣、卵巣)
F <sub>1</sub>	生育(10 週間)	継代用の各群雌雄 30 匹 ずつ 30 腹から無作為に 選抜	<u>離乳児</u> 継代用以外の児動物について剖検,  (P 世代に準ずる)
	交配 (最長 3 週間)	(P 世代に準ずる)	
	妊娠(3 週間)		(P 世代に準ずる)
	出産		(P 世代に準ずる)
	哺育(3 週間)	(P 世代に準ずる)	
.....	離乳	(F <sub>1</sub> 世代に準ずる)	(F <sub>1</sub> 世代に準ずる)
F <sub>2</sub>	生育(3 週間)		

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。

繁殖性に関する指標；次の指標を算出した。

$$\begin{aligned} \text{交尾率 (\%)} &= \frac{\text{交尾が確認された雌動物数}^{\text{a)}}}{\text{雄と同居させた雌動物数}} \times 100 \\ \text{受胎率 (\%)} &= \frac{\text{受胎した雌動物数}^{\text{b)}}}{\text{交尾が確認された雌動物数}} \times 100 \\ \text{出産率 (\%)} &= \frac{\text{生存児を出産した雌動物数}}{\text{受胎した雌動物数}} \times 100 \\ \text{出生時生存率 (\%)} &= \frac{\text{一腹あたりの出生時生存児動物数}}{\text{一腹あたりの総児動物数}} \times 100 \\ \text{4日生存率 (\%)} &= \frac{\text{4日目の調整前の一腹あたりの生存児動物数}}{\text{一腹あたりの出産時生存児動物数}} \times 100 \\ \text{哺育率 (\%)} &= \frac{\text{21日における一腹あたりの生存児動物数}}{\text{4日目の調整後の一腹あたりの生存児動物数}} \times 100 \end{aligned}$$

a); 精子が確認されずに、妊娠した雌を含む, b); 出産又は着床痕を有する雌を含む

病理組織学的検査；全ての親動物について凝固腺，子宮頸部，精巣上部，肝臓，甲状腺，下垂体，前立腺，精囊，子宮，膣，肉眼病変部，身体標識部位を採取し、10%緩衝ホルマリン溶液中で固定した。卵巣と精巣をブアン液で固定した。

【結果】

1) 親動物の観察

一般観察

試験期間中、検体投与に起因した中毒症状は、いずれの世代においても認められなかった。また、P世代の50ppm（投与後14日）の雌1例、300ppm群の雌3例（いずれも妊娠24日、難産）、F<sub>1</sub>世代の0ppmの雌1例（妊娠11日）と600ppm群の雄1例（投与後111日）が死亡し、更にP世代の0ppmの雄1例（投与後92日）、300ppm群の雌1例（妊娠24日、難産）、600ppm群の雌3例（妊娠23/24日、難産）とF<sub>1</sub>世代の300ppmの雄1例（投与後8日）を切迫屠殺した。300ppmと600ppm群の難産を伴う死亡や切迫屠殺は別に考察しているように、追加試験（資料No. 原体20-1~20-6）の結果から、主として検体投与による母体に対する著しい毒性に起因したものと考えられた。

体重

生育期間ではP世代の600ppm群雌で体重増加の抑制が認められた。F<sub>1</sub>世代の600ppm群雌雄で体重増加の抑制が認められたが、この低値は離乳時の頃からのものであった。妊娠及び哺育期間のP及びF<sub>1</sub>世代の600ppm群でも体重増加の抑制が認められた。その他の群では体重増加には検体投与の影響はみられなかった。

摂餌量

P世代の全投与群の全期間において、摂餌量に統計学的に有意な変化は認められなかった。F<sub>1</sub>世代の雌雄の600ppm群の生育期間で摂餌量の増加が認められ、検体に関連した変化と考えられた。その他の群では摂餌量に検体の影響はみられなかった。

検体摂取量

投与量(ppm)		雄			雌		
		50	300	600	50	300	600
P世代	交配前	3.5	21	41	4.2	26	51
	妊娠	/			3.8	23	44
	哺育				7.0	44	85
F <sub>1</sub> 世代	交配前	4.2	26	53	4.1	25	51
	妊娠	/			3.6	22	43
	哺育				6.7	41	81

### 繁殖能

P世代及びF<sub>1</sub>世代において性周期、交配期間、交尾率、受胎率、出産率、妊娠期間について、検体による影響は認められなかった。

### 親動物の剖検及び臓器重量

剖検の結果、両世代共に検体に起因した肉眼的変化は認められなかった。

臓器重量では、50ppm群で両世代共に検体に影響した変化は認められなかった。

肝臓重量は、600ppm群の雌雄（両世代）において統計学的に有意に増加した。300ppm群の雄（P世代）および雌（F<sub>1</sub>世代）においても、肝臓重量が統計学的に有意に増加した。これらの影響は検体投与に関連したものであると考えられた。

甲状腺重量は、600ppm群のPおよびF<sub>1</sub>世代の雌雄親動物において統計学的に有意に増加した。300ppm群の雌（P世代）と雄（F<sub>1</sub>世代）においても、甲状腺重量が統計学的に有意に増加し、雄（P世代）においても増加傾向であった。これらの影響は検体投与に関連したものであると考えられた。

その他の所見は検体の影響とは考えられなかった。

### 病理組織学的検査

300ppm群と600ppm群の雌雄（両世代）で小葉中心性に肝細胞肥大が認められた。600ppm群においてこの変化は高頻度にみられたが、一般にその程度は軽微か軽度であった。肥大肝細胞の細胞質は好酸性であり、均質であった。一方、核は大きさを増す以外に具体的変化を示さなかった。300ppm群と600ppm群における肝細胞肥大は、剖検時に観察された肝臓重量増加と関連していると考えられた。

検体投与の影響と考えられる甲状腺のろ胞上皮細胞の肥大が、600ppm群の雄（P世代）と300ppm群および600ppm群の雌（P世代）ならびに雌雄（F<sub>1</sub>世代）に観察された。この変化はかなり微妙で、ろ胞全体の大きさの減少傾向を伴ったろ胞上皮細胞の肥大が特徴であった。ろ胞上皮細胞は、丈の低いものから高いものまで立方状に変化して細胞質が増大しており、肥大の診断の根拠とした。300ppm群と600ppm群におけるろ胞上皮細胞の肥大は、剖検時に観察された甲状腺重量の増加の原因と考えられた。

その他の病理組織学的所見は、検体投与に関係のない偶発的な変化と考えられた。

300および600ppm投与群のP世代の生殖器官には、難産の説明となるような病理組織学的所見は観察されなかった。また、子宮頸管における結合組織の性状を調べるために特殊染色（Verhoeff-Van Gieson染色）を施したが、意味のある病理組織学的所見は観察されなかった。

## 2) 児動物の観察

### 性比

児動物の性比において、検体に関連した影響は認められなかった。

### 同腹児数

同腹児数において、検体に関連した影響は認められなかった。

### 出生時生存率

両世代の 600ppm 群の出生時生存率の低下は統計学的に有意ではないが、検体投与に関連する可能性があると考えられた。

50ppm 群および 300 群の  $F_1$  産児の出生時生存率 (それぞれ 96 と 95%) は、次に述べる理由から対照群より有意な低値ではないと考えられる。1.  $F_2$  産児では対照群と同等であること。2.  $F_2$  産児の対照群の値は、 $F_1$  産児の 50ppm 群および 300ppm 群の値とほぼ同じであること。3. 用量反応関係が認められなかったこと。4. 出産時の背景対照データ ( $F_1$  産児: 97–100%、 $F_2$  産児: 97–100%) 中に同様の値が認められること。

### 4 日生存率及び哺育率

4 日生存率に両世代とも検体の投与による影響はなかった。なお、600ppm 群の  $F_1$  産児の 4 日生存率は対照群と比較して統計的に有意ではないが顕著な低値であった。この低値は親動物による児動物の食殺の増加によるものであり、食殺の児動物数を考慮すると、600ppm 群の 4 日生存率は 91% となり、背景データ (91–99%) の範囲内となる。なお出生時の観察と体重からでは児動物は正常と考えられ、食殺の原因は不明である。

哺育率には検体の投与による影響は認められなかった。

### 児動物体重

両世代とも雌雄 600ppm 群の出生時児動物体重は対照群と同等であったが、哺育 7 日後から体重増加の抑制が有意に認められた。300ppm 群では  $F_2$  産児の体重増加の抑制が哺育 14 日後からみられた。

### 児動物の剖検

4 日淘汰児動物及び 21 日離乳児について剖検した結果、両世代共に検体に起因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。

以上の結果より、2世代にわたって検体を飼料中に混入して投与した場合、600ppmでは一般毒性として親動物の体重増加の抑制、肝臓と甲状腺での重量の増加及び組織学的変化等が認められ、繁殖毒性の指標として児動物体重の増加抑制、出生時生存率のわずかな低下及び難産の増加が認められた。300ppm群では一般毒性として親動物に肝臓と甲状腺での重量の増加や組織学的変化等が認められ、繁殖毒性の指標として児動物体重の増加抑制及び難産の増加が認められた。50ppm群では検体による影響は認められなかった。

従って、無毒性量は、親動物に対して、50ppm(雄；3.5mg/kg/日，雌；4.2mg/kg/日)、児動物に対して50ppm\*並びに繁殖性に対して50ppm\*と判断される。

\*：申請者注 児動物に対して50ppm(4.2mg/kg/日)、繁殖性に対して50ppm(4.2mg/kg/日)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。

	世代		親：P, 児：F <sub>1</sub>				親：F <sub>1</sub> , 児：F <sub>2</sub>			
	投与用量(ppm)		0	50	300	600	0	50	300	600
検体摂取量#	♂	-	3.5	21	41	-	4.2	26	53	
	♀	-	4.2	26	51	-	4.1	25	51	
動物数	♂	30	30	30	30	30	30	30	30	
	♀	30	30	30	30	30	30	30	30	
死亡/屠殺動物	♂1	♀1				♀1		♂1	♂1	
難産による死亡/ 切迫屠殺雌				4	3					
一般観察										
親	体重				♀低下				♂♀低下	
動物	摂餌量								♂♀増加	
動物	性周期(日/周期)	4.2	4.3	4.3	4.1	4.7	5.3	4.7	4.8	
動物	交尾率(%)	100	100	100	100	100	100	100	100	
動物	受胎率(%)	93.3	100	93.3	100	86.7	93.3	86.7	93.3	
動物	出産率(%)	100	100	82.1	90.0	96.2	100	100	96.4	
動物	妊娠期間(日)	22.2	22.3	22.4	22.4	22.3	22.3	22.3	22.2	
動物	剖検									
動物	最終体重								♂↓85 ♀↓95	
動物	臓器重量			A	R	A	R	A	R	
動物	肝臓 ♂ (%)			↑117	↑115	↑129	↑128			
動物	肝臓 ♀ (%)					↑118	↑123	↑116	↑118	
動物	甲状腺 ♂ (%)					↑125	↑124		116	
動物	甲状腺 ♀ (%)			↑114	↑123	↑121	↑125			
動物	精巣 ♂ (%)								↑122	
動物	卵巣 ♀ (%)								↑114	
動物	病理組織所見	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀	
動物	肝細胞肥大	0/0	0/0	10*/10*	28*/26*	0/0	0/0	18*/16*	27*/29*	
動物	ろ胞上皮肥大	5/0	4/0	7/5*	20*/17*	6/4	7/4	13/18*	19*/25*	
児動物	児動物数(出生時)	314	360	290	282	306	347	318	313	
	死亡児数(出生時)	2	16	13	16	9	14	8	18	
	出生時同腹児数	11.2	12.4	12.1	10.4	12.2	12.4	12.2	11.2	
	出生時生存率(%)	99.1	95.8	94.9	91.0	95.8	95.9	96.6	90.2	
	4日生存率(%)	97.4	91.5	89.9	82.8	93.9	98.1	94.5	91.6	
	哺育率(%)	99.6	96.6	98.8	99.5	99.0	99.6	98.1	98.1	
	性別(%) 雄	57.1	53.4	50.7	51.1	44.1	53.2+	48.5	52.5+	
	哺育児体重0日	6.6	6.7	6.5	6.5	6.6	6.6	6.6	6.4	
	4日(選抜後)	10.2	10.0	9.8	9.5	10.1	10.5	9.7	9.3	
	7日	15.4	15.6	15.0	↓14.1	15.6	16.1	14.8	↓13.9	
14日	29.5	29.6	27.4	↓25.4	30.5	31.2	↓27.9	↓25.8		
21日	47.7	48.7	43.9	↓40.7	50.2	49.5	↓45.7	↓40.1		
動物	剖検									

#:交配前期間, \*:P<0.05, \*\*:P<0.01(χ<sup>2</sup>検定),

↑↓:P<0.05, ↑↓:P<0.01(ANOVA+Dunnnett検定) +;P<0.05 Kruskal-Wallis 検定 + Dunn 検定

A:臓器重量, R:対体重比 c:♂/♀

空欄は所見が認められなかった。



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。

(1-1) チアクロプリドのラットの1世代繁殖性試験

(ラット2世代混餌繁殖試験P世代にみられた難産及び死産の増加に関する再現性試験)

(毒性資料 No. 20-1)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：1998年5月12日

検体の純度：96.7% (1996年4月)、97.0% (1996年11月)

試験動物：SD系ラット、1群雌各30匹、雄15匹、投与開始時7週齢

世代数：1世代

試験期間：1996年8月～1997年1月

投与期間：P世代；実験開始からF<sub>1</sub>産児の出生後4日まで

【目的】

この試験は、2世代繁殖試験で観察された難産及び死産数の増加に関する再現性を確認するために実施された。死産に再現性があれば、低用量がこの評価項目に対する無毒性量 (NOAEL) として選択されることになる。

【投与方法】

検体をラット用標準飼料に0、25、300及び1000ppmの濃度に添加し動物に自由に摂取させた。

用量設定の根拠；

本試験の投与用量は、ラットを用いた混餌投与繁殖毒性予備試験 (毒性資料 No. 20 に添付) 及び2世代繁殖試験 (毒性資料 No. 20) の結果に基づいて選定した。その根拠は、以下に示した。

- a. 低用量は無毒性量 (NOAEL) を確認するために選択された。2世代試験における低用量は50ppmであったが、この濃度がNOAELであるかどうかは定かではなかった (F<sub>1</sub>世代の死産児数に基づき)。
- b. 中用量は、この用量が2世代繁殖性試験の中用量である事、また難産がこの用量のP世代で観察された結果に基づき、再度この中用量を用いて2世代繁殖性試験の結果との関連づけて行い、また用量相関性を確定するために選定された。
- c. 2世代繁殖性試験 [資料No. 原体-20] における高用量より67%高い用量である本試験の高用量は、出産時における影響を見出す可能性を高めるために選定された。ラットを用いた慢性/発がん性併合試験 (資料No. 原体-20) によると1000ppmに極端な毒性はなく、また用量設定の繁殖試験の結果から受胎に悪影響は予想されなかった。

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。

【方法及び試験項目】

概要を次表にまとめた。

世代	期間(週間)	作業手順	試験項目
P	生育(10週間) (交配前)		一般状態の観察(毎日) 詳細な観察、体重及び摂餌量の測定(週1回)
	交配 (最長3週間)	雌雄2対1で交配。 膣栓又は膣垢中の精子の確認(妊娠0日)	交尾率の算定
	妊娠(3週間)		交配終了時雄親動物の剖検 <u>雌親動物</u> 体重測定(妊娠0, 6, 13, 20日) 摂餌量測定(毎週1回)
	出産		<u>出産</u> 出産状況の観察、児動物数、死亡児数、 児動物の体重測定と外表の観察
	哺育(4日間)		<u>雌親動物</u> 体重測定(出産0, 4日) 摂餌量測定(生後0~4日) <u>児動物</u> 体重測定(出産0, 4日) 児動物の外表及び症状観察
屠殺	生後4日	<u>児動物</u> 生後4日に屠殺 <u>雌親動物</u> 剖検、臓器重量測定(甲状腺、肝臓、卵巣)	

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。

繁殖性に関する指標；次の指標を算出した。

$$\text{交尾率 (\%)} = \frac{\text{交尾が確認された雌動物数}^{\text{a)}}}{\text{雄と同居させた雌動物数}} \times 100$$

$$\text{受胎率 (\%)} = \frac{\text{受胎した雌動物数}^{\text{b)}}}{\text{交尾が確認された雌動物数}} \times 100$$

$$\text{出産率 (\%)} = \frac{\text{生存児を出産した雌動物数}}{\text{受胎した雌動物数}} \times 100$$

$$\text{出生時生存率 (\%)} = \frac{\text{一腹あたりの出生時生存児動物数}}{\text{一腹あたりの総新生児数}} \times 100$$

$$\text{4日生存率 (\%)} = \frac{\text{4日目の調整前の一腹あたりの生存児動物数}}{\text{一腹あたりの出生時生存児動物数}} \times 100$$

a);精子が確認されずに、妊娠した雌を含む, b);出産又は着床痕を有する雌を含む

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】

### 1) 親動物の観察

#### 一般観察

1000ppm群の動物に、蒼白、呼吸困難及び冷感などの検体投与関連の症状が観察された。

#### 親動物の死亡率

1000ppm群では5匹の雌動物が死亡した(死亡後発見あるいは早期屠殺)。1匹は交配前に死亡した。残りの4匹は、妊娠22日から24日に死亡し、そのうち2匹は出産開始時に死亡した。妊娠期の最終段階で4匹が死亡したことから、1000ppmの検体の毒性がラットの妊娠期の最終段階で強く現れたものと考えられる。

#### 体重

##### 雌雄動物(交配前)

統計的に有意で、かつ検体投与関連の体重増加の抑制(-6%)が交配前期の最終3週間に1000ppm群の雌動物に観察された。

#### 妊娠及び哺育期

妊娠期間中において、統計学的に有意な検体投与に関連する低体重(対照群と比較して-6から-12%)が1000ppm群に観察された。

哺育期間中においても、統計的に有意な検体投与関連の低体重(対照群と比較して-10から-12%)が1000ppm群に観察された。300ppm群の哺育0日での統計的に有意な低体重(対照群と比較して-5%)は偶発的なものと考えられる。

#### 摂餌量

摂餌量にはいずれの期間中にも検体投与関連の影響はなかった。

#### 検体摂取量

投与量(ppm)		雄			雌		
		25	300	1000	25	300	1000
P世代	交配前	2	20	69	2	23	75
	妊娠				2	20	35
	哺育				2	35	119

#### 繁殖能

##### 同居開始から交尾までの日数

同居開始から交尾までの日数には検体投与関連の影響は見られなかった。

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。

### 交尾率、受胎率及び出産率

交尾率、受胎率及び出産率には検体投与関連の影響はみられなかった。

### 妊娠期間

妊娠期間には検体投与関連の影響は見られなかった。

### 分娩

25ppm群と300ppm群における出産過程には検体投与関連の影響は見られなかった。1000ppm群では、2匹の母動物が分娩開始後24時間以内に死亡した。これは、最初の児動物を出産してから次の出産まで長い時間を要した（児動物は子宮内で死亡していた）ことによる難産の影響と考えられる。1匹の母動物は、妊娠24日に分娩することなく死亡しているのが発見された。検体の母体毒性に影響したものであると推察された。

1000ppm群では顕著な毒性が観察されたので、難産及び出産開始の遅延はおそらく毒性によるものと考えられる。

分娩（すなわち、最初の収縮/出血）開始から第1児出生までの時間、及び出生間隔には対照群と投与群間には統計学的に有意な差は認められなかった。

### 着床痕

着床痕数に検体投与に関連する影響は見られなかった。

## 2) 新生児の観察

### 腹あたりの産児数

1000ppm群で統計学的に有意な産児数の減少（対照群12.5に対し、1000ppm群9.9）が見られた。出生時生存率または着床痕数には検体投与関連の影響が見られないことから、この腹あたりの産児数の減少は生物学的に意味がないものと考えられた。以上のことから腹あたりの産児数に検体投与に関連する影響はないと考えられた。

### 児動物の性比

児動物の性比には検体投与に関連する影響は見られなかった。

### 出生時生存率

出生時生存率に検体投与関連の影響は見られなかった。また、死産児数にも検体投与関連の影響は見られなかった。

### 4日生存率

1000ppm群で統計学的に有意な生存率の低下が見られ検体の影響と考えられた（対照群98%に対し、1000ppm群76%）。

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。

### 新生児の体重

#### 哺育0日の体重

哺育0日目の体重に検体投与関連の影響は見られなかった。

#### 哺育4日目の体重

1000ppm群に哺育4日目の体重の統計的に有意な減少（-14%）が見られた。

### 臨床観察

1000ppm群に検体投与に関連する「衰弱」した臨床症状を示した児動物がより多くみられた。これは生存率の低下と関連しているものと考えられた。

### 剖検

剖検結果に検体投与に関連する所見は見られなかった。得られた所見はすべて偶発的なものであった。

### 臓器重量及び最終体重

最終体重及び臓器重量はすべて雌親動物で行った。しかし、妥当な比較を行うため、試験終了時に屠殺した動物から得られたデータのみを統計的に分析した。

1000ppm群では最終体重に統計的に有意な減少（-8%）がみられた。

1000ppm群で甲状腺及び肝臓の絶対及び相対重量の増加が見られた。300ppm群でも肝臓重量は増加した（対照群より10%増加）。これらの所見は検体投与関連のものと考えられる。

1000ppm群動物の卵巣の相対重量が増加したが、絶対重量は増加しなかった。卵巣の相対重量の増加は、最終体重の減少による偶発的なものと考えられる。

以上のことから、親動物では、1000ppm群で、臨床症状として蒼白、呼吸困難及び接触無反応がみられ、5匹が死亡し、そのうち4匹は難産を呈し、1匹は交配前に死亡した。また、交配前、妊娠期間、哺育中の低体重（雌）が認められ、肝臓及び甲状腺重量の増加が観察された。300ppm群では肝臓重量の増加がみられた。25ppm群で影響は認められなかった。児動物では、生後4日の低体重及び4日生存率の低下が認められた。

本試験における無毒性量は、親動物に対して25ppm（雄；2mg/kg/日，雌；2mg/kg/日）、児動物及び繁殖性に対して300ppm（雄；20mg/kg/日，雌；23mg/kg/日）であると判断した。

2世代繁殖試験との比較では、共通の投与量の300ppmで本試験では難産は観察されなかったが、2世代繁殖試験の高用量の600ppm群でみられた難産と出生時生存率低下に対しては、本試験では1000ppm群で難産のみがみられ、出生時生存率への影響は認められなかった。

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

世代		親 : P, 児 : F <sub>1</sub>			
投与用量 (ppm)		0	25	300	1000
検体摂取量 <sup>#</sup>	♂	-	2	20	69
	♀	-	2	23	75
動物数	♂	30	30	30	30
	♀	30	30	30	30
死亡 (交配前)					♀1
死亡/難産 (妊娠 22~24 日)					4
一般観察					蒼白、呼吸困難、接触無関心
親	体重				♀低下
動物	摂餌量				
動物	同居から交尾までの日数	3.1	4.8	4.1	3.6
動物	交尾率 (%)	100	100	100	93.3
動物	受胎率 (%)	90	86.7	83.3	89.3
動物	出産率 (%)	100	96.2	100	80
動物	妊娠期間 (日)	22.3	22.2	22.3	22.3
動物	着床痕	12.9	12.3	12.5	11.6
動物	性比 (%雄)	48.6	48.4	44.9	52.6
剖検					
最終体重					↓92
臓器重量				A	R
肝臓 ♀ (%)					↑110
甲状腺 ♀ (%)					↑122
卵巣 ♀ (%)					↑132
					↑118
					↑133
					↑108
児動物	総児動物数 (出生時)	337	292	291	198
	死亡児数 (出生後)	4	3	9	14
	死産児数	13	5	15	15
	出生時同腹児数	12.5	11.7	11.6	9.9**
	出生時生存率 (%)	96.5	98.3	94.9	91.1
	4 日生存率 (%)	97.6	98.0	95.0	76.4*
	体重 0 日	6.7	6.6	6.8	6.5
	4 日	10.3	10.4	10.2	↓8.9

#: 交配前期間, \*, P<0.05, \*\*, P<0.01 (Kruskal-Wallis+Dunn 検定) ↑ ↓; P<0.05 (ANOVA+Dunnett 検定)

空欄は所見が認められず。

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。

(1-2) チアクロプリドを妊娠 18 日から 21 日まで投与したラットの難産誘発発生を調べる試験  
(資料 No. 原体-20-2)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1998 年 7 月 24 日

検体：96.7% (1997 年 4 月)、97.0% (1996 年 11 月)

試験動物：SD 系ラットの妊娠動物、対照群 10 匹、投与群 36 匹

試験期間：8 日間 [1996 年 7 月 8 日～7 月 15 日]

### 【目的】

検体を用いた 2 世代繁殖試験の P 世代において、難産が認められた。検体は、動物の分娩前に最低 13 週間投与したことから、検体によると考えられる難産が妊娠末期の検体の曝露によって誘発されるかどうかは不明であった。本試験の実施目的は、1. 難産が妊娠 18-21 日の検体投与によって起こり得るかどうかを検討するため、2. 難産が起こるとすれば、予想されるメカニズムに関する所見を得るため、3. 分娩が照明サイクルの交替によって同調化されるかどうかを検討するために行った。

### 【試験方法】

検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース及び 0.4%Tween80 水溶液に懸濁させた。妊娠 18 及び 19 日に 100mg/kg を、10mL/kg の容量で強制経口投与したが、著明な毒性が認められたために、妊娠 20 日には、容量を 5mL/kg とし、50mg/kg となるように動物に投与した。妊娠 21 日にも投与することとしたが、投与群のラットが妊娠 21 日に分娩し始めたので、妊娠 20 日の投与を最終投与とした。

照明サイクルと分娩を同調化させるために、妊娠 8 日に雌 23 匹を夜間の 14 時間点灯及び 10 時間消灯の照明サイクルとした飼育室に收容した(21:00～11:00 の照明)。妊娠 22 日に 14 時間照明サイクルの全例を、再び通常の 12 時間照明サイクルの飼育室に收容した。

### 投与量の設定の理由

投与群の用量は、100mg/kg/日の用量は、ウイスターラットを用いた検体の催奇形性試験(資料 No. 原体-21)の結果に基づいた。50mg/kg/日の用量では、母動物の体重及び摂餌量の減少、後期吸収胚数の増加及び胎児の体重減少などの毒性が認められた。本試験での投与期間を催奇形性試験の 13 日間(器官形成期)に対して 4 日間(妊娠



後期)と短縮したので、100mg/kg/日の用量を本試験に用いた。

## 【試験項目及び結果】

### 1). 臨床症状の観察及び体重

#### 臨床症状の観察

観察は、妊娠7日から分娩完了まで毎日少なくとも1回観察した。

検体に関連した臨床症状として、鼻の汚染、排糞の消失、排糞の減少、活動性の低下、振戦、呼吸困難及び冷触感が認められた。100 mg/kg/日の用量は、ラットにきわめて毒性があり、投与開始後の翌日に臨床症状が認められた。

#### 死亡率

投与群の母動物1例(No. 32)は、分娩完了後の妊娠22日に死亡が発見され、母動物1例(No. 6)は分娩が認められずに、妊娠22日に死亡が発見され、母動物2例(No. 38及び41)は、それぞれ妊娠22及び21日の分娩時に切迫屠殺した。母動物No. 38は約22時間の分娩が続いていたことから、難産として分類し、屠殺した。難産は、剖検時に児がみられた子宮角の壊死及び検体の毒性によって起こったものと考えられる。

#### 体重

母動物の体重は、妊娠7日及び妊娠18-20の毎日測定した。

検体に関連した体重増加の抑制(9%)が妊娠19及び20日に認められた。(註：体重増加は両照明群の動物を一緒にして算出した)。

体重増加の抑制は、排便の減少または消失と関連しており、これは動物が飼料を摂取しないか、またはほとんど摂取しなかったことを示しているものと考えられた。

### 2) 出産経過

対照群の10例及び投与群の36例のうち、対照群の7例及び投与群の26例が妊娠した。対照群のラットはすべて正常分娩で、投与群では21例が正常分娩であった。死亡率の項で考察したように、母動物4例は、死亡または分娩時に屠殺し(母動物1例は難産と分類した)、母動物1例は分娩開始前に死亡した。

本試験に用いた用量によって著明な毒性が認められたことから、母動物1例で認められた難産は、母体毒性によって誘発されたものと考えられた。

逆転した14時間照明サイクルによる出産過程への影響に関しては、通常の12時

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。

間照明サイクルで維持した動物と、逆転した 14 時間照明サイクルで維持した動物との間で、分娩時間の差は認められなかった。

以上のことから、本試験の所見の概要を以下に要約する。

1. 本試験では、体重増加の抑制、死亡ならびに活動性低下及び排糞の減少または消失によって示されるように、著明な毒性が認められた。
2. 検体による難産が母動物 1 例にのみ認められた。この母動物で認められた難産は毒性によるものと考えられる。
3. 正常及び逆転した照明サイクルでは、動物の出産時間に差は認められなかった(すなわち、照明サイクルの交替による分娩の同調化はなかった)。

したがって、本剤の 100 mg/kg/日による妊娠 18 日から 20 日までの短期間強制投与では著明な毒性が認められたため、妊娠末期での難産誘発性は評価できなかった。

そこで、投与量を減らして、再度同様な試験が計画された。

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。

(1-3) チアクロプリドのラットにおける妊娠 18 日から 21 日の投与と難産との関係に関する試験  
(資料 No. 原体-20-3)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1998 年 5 月 4 日

検体：97.0% (1996 年 11 月)

試験動物：SD 系ラットの妊娠動物、対照群 27 匹、投与群 9～29 匹、  
投与開始時 17 週齢

試験期間：1997 年 1 月 27 日～3 月 10 日

### 【目的】

検体の 2 世代繁殖試験において親世代に難産及び死産が増加した。動物は少なくとも分娩まで 13 週間検体を投与されていたところから、検体投与によると考えられる難産及び死産が検体を長期間投与することによって生じるのか、あるいは分娩期間の最後の部分で投与されることにより生じるかは不明であった。すでに分娩時の問題が短期投与によって再現されるか否か、また想定されるメカニズムについての情報を得るために、検体を妊娠 18 から 21 日にかけて 100mg/kg/日の用量で投与した。しかし妊娠末期における 100mg/kg/日の用量では著しく強い母体毒性を発現した。そのため投与量を 17.5、35 及び 60mg/kg/日に下げ、難産に及ぼす影響を調べる短期試験を再度実施した。

### 【試験方法】

検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース及び 0.4%Tween80 水溶液に懸濁させた。本試験の投与量は、0 (溶媒)、35 及び 60mg/kg/日を強制経口投与した。35 及び 60mg/kg 投与群で毒性及び死亡が認められたところから、投与量として試験中に 17.5mg/kg/日を追加した。この群にはすべての投与群で妊娠 18 日に達していない動物、ならびに検体あるいは溶媒を投与されていなかった動物を割り当てた。

### 交配

交配は、2 匹の雌と 1 匹の雄を 21 日間連続同居させることで行った。各投与群について、ほぼ 1/3 が交配期間の最初の 3 日間で交配が成立した。交配確認後雌をプラスチック製分娩ケージに移した。交配が成立しなかった雌は除外した。

### 投与量の設定の理由

投与群の用量は、検体のラットにおける強制経口投与による難産解明試験の結果 (資料 No. 原体-20-2) に基づいて設定した。

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。

## 【試験項目及び結果】

### 1. 臨床症状の観察及び体重

#### 臨床症状の観察

通常の観察は、毎日少なくとも2回行った（週末を除く）。詳細な観察（動物をケージから取り出して観察）は、18日まで毎週1回、分娩完了まで毎日少なくとも1回観察した。

検体に関連した臨床症状として、自発運動低下、着色鼻汁及び透明膣排泄物が35及び60mg/kg群に観察された。

検体投与による臨床症状は17.5mg/kg群では観察されなかった。

#### 死亡率

35及び60mg/kg群において、検体投与によると考えられる死亡が増加した（対照群、17.5、35及び60mg/kg群においてそれぞれ1/27、0/9、7/29及び8/25）。

#### 体重

母動物の体重を、妊娠0、6、13、さらに妊娠18から21日にかけて毎日測定した。

検体投与によると考えられる統計学的に有意な低体重が、35及び60mg/kg群において観察された。妊娠19日に体重が対照群に比しそれぞれ5%及び3%低下し、妊娠21日目にはともに14%低かった。17.5mg/kg群では、妊娠0日において対照群に比し体重が有意に高かった（対照群より7%高い）。しかし妊娠6、13、18、19、20及び21日目に有意な体重の差はなかった。

投与期間中の体重増加量では、投与3群においてすべて統計学的に有意かつ検体投与に相関した低下が観察された。妊娠18から21日までの体重増加量は、対照群、17.5、35及び60mg/kg群で41.3g、13.3g、-18.3g及び-24.9gであった。

#### 摂餌量

摂餌量は、妊娠0から6日、6から13日、13から18日に測定し、さらに妊娠18から21日にかけては毎日測定した。

統計学的に有意かつ検体投与に相関した摂餌量の低下が、検体の初回投与後にすべての投与群で観察された。17.5mg/kg群の摂餌量は対照群に比し36～54%低下し、35及び60mg/kg群の飼料摂取量は対照群に比し81～94%減少した。

#### 分娩成績

次頁表に各群の妊娠動物、死亡あるいは瀕死期に屠殺された妊娠動物数及び分娩母動物数を示す。

すべての投与群において難産はみられなかった。35及び60 mg/kg/日群のごとく、

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。

死亡動物が観察された重度の毒性量においても、検体を分娩末期に短期間投与しても難産を生じなかった。

用量群	動物数	妊娠動物数	死亡/瀕死動物	分娩母動物
対照群	27	21	1	21
17.5mg/kg	9	9	0	9
35mg/kg	29	29	7	22
60mg/kg	25	16	5	11

### 児動物の成績

児動物の生死を記録した。死亡児動物が死産であるかを確認するため、肺を水に浮かべた（生存児の肺は浮遊する）。

35及び60mg/kg群では、統計学的に有意かつ検体投与に関連した出生時生存率の減少がみられた（死産児数の増加）。出生時生存率は、対照群、35及び60mg/kg群においてそれぞれ99、83、及び71%であった。死産児は、母動物に著しい毒性がみられた投与量で生じたため、死産は検体の母動物への毒性によると考えられた。

### 剖検

母動物は、分娩の24から36時間後に二酸化炭素の吸入で屠殺し、死亡/瀕死動物についてのみ剖検した。児動物は分娩完了後麻酔液の注入により屠殺した。児動物の剖検はしなかった。

子宮内の児動物以外の剖検所見は、35mg/kg群の1例における流涎、60mg/kg群における1例の鼻部排泄物及び1例の流涎であった。

以上のことから、本試験の所見の概要を以下に要約する。

1. すべての3投与群において投与期間中著しい毒性が観察された。すなわち（1）対照群に比しての低体重（35及び60mg/kg群）、（2）著しい体重増加抑制（全投与群；35及び60mg/kg群では体重減少）、（3）著しい摂餌量減少（全投与群）、（4）死亡及び自発運動抑制等の臨床症状（35及び60mg/kg群）が認められた。
2. 検体投与群において著しい毒性症状が現れたにも関わらず、難産は認められなかった。
3. 検体の35及び60mg/kg群において死産の増加がみられた。

したがって、検体をラットの妊娠18から21日にかけて短期間の強制経口投与して

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。

も難産は生じなかったが、母体毒性の強い投与群においては死産児数を増加させた。繁殖における NOAEL は 17.5mg/kg である。一般毒性では 17.5mg/kg/日における体重増加抑制及び摂餌量の減少に基づいて NOAEL を設定できなかった。

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。

(1-4) 検体を投与したラットの難産及び死産の究明試験 (資料 No. 原体 20-4)

試験機関：

報告書作成年月日：1998年9月2日

検体：96.7% (1996年4月)、97.0% (1996年11月)、97.0% (1997年4月)

試験動物：SD系ラット、1群 雌 155匹、雄 30匹、供試時7週齢

試験期間：1996年9月3日～1997年2月25日

### 【目的】

検体の0、50、300及び600ppm用量を用いた2世代繁殖試験の第1世代で、難産が中及び高用量群で認められ、死産の僅かな増加が高用量群で認められた。本試験は、先の試験で認められた検体による分娩阻害作用のメカニズムを検討する第一段階として計画した。本試験では、妊娠3週目及び分娩時における子宮及び子宮頸部の機能的、器質的及び形態学的変化に及ぼす検体の影響を明確にすることであった。また、分娩阻害に係わる子宮及び子宮頸部の $\alpha$ アドレナリン作動性レセプターに及ぼす検体の影響について検討するために行った。

### 【試験方法】

本試験は、0 (対照群) 及び1000ppmの設定用量で、交配10週間前から検体を混餌投与した。

試験期間中、動物の検体による体重、摂餌量及び臨床症状に及ぼす影響について調べた。妊娠期間中に起こる子宮頸部の変化は、以下の方法により評価を行った。

1. 光誘発性蛍光測定によりコラーゲン濃度について評価した。
2. 子宮頸部の伸展性を測定した。
3. 子宮頸部の湿重量、乾燥重量及び水分量を測定した。
4. 組織学的検索

子宮については、以下の方法を用いた。

- 1 活動電位 (EMG) 及び機械的活性 (子宮内圧) を *in vivo* で評価した。
- 2 子宮収縮についてオキシトシン及びオキシトシンで刺激された子宮収縮を抑制するイソプレテレンール ( $\beta$  アゴニスト) を用いて評価した。
- 3 子宮の形態学的変化 (組織学的検査及び組織重量) を評価した。また、組織の神

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。

経支配への影響を介した検体による機能障害をみる方法として、子宮頸部及び子宮の $\alpha_1$ アドレナリン作動性レセプター結合性について調べた。

### 投与量の設定の理由

本試験の投与量は0及び1000ppmとした。2世代繁殖試験(資料No. 原体-20)の高用量より高い1000ppm用量は、分娩に影響を受ける可能性を高めるために選択した。用量設定の繁殖試験結果に基づき、1000ppmは受精能に悪影響を与えないものと予想された。

### **【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1~2回(週末と休日は1回)観察した。

検体の投与に起因する臨床症状は観察されなかった。

投与群では4匹死亡した。妊娠15日;1例、妊娠18日;1例、妊娠22日;1例(3例の児は出生して12例の胎児は子宮内)、試験92日;1例;非妊娠。

#### 2. 体重/摂餌量

全例について、毎週の体重及び摂餌量を以下のように測定した:雄では、投与開始から屠殺前約1ヶ月までの体重及び投与開始から交配前の期間までの摂餌量;雌では、交配前10週間の体重及び摂餌量。

#### 雌雄(交配前)

雄の体重では検体に関連した影響は認められなかった。雌では、統計学的に有意な検体に関連した体重増加の抑制(対照群より2%~6%抑制)が交配前14日から認められた。

交配前1週では、雄で18%及び雌で19%の統計学的に有意な検体に関連した摂餌量の減少が認められた。この著明な減少はその後の週には認められなかったことから、1週の摂餌量の減少は、飼料中検体に対するラットの一時的な忌避によるものと思われた。

交配前2~10週の雌雄の摂餌量では検体に関連した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。

### 検体摂取量 (mg/kg/日)

投与期間中の平均検体摂取量は以下の通りであった。

投与量 (ppm)	1000ppm	
	雄	雌
交配前	62	73

### 3. 各検査

各検査の測定方法を以下に示した。

#### 子宮頸部のコラーゲン濃度測定

子宮頸部のコラーゲン濃度は光誘発性蛍光より測定した。測定は妊娠 13 日から 1 日ごとに行うとともに、予定分娩日の妊娠 22 日に行った。測定は対照群の 9 匹及び投与群の 6 匹について行った。

(これらの検査は、 の 研究室で行った。)

子宮頸部のコラーゲン濃度を測定した光誘発性蛍光測定結果から、検体を投与した動物の子宮頸部は、対照群の動物の子宮頸部に比較して妊娠 13、15 及び 17 日に統計学的に有意に硬かった。しかし、19 日～22 日 (22 日には非分娩及び分娩動物が含まれる) では、対照群と投与群の動物とで子宮頸部の硬度に統計学的に有意な差は認められなかった。分娩前または分娩時の子宮頸部に及ぼす影響がなかったことから、2 世代繁殖試験で認められた難産は、子宮頸部のコラーゲンに及ぼす検体の影響によるものではなかった。

#### 子宮頸部の伸展性

子宮頸部の伸展性は、 の 研究室で妊娠 16、21 日及び妊娠末期について、また、 の 研究室で妊娠 21 日について行った。 の研究室では、投与群及び対照群の各 6 匹を妊娠 16 及び 21 日について評価し、投与群の 2 匹及び対照群の 4 匹を妊娠 22 日について評価した。 の研究室では、投与群及び対照群の各 10 匹について評価した。

子宮頸部の伸展性に関する検査結果から、妊娠 16、21 または 22 日の子宮頸部の伸展性では検体に関連した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。

### 子宮頸部の湿重量及び乾燥重量

子宮頸部の湿重量及び乾燥重量は、妊娠ラット 10 匹／投与群を用いて妊娠 21 日に評価した。(この検査は                      の                      の研究室で行った。)

子宮頸部の湿重量に関する測定結果、妊娠 21 日の子宮頸部の湿重量、乾燥重量または水分量では、検体に関連した影響は認められなかった。

### EMG 記録及び子宮内圧

EMG 記録(子宮の活動電位の測定)及び子宮内圧は、対照群の 5 匹及び投与群の 3 匹を用いて妊娠 18 日から分娩終了まで同一動物で毎日測定した。(これらの検査は                      の                      の研究室で行った。)

EMG 活性及び子宮内圧に関する測定結果から、検体に関連した子宮内圧または活動電位への影響は認められなかった。

### 子宮収縮性検査

対照群及び投与群の 4~6 匹の子宮組織片を用いて検査した: 1. 対照群及び投与群のラットの妊娠 16 及び 22 日についてオキシトシンの濃度-収縮の関係。2. 対照群及び投与群のラットの妊娠 16 及び 22 日についてイソプロテレノールの濃度-収縮抑制の関係。(この検査は                      の                      の研究室で行った。)

in vitro の子宮収縮性に関する検査結果から、妊娠 16 及び 22 日のオキシトシン(刺激性化合物)またはイソプロテレノール(抑制性化合物)に対する摘出した子宮組織の反応性では、検体に関連した影響は認められなかった。

### 組織学的評価

妊娠 21 日に屠殺した妊娠ラット 10 匹／投与群の子宮頸部及び子宮(胎児及び胎盤を除く)を 10%緩衝ホルマリンに採取し、ヘマトキシリン及びエオシン(H&E)染色ならびに筋肉、結合組織及び膠原線維を識別するための Verhoeff-Van Gieson 染色を用いて組織学的検査を行った。子宮頸部の 3 切片、すなわち前部(子宮側)、中央及び後部(膣側)を評価した。

その結果、検体に関連した子宮頸部または子宮への影響は認められなかった。

### $\alpha$ レセプター

妊娠 21 日に屠殺した妊娠ラット 15 匹／投与群の子宮について、 $\alpha_1$  アドレナリン

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

作動性レセプターの評価を行った。

アドレナリン作動性レセプター濃度を測定した結果、対照群及び投与群の母動物の平均 $\alpha_1$ レセプター濃度は、それぞれ 3.85 及び 3.89pmol レセプター/mg 蛋白質であった。従って、子宮の $\alpha_1$ アドレナリン作動性レセプター濃度に、検体に関連した影響は認められなかった。

#### 4. 剖検

母動物については二酸化炭素吸入により屠殺した。剖検は死亡/瀕死動物のみについて行った。

子宮頸部及び子宮の組織学的検査用の 10 匹については、最終体重および臓器重量（卵巣、子宮頸部、膣及び空の子宮）の測定、胎児数の算定及び肉眼的病理検査を行った。

投与群では、最終体重に検体投与に関連した減少が認められた（対照群の 85%）。また、腹当たりの胎児数が有意に減少した（対照群：12.9、投与群：7.7）。肉眼的病理所見および臓器重量については投与に関連した変化は認められなかった。

以上のことから、本試験の所見の概要を以下に要約する。

1. 体重増加抑制及び最終体重の減少が認められた。
2. 死亡数の増加が認められた。
3. 胎児数/腹の減少が認められた。
4. 子宮頸部の検査項目
  - a. 光誘発性蛍光により測定した子宮頸部のコラーゲン組織では、検体投与群のラットの子宮頸部が妊娠 13、15 及び 17 日に統計学的に有意に硬いことが示された。しかし、妊娠 19～22 日では子宮頸部の硬度に統計学的に有意な差は認められなかった（妊娠 22 日では非分娩及び分娩動物が含まれる）。分娩前あるいは分娩時の子宮頸部に影響がなかったことから、2 世代繁殖試験で観察された難産は検体による子宮頸部のコラーゲンに及ぼす影響ではなかった。
  - b. 妊娠 16、21 または 22 日の子宮頸部の伸展性では検体に関連した影響は認められなかった。
  - c. 妊娠 21 日の子宮頸部の湿重量、乾燥重量及び水分量では検体に関連した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。

d. 対照群と検体投与群の動物の子宮頸部では検体に関連した組織学的な差は認められなかった。

#### 5. 子宮の検査項目

a. オキシトシンで子宮収縮を刺激した場合の *in vitro* の子宮収縮性では検体に関連した影響はなく、また、オキシトシンで刺激された子宮収縮に対する  $\beta$  アゴニストのイソプロテレノールによる抑制に対しても検体による影響は認められなかった。

b. 検体に関連した子宮内圧または電気的活性への影響も認められなかった。

c.  $\alpha$  アドレナリン作動性レセプターの濃度では検体に関連した影響は認められなかった。

d. 対照群と検体投与群の動物の子宮では検体に関連した組織学的な差は認められなかった。

本試験は、試験指針に従って行った検体の繁殖試験でみられた難産のメカニズムを調べるために実施した。本試験で示された結果から、検体は子宮頸部及び子宮の機能的、器質的及び形態学的変化に悪影響を及ぼさないこと、及び妊娠期の子宮の  $\alpha$  アドレナリン作動性レセプターに影響を及ぼさないことが示された。したがって、本試験で行った全ての検査項目と、本剤の2世代繁殖試験で認められた難産とに関連性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。

(1-5) チアクロプリド 妊娠及び非妊娠ラットにおけるトキシコキネティクス  
(血漿中濃度の測定) (毒性資料No. 20-5)

試験機関：

報告書作成年月日： 1998年7月14日

検体の純度 : 97.2 %

試験動物 : 雌SD系ラット (11週齢)

試験開始時平均体重：妊娠ラット 207g、 非妊娠ラット 205g

試験期間 : 39日間 (交配～妊娠期間の投与)

【目的】

本試験は、先に実施した1世代繁殖試験(資料No. 原体-20-1)で、母動物に死亡例が認められ、母動物に対する毒性増強が示唆されたため、非妊娠動物と比較しながら検体の薬物動態を調べた。

【投与方法】

検体を0(対照群)及び1000ppmの飼料中濃度で混ぜ、妊娠ラット(8匹)及び非妊娠ラット(12匹)に交配及び妊娠期間にわたり投与した。妊娠及び非妊娠のラット各5匹を対照群として用いた。

妊娠ラットは児動物を分娩した動物であり、非妊娠ラットは交尾後に児動物を分娩しなかった動物である。それらの動物数を以下の表に示す。

	妊娠ラット数	非妊娠ラット数
対照群	5	5
1000ppm	8	12

投与量設定の理由

1世代繁殖試験(再現性確認試験、資料No. 原体-20-1)において難産が認められた用量が1000ppmの飼料中濃度であったことによる。

【結果】

1. 臨床症状

臨床症状は、どの用量群にも認められなかった。

2. 死亡率

投与に起因する死亡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。

### 3. 体重

体重の測定は、交配時及び以降は妊娠終了時まで週 1 回行った。非妊娠動物についても同様の間隔で実施した。

体重の増加傾向に投与による変化は認められなかった。

平均体重 (g)				
投与群 (ppm)	0 日	7 日	14 日	21 日
妊娠ラット				
0	210.4	241.2	270.6	341.4
1000	203.3	228.0	254.9	326.5
非妊娠ラット				
0	207.0	218.2	224.4	228.8
1000	203.4	214.5	219.3	222.5

### 4. 妊娠期間及び生存児数

非妊娠ラットにおける交尾成立までの検体の投与期間は、0 及び 1000 ppm 群においてそれぞれ 5.0 日及び 4.1 日であった。

妊娠ラットにおける交尾成立までの検体投与期間は、0 ppm 群で 7.0 日及び 1000ppm 群で 6.3 日であった。

平均妊娠期間は、0 及び 1000ppm 群でそれぞれ 22.2 日及び 22.5 日であった。

平均生存児数は、0 及び 1000ppm 群でそれぞれ 9.6 及び 7.1 であった。

平均死産児数は、0 及び 1000ppm 群でそれぞれ 1.2 及び 1.9 であった。

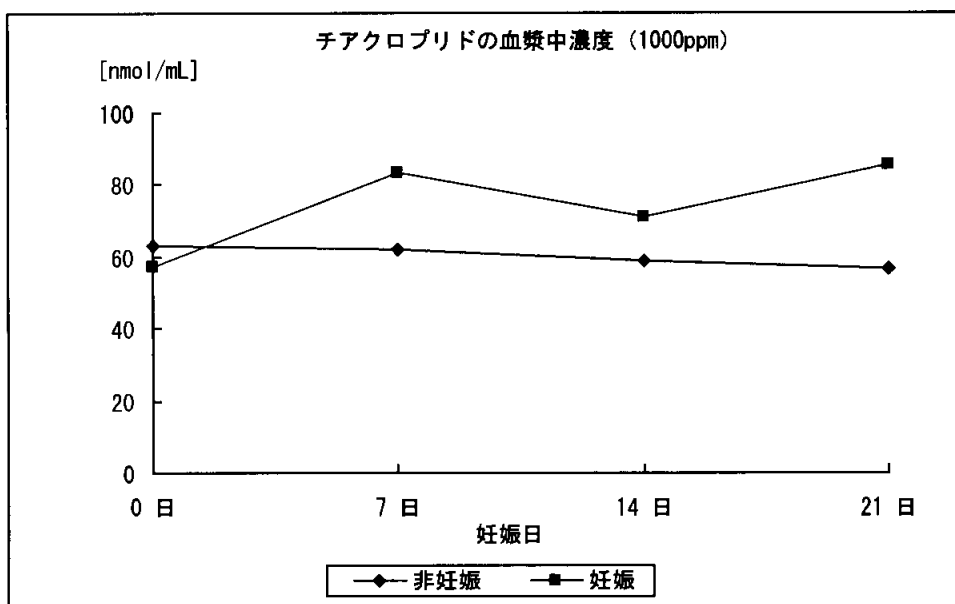
したがって、平均妊娠期間、平均生存児数及び平均死産児数は、投与群と対照群で同等であり、投与による分娩に影響は認められなかった。

### 5. トキシコキネティクス

血液試料の採取は、交配前（雄と同居前、妊娠 0 日）及び妊娠期間中毎週 1 回、エーテル麻酔下で眼窩静脈叢から実施した。非妊娠動物についても同様の頻度で実施した。血液の遠心分離後の血漿をトキシコキネティクス分析用試料とした。

妊娠及び非妊娠ラットで血漿中の検体濃度を調べたところ、明らかな差が認められた。血漿中濃度は、非妊娠ラットでは約 60nmol/mL のレベルで常に認められたが、妊娠ラットのそれは妊娠 7 日目にすでに著明に上昇し、さらに妊娠期間終了直前まで増加（60nmol/mL から 80nmol/mL）する傾向を示した。

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。



したがって、ラットの妊娠の有無により、検体の血漿中濃度の推移に差が認められた。すなわち、妊娠ラットの血漿中濃度は非妊娠ラットに比較し著明に高い状態で推移した。このため本剤の妊娠動物に対する毒性は、非妊娠動物に比して増強することが窺えた。

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。

(1-6) チアクロプリド投与により繁殖試験で観察された難産及び死産の発現増加についての解明試験 (資料 No. 原体-20-6)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 1998 年 8 月 31 日

検体の純度： 97.2 %

試験動物： SD系ラット(SPF)雌 (6~8 週齢) 対照群 58 匹 投与群 59 匹

試験期間： 1996 年 11 月~1998 年 8 月

### 【目的】

2 世代繁殖試験 (0、50、300、600ppm の用量) の第 1 世代において、死産と難産 (分娩困難) が共に増加した。この生殖における 2 つの指標について、検体により誘発された所見についてのメカニズムを解明するためのデータを得るため、交配前期間、妊娠期間及び分娩後期間を含む変法 1 世代生殖試験を計画した。なお、これらの検査期間では、通常の毒性学的検査とともに特にホルモン測定及び病理組織学的評価を交配前期間の 9 週、妊娠 18 日あるいは 21 日及び分娩 2 日に実施した。

### 【試験方法】

検体を 0 (対照群)、800ppm となるように粉末飼料 (1% のピーナッツ油添加) に混ぜ、交配前から分娩後 2 日までの期間 (14 週間) 投与し、以下の 3 時点で屠殺した。

1) 交配前期間の 9 週、2) 妊娠 18 あるいは 21 日 (精子が確認された日を妊娠 0 日)、3) 分娩後 2 日 (分娩日を 0 日)

検体を混入した飼料は週毎に調製した。

### 用量設定の根拠；

投与用量は、上記繁殖試験 (資料 No. 原体-20) の 300、600ppm の用量群において、検体に起因すると思われる難産が認められた。

従って、本試験では投与用量を 0、800ppm の 2 群を設定した。

### 【試験項目及び試験結果】

#### 1) 臨床症状

動物を少なくとも 1 日 2 回 (週末と休日は 1 回) 観察し、臨床症状と異常を記録した。

臨床症状では、投与した雌 2 匹に、分娩過程が開始しないあるいは分娩が完了しない状態が観察された。そのうち 1 匹のケースでは、分娩過程が終了する前に、数匹の児が分娩されたが、剖検時、子宮内には 4 匹の児が残っており、2 匹は生存し、2 匹は死亡していた。他の 1 匹は出産する兆候は認められたが出産しなかった。



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。

この動物には産道に1匹の児があり、子宮内には死亡胎児が残っていた。いずれの場合にも、動物を24時間観察し、その後切迫屠殺した。これら2例の結果は、以前の繁殖試験で観察された死産及び難産が、再現されたものと考えられた。

## 2) 体重

試験の交配前及び妊娠期間において、摂餌量の変化が要因ではない軽度ではあるが統計学的に有意な体重増加の抑制が、800 ppmの動物でみられた。

## 3) 検体摂取量

雄では54.0mg/kg/日、雌では61.0mg/kg/日であった。

## 4) 臓器重量

それぞれのスケジュール屠殺において、肝臓、子宮、卵巣、副腎及び子宮頸部の重量を測定した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

検査時期	交配前	妊娠 18 日	妊娠 21 日	分娩後 2 日
最終体重			↓ 90	↓ 90
肝臓 実重量	↑ 122	↑ 116		
対体重比	↑ 126	↑ 116	↑ 120	↑ 115

↓ ↑ :  $p < 0.05$  (Student's t-test)

肝臓を除き、測定したどの臓器においても絶対あるいは相対重量の変化はみられなかった。肝臓においては、検体は絶対重量及び相対重量の共に著明な増加を誘発させた。

## 5) 臨床検査

### 組織及び血液の採取

上述した間隔での屠殺時期（循環血液中のオキシトシン濃度測定用の血漿は、妊娠 21 日に採取し、血清は他の時間ポイントの全てにおいて採取した）において、ラットは CO<sub>2</sub> チャンバー内で窒息させ、放血致死させた。血液は氷冷した未使用の針付きシリンジを用いて採取した。

組織標本は、顕微鏡観察用及び／あるいは生化学的検査用にも採取し、視床下部組織は採取したものの重量は測定しなかった。その後の全ての生化学的検査は、液体窒素内で瞬時に凍結させ-80℃で保存した組織について実施した。また、電顕観察用に肝試料を採取した。

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。

### 臨床化学パラメータおよび肝ミクロソーム酵素の測定

以下の項目を測定した：ナトリウム、カルシウム、塩素、尿素窒素、グルコース、クレアチニン、尿酸、トリグリセリド、コレステロール、クレアチニンホスホキナーゼ、乳酸脱水素酵素、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、 $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ、アルカリホスファターゼ、総ビリルビン、総蛋白、アルブミン、無機リン、カルシウム及びグロブリン。

肝臓：チトクローム P450、アミノピリン N-デメチラーゼ及び p-ニトロアニソール O-デメチラーゼの活性。

それぞれの検査時期に、血中のコレステロール及び肝臓のミクロソーム酵素活性の増加がみられた。しかしその他は概ね著変はなかった。コレステロールは、ステロイドホルモン合成過程における重要な前駆体であり、以下に記述するステロイドホルモンバランスの変化における肝臓の役割を示唆するものと考えられた。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

検査時期	交配前	妊娠 18 日	分娩後 2 日
コレステロール	↑ 152		
P 450	↑ 620	↑ 430	211
N-デメチラーゼ	↑ 316	↑ 267	↑ 409
O-デメチラーゼ	↑ 250	↑ 271	↑ 300

↓ ↑ : p<0.05 (Student's t-test)

### 組織プロスタグランジン及び還元グルタチオンの測定

子宮及び子宮頸部のプロスタグランジン E<sub>2</sub> 及び F<sub>2</sub>α 含量は、酵素免疫測定法キットを用いて測定した。子宮及び肝臓内の還元グルタチオン (GSH) は、キットを用いて測定した。

頸部及び子宮のプロスタグランジン E<sub>2</sub> 及び F<sub>2</sub>α 濃度の絶対及び相対的变化は、交配前期、妊娠期間 (18 日) 及び分娩期 (授乳 2 日) において変動がみられなかった。同様に、3 回の検査時期とも肝臓あるいは子宮の GSH に変化はみられなかった。これらのデータは、検体を用いた繁殖試験 (資料 No. 原体-20) において観察された難産及び死産の発現は、プロスタグランジン及び/あるいはグルタチオン制御に対する直接的あるいは間接的作用によるものではないことを示唆していた。

## ホルモンの測定

測定を行ったホルモンは次の通りである：総チロキシシン (T4)、総トリヨードチロニン (T3)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、黄体形成ホルモン (LH)、エストラジオール (E<sub>2</sub>)、プロゲステロン (proge)、コルチコステロン (corst)、プロラクチン及びオキシトシン。

卵胞刺激ホルモン及び黄体形成ホルモンの循環血液中の濃度は、ラジオイムノアッセイ免疫試薬を使用して測定した。他の全ての血中ホルモンの測定は、通常の市販キットを使用した。

検査時期 群	交配前		妊娠 18 日		分娩後 2 日	
	0 ppm	800ppm	0 ppm	800ppm	0 ppm	800ppm
LH ng/mL	0.68	1.05*	0.46	0.87	0.27	0.52*
E <sub>2</sub> pg/mL	34.37	48.12*	31.32	39.60	19.35	48.65*
corst ng/mL	316.7	478.46*	225.15	396.58*	264.84	391.52*
proge ng/mL	20.50	23.67	72.73	88.7	16.81	24.17*

\* : p<0.05 で有意 (t-検定)

エストロゲン、プロゲステロン、コルチコステロン及び黄体形成ホルモンの上昇が、本試験の3検査時期(交配前、妊娠18、分娩後2日)の2つあるいは全てにおいて観察された。

T4、T3、TSH、オキシトシン及びFSHを含むその他のホルモンに変化は認められなかった。

これらのデータは、検体への暴露の結果、広範なステロイドホルモンのホメオスタシスの制御に乱れが生じていることを示したものと考えられた。そのようなプロフィールが現れることが予期される2つの標的部位は、視床下部及び下垂体であるが、両組織の病理組織検査では検体による毒性の証拠は示されなかった。さらに、卵巣及び副腎の顕微鏡検査もまた変化はなかった。一方、検体に対する反応として、肝細胞肥大や滑面小胞体が特徴の顕微鏡所見がみられた。

## 子宮のエストロゲン及びプロゲステロンレセプター濃度への影響

妊娠21日の子宮のエストロゲン及びプロゲステロンレセプターの濃度を、サイトソル分画及び核分画で測定した。

下表にみられる様に、サイトソル及び核分画のエストロゲンレセプター及びプロゲステロンレセプター濃度に、検体投与による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。

	エストロゲンレセプター		プロゲステロンレセプター	
	fmol/mg 蛋白		fmol/mg 蛋白	
	サイトソル	核	サイトソル	核
対照群	619~3140	642~2886	147~848	553~3445
800mg/kg	548~3942	729~2504	331~519	738~4311

## 5) 組織病理学的評価

以下の臓器について病理組織学的検査を行った。

副腎、肝臓、子宮、卵巣、乳腺、子宮頸部、下垂体及び視床下部

肝臓を除き、試験した他のどの組織にも検体と関連した影響の証拠は観察されなかった。本試験における肝臓の変化は、電子顕微鏡で同定された滑面小胞体の増加と関連する小葉中心性の肝細胞肥大で特徴付けられるものであった。

さらに、血液中の ALT の上昇は観察されず、また顕微鏡学的に胆汁 (Hall 氏染色) あるいは鉄の蓄積 (Perl 氏ベルリン青染色) は観察されなかった。従って、検体により誘発された肝臓の変化は、基本的に特性として適応現象であると思われる。

検体投与により、循環血中エストラジオール、プロゲステロン、コルチコステロン及び黄体化ホルモンの増加が認められたが、子宮でのサイトソル及び核画分のエストロゲン及びプロゲステロンレセプター濃度には変化が見られなかった。これらのことから、検体がレセプターを介したホルモンへの影響を示さないものと考えられた。

これを調べるために、本試験で得られた肝臓と卵巣を用い、アロマターゼ活性の測定<sup>注)</sup> (本報告書に追加資料として添付：資料 No. 原体-20-6/報告書番号:PH-27718) を行った。

アロマターゼ活性 (pmol/g/min.)

検査時期 群	交配前		妊娠 18 日		分娩後 2 日	
	0 ppm	800ppm	0 ppm	800ppm	0 ppm	800ppm
肝臓	7.5	14.7**				
卵巣	3.7	3.6	23.1	25.0	10.0	26.1* <sup>#</sup>

\* :  $p < 0.05$ 、\*\* :  $p < 0.01$  で有意 (t-検定)、空欄測定せず。

<sup>#</sup> : 対照群と比較して高値であったのは 2 例が分娩しなかったことが関与していると考えられる。

その結果より、アロマターゼ活性の増加が肝臓でみられた。しかしながら卵巣のアロ

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。

マターゼへの影響はあきらかではなかった。

これらの試験で、検体の投与によりエストロゲン、プロゲステロン、コルチコステロン及び黄体形成ホルモンの増加が認められた。ラットにおける妊娠期間から分娩後までのホルモンの変動に関し、プロゲステロンの変動は、分娩前（妊娠 15～19 日）には高値を示すが、分娩時には急激に減少する。一方、エストラジオールは、分娩前に比し分娩時には急激な増加を示すとの報告がある<sup>1</sup>。本試験でみられた難産は、妊娠動物の分娩時におけるホルモンの不均衡に加え、顕著な母毒性に伴う所見と考えられた。しかしながら、これらの異常があったとしても、繁殖試験（資料 No. 原体-20）において、性周期は保たれており、さらに交配、妊娠及び着床に影響を及ぼす程度には至っておらず、また妊娠は末期まで維持できていることから、認められた程度のホルモン量の異常が分娩時の異常に関与した可能性は、完全には否定できないものの、少ないものと考えられた。

---

<sup>1</sup> , , , and (1993): Increased expression of Connexin-43 in the rat myometrium labor is associated with an increase in the plasma estrogen:progesterone ratio. *Endocrinology*, Vol. 132, No. 6, 2380-2386

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。

(1-7) 解明試験 繁殖試験でみられた難産及び死産増加に関する追加試験  
(チアクロプリドのラットにおける1世代繁殖性試験)

(資料 No. 原体-20-7)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：2011年3月4日

検体の純度：98.7%  
試験動物：SD系ラット(CrI:CD(SD)Sprague-Dawley)、1群雌各43匹、雄25匹、  
投与開始時7週齢(体重 雄：207~255g、雌：151~207g)  
世代数：1世代  
試験期間：2010年6月~2011年1月(実験開始~実験完了)  
投与期間：交配前10週間、交配期間および妊娠期間

【目的】

2世代繁殖試験の第一世代で観察された難産及び死産児数の増加に関して、この異常出産がホルモンの不均衡と関連づけられるとした場合、難産と、出産に至る一連の内分泌現象においてチアクロプリドが誘発するホルモン調節不全との間には関係があると仮定した。このため、この試験の第一の目的は交配前から妊娠期間中にSD系ラットに混餌投与したときの出産の開始と出産時間への検体の影響を評価することであり、第二の目的は出産前日および翌日のホルモン変化を調べることである。

【投与方法】

検体をラット用標準飼料に0、800ppmの濃度に添加し動物に自由に摂取させた。

用量設定の根拠；

本試験の投与用量は、ラットを用いた1世代繁殖試験(混餌濃度：0、25、300および1000ppm、毒性資料 No. 20-1)および2世代繁殖試験(混餌濃度：0、50、300および600ppm、毒性資料 No. 20)の結果に基づいて800ppmを選定した。1世代繁殖試験では1000ppmにおいて、2世代繁殖試験では300および600ppmにおいて死亡および難産がみられた。

【方法及び試験項目】

概要を次表にまとめた。

表 1 試験概要

世代	期間(週間)	作業手順	試験項目
P	生育(10 週間) (交配前)		一般状態の観察(毎日、生死は1日2回) 詳細な観察、体重及び摂餌量の測定(週1回) 発情周期の判定(週1回以上)
	交配 (最長3週間)	雌雄1対1で交配。 膣栓又は膣垢中の精子の確認(妊娠0日)	推定妊娠雌を各群に振り分け(表2) 交配終了時雄親動物ならびに受精していない雌の最終体重測定、剖検。妊娠の有無、着床痕数の記録。
	妊娠(3週間)		<u>雌親動物</u> 詳細な観察(週1回) 体重測定(妊娠0, 7, 14, 21日) 摂餌量測定(週1回)
	出産.....	.....	<u>主群</u> カメラによる出産状況(出産予定日の朝～出産終了または剖検)の記録。 出産終了の翌朝、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血後剖検。肝臓、甲状腺および脳の重量測定後、病理組織学的検査。児動物は生存および死亡児数記録後屠殺。  <u>衛星群</u> ①妊娠20日の午前中、イソフルラン麻酔下で後眼窩静脈叢から採血。妊娠21日にカメラによる出産状況の記録。出産終了の翌朝、イソフルラン麻酔下で後眼窩静脈叢から採血後剖検。肝臓、甲状腺および脳の重量測定後、病理組織学的検査。児動物は生存および死亡児数記録後屠殺。 ②妊娠21日または22日の午前中、イソフルラン麻酔下で後眼窩静脈叢から採血後、放血。妊娠の有無、着床数、生存児および死亡児数を記録。

表2 群への振り分け

群	主群動物	衛星群		
		妊娠 20 日および最終屠殺時に採血	妊娠 21 日に採血	妊娠 22 日に採血
対照群	24	5	6	5
投与群 800ppm	24	6	5	4

繁殖性に関する指標；次の指標を算出した。

$$\text{交尾率 (\%)} = \frac{\text{受精した雌動物数}^{\text{a)}}}{\text{雄と同居させた雌動物数}} \times 100$$

$$\text{受胎率 (\%)} = \frac{\text{妊娠した雌動物数}^{\text{b)}}}{\text{受精した雌動物数}} \times 100$$

a); 精子が確認されずに、又は、膣栓が確認されずに妊娠した雌を含む、

b); 出産しなかったが着床痕を有する雌を含む

出産時間の定義；最初の児動物が膣口から見えた瞬間から最後の児動物が出産される瞬間までの経過時間とした。

ホルモンおよび検体の分析；ホルモン状態と出産時間との関係を調べるために、それぞれの時間に採取した血液サンプルを用いてプロゲステロンおよびエストラジオールの濃度を測定した。また、投与群のサンプルでは検体の濃度も測定した

病理組織学的検査；受精した全ての雌親動物について、肝臓、甲状腺、脳、子宮および卵巣を採取し、10%緩衝ホルマリン溶液中で固定した。妊娠した動物について肝臓および甲状腺の病理標本を作製し、病理組織学的検査を実施した。



## 【結果】

### 一般状態

交配前期間中に対照群の雄2匹と雌2匹、投与群の雄3匹に外部刺激に対する過剰反応、攻撃性ないしハンドリングに対する抵抗性が観察された。これらの変化は対照群および投与群ともに認められたため、投与に起因するものではなく、ストレスによるものと考えられた。なお、これらの症状は当社試験施設で実施した試験の対照群のSprague-Dawley系ラットでは通常観察されないことから、本試験も含め検体の一連の繁殖試験で用いた から購入したSprague-Dawley系ラットのストレス感受性が高かったことを示唆するものと思われた。

さらに投与群雄1匹に外部刺激に対する過剰反応とともに間代性けいれんおよび立毛が観察された。

妊娠期間中は投与に関連する一般状態の変化は認められなかった。

### 死亡

交配期間中に投与群の雌1匹が雄に攻撃されていたため、動物福祉の観点から屠殺した。この雌は頭部に大きな皮膚傷を有し、左耳を負傷していた。

### 体重

#### 雌雄動物（交配前）

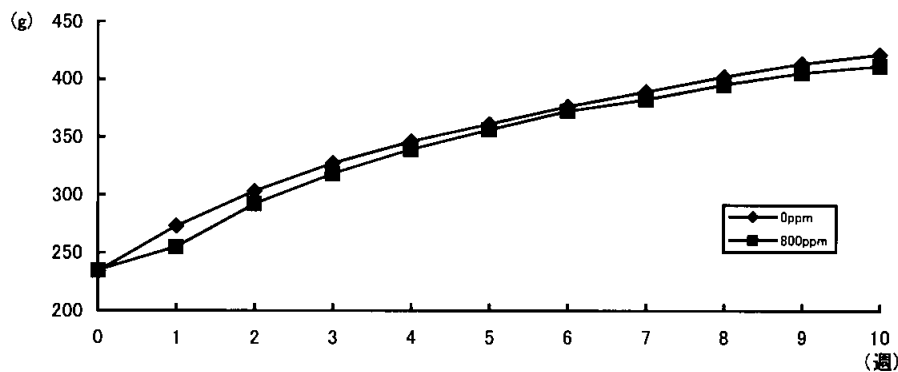
統計的に有意で、かつ投与に関連した体重増加の抑制 ( $p < 0.01$ , T検定) が交配前期間の1~8日に投与群の雌雄に観察され (対照群との比較 雄93%、雌97%)、その後も時折対照群と比較して有意差が認められた。交配前期間終了時、雌の平均体重は対照群を4%下回った。

#### 妊娠期

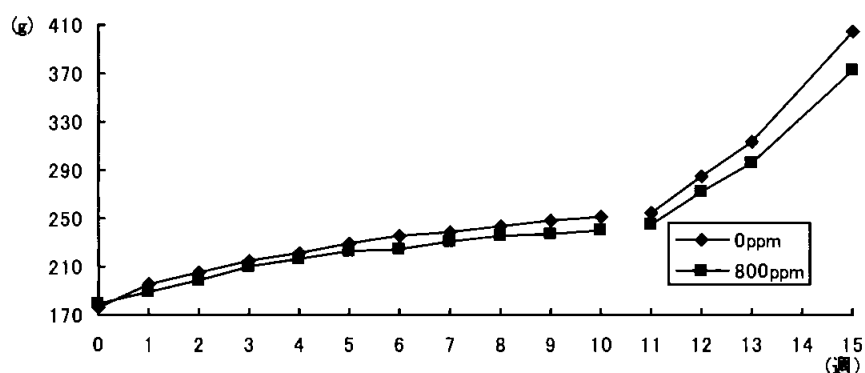
妊娠期間中において、統計学的に有意な投与に関連した体重増加抑制 (対照群と比較して-14%、 $p < 0.01$ , T検定) が投与群に観察された。

図1 体重変化

雄



### 雌



### 摂餌量

投与第1週目は雌雄ともに対照群より統計学的に有意に減少 ( $p < 0.01$ , T検定) した。その後は雌において投与期間のほとんどの区間で対照群よりわずかに減少した。

### 検体摂取量

表 3 検体摂取量

	雄	雌
投与量 (ppm)	800	800
交配前 (mg/kg/日)	50.5	60.9
妊娠 (mg/kg/日)		54.0

### 血漿中の検体濃度

表 4 検体濃度

採血日	主群	衛星群			
		最終屠殺	妊娠 20 日	妊娠 21 日	妊娠 22 日
動物数	22	5	4	4	5
平均値 ± SD (mg/L)	16.9 ± 5.6	22.1 ± 3.4	16.1 ± 1.5	14.8 ± 3.6	9.8 ± 3.0

### 交尾率および受胎率

交尾率および受胎率には検体投与関連の影響はみられなかった。

表5 交尾率および受胎率

	対照群	投与群
交配動物数	43	43
受精した動物数*	40	41
妊娠した動物数	34	38
交尾率(%)	93	95
受胎率(%)	85	93

\*: 精子が確認されずに、又は、膣栓が確認されずに妊娠した雌を含む

### 出産状態（難産）

難産がみられたのは投与群の3匹であった。主群の1匹を出産中の妊娠23日（午後3時42分）に動物福祉の観点から屠殺した。この動物は第一児を妊娠22日の午後8時40分に出産した。一般状態の変化は、立毛、肛門性器部の汚れおよび自発運動量の低下等で、また妊娠期間中投与群の他の動物と比較して体重増加量がやや少なかった。屠殺前（午後10時19分まで）この雌は5匹の児を出産したが、剖検では子宮に3匹の生存児が認められた。屠殺時には1つの子宮角が膣からつきだしており、顕著な子宮脱が確認された。さらにこの動物のホルモン濃度は、後述するように、プロゲステロン濃度が対照群と比較して455%増加していた。ラットの出産過程ではプロゲステロン消退が重要であるため（文献1, 2, 5, 6）、この高濃度が難産の原因と考えられた。

主群のもう1匹は妊娠24日の午前9時59分に死亡状態で発見された。この動物は第一児を妊娠23日の午後0時25分に出産し、午後5時19分までに少なくとも12匹を出産した。一般状態の変化として自発運動量の低下および著しい肛門性器部の汚れがビデオに記録されていた。剖検では子宮内に死亡児が1匹見つかったことから、出産時間は投与群の平均時間（105.6±42.9分）より長かったものの、まだ完了していないことが判明した。

衛星群の1匹は第一児を妊娠23日の午前0時50分に出産したが14匹終了まで210分かかった。投与衛星群の平均出産時間は128±55分であった。出産後に一般状態の変化として立毛、全身蒼白、肛門性器部および腹部の汚れが見られた。この動物では後述するようにホルモン濃度は正常値の範囲内であったため、難産が検体投与によるものか、妊娠20日の採血のストレスによるものか、あるいはその両方によるものかは明確ではなかった。

なお、ビデオカメラ撮影の検討のため実施した予備試験（検体投与なし）においても、18匹中3匹に難産様の異常が観察された。ストレス（交配3週間前にアメリカからフランスに搬送したこと、ビデオ撮影または採血等のため試験担当者が始終動物室内に居ること）による影響が示唆され、一般状態の項でも述べたように

から購入したこの系統ラットが異常出産にいたる非特異的影響に対して高いストレス感受性を有しているものと考えられた。これらのことは、

から購入したSprague-Dawley系ラットを用いて300および

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。

500ppmの濃度で混餌投与した発達神経毒性試験（資料No. 原体-30）では難産は観察されなかったことから担保されるものと考えられた。

#### 出産の開始および出産時間

表6 出産時間（分）

	主群	衛星群
対照群	120±50	171±65
投与群	106±43	128±55

妊娠、出産開始時期または出産時間に対する投与の影響は認められなかった。

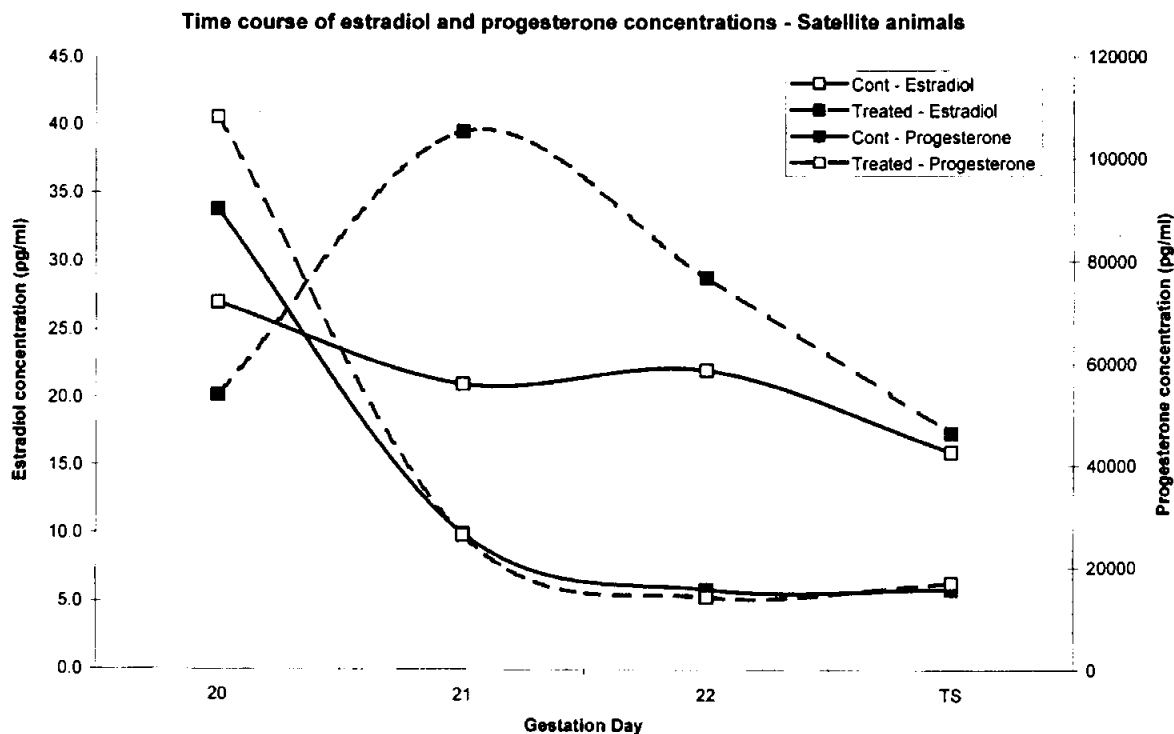
主群では、対照および投与群ともにほとんどの動物が妊娠22日に出産が始まった。対照群における平均出産時間は120分（58分～238分）、難産を示さなかった投与群の動物では106分（51分～199分）であった。

妊娠20日に採血した衛星群の平均出産時間は対照群で171分、投与群で128分であった。また、出産開始時間は投与群（22.6日）のほうが対照群（21.8日）よりやや遅かった。

なお、対照群動物において、妊娠20日に採血した衛星群が主群より出産時間が長くなったことから、麻酔または採血によるストレスが出産時間を延長させることが示された。投与衛星群では対照衛星群より出産時間への影響が少なかったが、これは検体投与による毒性（体重および摂餌量の抑制、肝臓および甲状腺の変化）が既にストレスとなっていたことが起因しているものと推察された。

### ホルモン濃度

図2 ホルモン濃度変化 (衛星群)



ホルモン濃度およびエストラジオール対プロゲステロン濃度比に対して投与による影響が認められた。

プロゲステロン濃度は、対照群において妊娠20日に上昇後 (90220pg/mL)、妊娠20日~22日にかけて83%減少し、その後は一定であった。投与群では妊娠20日のプロゲステロン濃度は対照群より20%増加 (108177pg/mL、統計学的有意差なし) していたが、その後は87%減少し対照群とほぼ同等であった。

エストラジオール濃度は、対照群において妊娠20日から出産終了 (最終屠殺) までに減少した。投与群では、妊娠20日から21日に大きく増加し、妊娠21日には対照群を88%上回る (統計学的に有意) 濃度に達し、その後低下したが妊娠22日でも対照群より31%増加した (統計学的有意差なし)。

エストラジオール対プロゲステロン比 (E/P×1000) は対照群では妊娠20日~22日に徐々に増加し5倍になった。投与群では妊娠20日~21日に急激に10倍まで増加した。

表7 エストラジオール対プロゲステロン比

	妊娠20日	妊娠21日	妊娠22日	最終屠殺時
対照群	0.31±0.11	0.78±0.15	1.54±0.62	1.05±0.21
投与群	0.19±0.02**	1.88±0.97	1.93±0.70	1.19±0.60

表の数値は平均±SD、\*\* : p<0.01 (T検定)

動物実験ではコルチゾール、プロゲステロンおよびエストラジオールが出産の開始

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。

に関与しており(文献 1, 2, 3, 4, 5, 6)、出産に至る一連の事象においてはこれらのホルモンの良好なバランスが重要であるとされている。今回の試験では対照群のホルモン推移は公表されている結果(文献 1)と一致していた。これに対して投与群ではプロゲステロンとエストラジオールの濃度比に影響が認められた。妊娠 20 日のプロゲステロン濃度が対照群より高く、エストラジオール濃度は妊娠 20 日~21 日にかけて上昇し、結果として、妊娠 21 日にはエストラジオール対プロゲステロン比 (E/P×1000) は対照群より高くなり対照群の妊娠 22 日とほぼ同じ数値となった。

難産のために妊娠 23 日に屠殺した主群の動物では、屠殺時の採血ではプロゲステロン濃度が 71687pg/mL、エストラジオール濃度は 16.4 pg/mL の検出限界以下であった。このプロゲステロン濃度は対照群の同時期(妊娠 22 日)に測定された平均濃度(15748 ±6465 pg/mL)の 455%で、出産中の動物で予想される濃度を明らかに超えていて難産とホルモン調節不全の関係が示唆された。また、もう一匹の難産であった衛星群の動物では妊娠 20 日の採血でプロゲステロン濃度が 105300 pg/mL、エストラジオールが 22 pg/mL、出産後の最終屠殺の採血ではプロゲステロン濃度が 9806 pg/mL、エストラジオール濃度が 21 pg/mL で、正常値の範囲内であった。

なお、主群の出産後に死亡状態で発見された 1 匹の動物については、死亡していたためホルモンの状態を調べることはできなかった。

## 剖検

表 8 主要な肉眼的病理所見

性別	雄		雌	
投与群(ppm)	0	800	0	800
肝臓 検査動物数	25	25	43	40
肥大	0	0	0	5
小葉像の明瞭化	0	0	3	12

雌では肝臓に肥大および小葉像の明瞭化が認められた。雄では剖検結果に投与に関連する所見は見られなかった。

## 臓器重量及び最終体重

表 9 臓器重量 (有意差の認められた項目)

投与量 (ppm)		800
最終体重		↓ 93
肝臓	実重量	↑ 123
	対体重比	↑ 132
	対脳比	↑ 126
甲状腺	実重量	↑ 114
	対体重比	↑ 123
	対脳比	↑ 117

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

最終体重および臓器重量は雌動物の主群および妊娠20日に採血した衛星群を対象に実施した。

投与群では最終体重に統計学的に有意な減少 (-7%) がみられた。肝臓および甲状腺の実重量および対体重比の増加が見られた。これらの所見は検体投与関連のものと考えられる。

## 病理組織学的検査

表 10 主要な病理所見

投与群 (ppm)		0	800
肝臓 検査動物数		25	26
小葉中心性肝細胞肥大	軽微	0	3
	軽度	0	18
	中等度	0	4
	合計	0	25
甲状腺 検査動物数		24	26
濾胞上皮細胞肥大:びまん性	軽微	2	2
	軽度	0	15
	中等度	0	3
	合計	2	20

病理組織学的検査は雌動物の主群および妊娠20日に採血した衛星群を対象に実施した。

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。

肝臓では投与群のほぼ全動物に小葉中心性肝細胞肥大が認められた。甲状腺では投与群のほぼ全動物にびまん性濾胞上皮細胞肥大が認められた。これらの所見は投与関連のものと考えられる。

本試験の所見の概要を以下に要約する。

1. 交配前期間中、対照群および投与群においてストレス性の一般状態の変化が認められ、この系統のラットは環境ストレスに対する感受性が高いことを示した。
2. 投与群のほぼ全ての雌動物に体重増加抑制、摂餌量減少、肝臓および甲状腺の臓器重量増加、病理所見が認められ、検体の全身毒性影響が示された。
3. 投与群の 3 匹に難産が認められた。難産の状態はいずれも一般状態の変化（立毛、肛門性器部汚れ、自発運動量の低下）、出産の延長ないし停止である。ホルモン濃度は以下の通りである。

一例目：屠殺時（妊娠 23 日）のプロゲステロン濃度が非常に高かった。なお、群平均値は妊娠 21 日と妊娠 22 日の間に大幅な低下を示している。

二例目：死亡した状態で発見されたためホルモン濃度を測定できなかった。

三例目：ホルモン濃度は正常範囲であった。しかし、衛星群動物のため採血を妊娠 20 日に実施しているため、観察された難産は、採血に関するストレスないし検体投与の全身毒性によるものと考えられた。

なお、ビデオカメラ撮影検討の予備試験においても難産様の現象が観察されたことから、この系統のラットでは投与に関係なくストレスによって難産が引き起こされることが証明された。

4. 出産前日および出産中にプロゲステロン濃度（妊娠 20 日の平均値がわずかに高かった。また、難産動物では出産前に見られる低下が認められなかった。）、エストラジオール濃度（妊娠 21 および 22 日の平均値が高かった。）ならびに両ホルモンの比に影響が認められた。これらのホルモン変化と観察された難産の因果関係が明白なのは、プロゲステロン濃度低下が認められなかった動物についてのみであった。
5. 難産が観察されなかった動物では、出産の開始および出産時間に影響は認められなかった。

[申請者追記]

以上のように、 から購入した Sprague-Dawley 系ラットはストレス感受性が



高く、ストレスが対照群においても異常出産を引き起こし得ることが示された。また一方で検体が性ホルモンバランスに影響を及ぼすことが証明されている。今回3例のみに難産がみられ、そのうち難産と周産期におけるホルモンバランス異常の間に明らかな関連性が確認できたのは1例のみであった。これらのことから、繁殖性試験で認められた難産と検体による性ホルモンバランスの異常との関連性は否定できないものの、全身毒性（体重増加抑制、摂餌量の減少、肝臓や甲状腺での病理所見）および検査に伴うストレスがあることから、本系統ラットがもつストレスに感受性が高いことも数匹の動物に難産を引き起こす引き金になっているものと考えられた。

#### 参考文献

1.                   ,                   and                   (1996): Relationships among sex steroids, oxytocin, and their receptors in the rat uterus during late gestation and at parturition. *Endocrinology*, 137, 8, pp. 3213-3219.
2.                   ,                   ,                   and                   (1981): Hormonal changes around parturition in rats, *Tohoku J. exp. Med.*, 135, pp. 87-91.
3.                   (1969): Uterine activity in late pregnancy and during parturition in the rat, *Biology of reproduction*, 1, pp. 344-353.
4.                   and                   (1981): Hormonal control of preterm and term parturition, *Seminars in perinatology*, Vol.5, N° 3, pp. 192-202.
5.                   ,                   (1997): The endocrinology of human parturition, *Annals New York Academy of Sciences*, 272-287.
6.                   ,                   (2007): Progesterone withdrawal: key to parturition, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 194(4), 289-296.

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を用いた催奇形性試験

(資料 No. 原体-21)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1997年3月25日

検体の純度 : 97.3%(1995年3月)、97.2%(1995年9月)、97%(1996年2月)  
試験動物 : ウィスター系ラット 1群交尾雌 28+7匹  
(妊娠0日雌体重; 182~239g)  
試験期間 : 1995年7月~1996年5月  
投与期間; 14日間(妊娠6~19日)

【試験方法】：

検体を、0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁し、動物に10ml/kgの容量で0(対照群)、2、10、50mg/kgの投与量を、妊娠6日目から19日目までの14日間毎日1回経口投与した。

無処理の雌雄各1匹のラットを終夜同居させ、翌朝膣垢中に精子を認めたものを交尾とした。交尾が観察された雌を、無作為に対照群と投与群に配分した。交尾が確認された日を妊娠0日とし、妊娠20日目に動物を屠殺し、検査した。

投与用量設定の理由：

用量設定試験では各群7匹のウィスター系ラットに、0.1%タイロースで調製した検体を0、2、10、50mg/kgの投与量で妊娠6日から19日まで毎日強制経口投与した。胎児は妊娠20日に帝王切開で摘出した。

50mg/kg群を含む全群で動物の外観や行動と死亡率に影響はみられなかった。摂餌量と増体重が50mg/kg群で減少した(最初の1週間で著明に)。糞量の減少及び飲水量と排尿の減少は50mg/kg群でみられた。

妊娠率、吸収胚率、胎児数並びに胎盤の外観と重量に2mg/kgと10mg/kg群で投与に起因した変化は認められなかった。50mg/kg群で胎児体重の低下と骨化遅延の胎児数の増加がみられた。検体投与に起因した外表奇形、内臓異常及び骨格異常は認められなかった。

以上のように、検体は母動物毒性を示す量で胎児毒性(骨化遅延)を引き起こした。従って、本試験の投与量として、同じ投与量[0(対照群)、2、10、50mg/kg]を設定した。

試験項目：

妊娠動物について、交配後から屠殺までの間、一般症状を毎日観察した。体重を妊娠0日、6日から20日まで測定し、摂餌量を妊娠0~6、6~11、11~16、16~20日に測定した。飲水量は飲み残し量を肉眼的に評価した。

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。

屠殺時には、内臓の肉眼的検査、黄体数、子宮重量、着床数、胎盤の外観と重量、生存胎児数、吸収胚数及び死亡胎児数について検査した。

生存胎児については性別、外表奇形を観察し、体重を測定した。約半数の胎児を内臓検査用に、残りの半数の胎児を骨・軟骨の二重染色による骨格検査用に 70%エタノール液に固定した。内臓観察についてはウィルソン法の変法により、骨格検査はアルシアンブルーでの軟骨染色とアリザリンレッドSでの骨染色後に行った。

## 【試験結果】

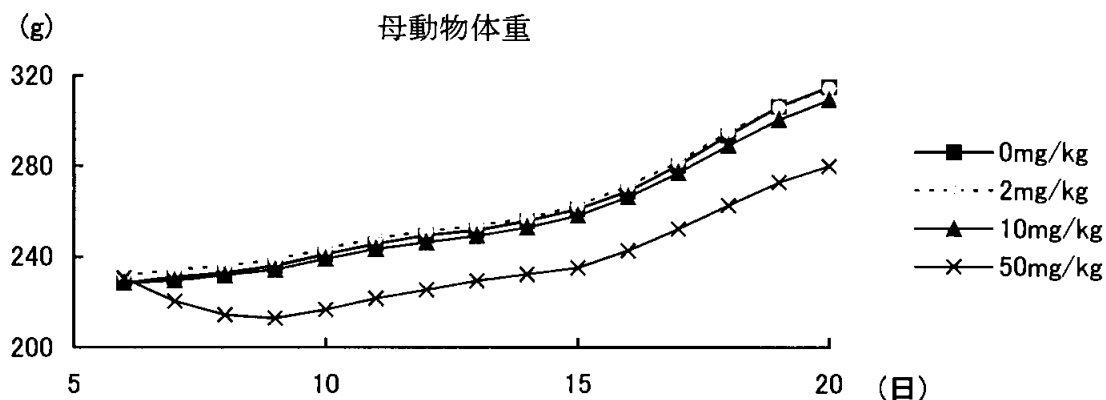
### 1. 親動物

全投与群の動物の臨床所見に投与の影響は認められず、死亡例もなかった。

摂餌量の減少は 50 mg/kg 群でのみ投与期間中に、特に投与開始初期（妊娠 6 から 11 日）で明らかに認められたが、妊娠後半（妊娠 11 日～20 日）にかけて影響は少なかった。

飲水量と糞量の減少を示した動物数は投与開始初期で 50 mg/kg 群で増加し、摂餌量の減少との関連が窺われた。10 mg/kg 以下の群では摂餌量と飲水量や排泄物に影響はみられなかった。

体重の減少は 50 mg/kg 群で投与開始初期（妊娠 6 から 9 日）に認められ、その結果として投与期間中の有意な体重増加の抑制となった。10 mg/kg 以下の群では体重増加の抑制はみられなかった。



剖検時には全投与群で投与に関連した肉眼的病変は認められなかった。

黄体数、着床数、着床前死胚率には対照群と全投与群の間で有意な差は認められなかった。従って、これらの指数から動物は均等に各群に配分されたことになる。

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。

50 mg/kg 群で1例の総吸収胚がみられた。この所見は本系統のラットでも通常みられるものであるが、本群でのわずかではあるが後期吸収胚数の増加による着床後死胚の有意な増加を考慮すると、検体の影響を否定することはできない。50 mg/kg 群で後期吸収胚数の増加は背景対照群の範囲を越えており、検体に起因した変化と考えられた。胎盤重量は全投与群とも有意な差はみられなかった。

## 2. 胎児

生存胎児数は50 mg/kg 群で対照群より統計的に有意ではないがわずかに低値であった。胎児の性比について対照群と各投与群間で差はなかった。胎児体重は50 mg/kg 群で有意に低下したが、10 mg/kg 以下の群で影響はみられなかった。

外表検査で50 mg/kg群の3例の胎児に前肢の変異(deviation)<sup>1</sup>が見られた。この前肢の変異は1例の母動物からの胎児でしか見られなかったが、この所見は検体の投与に関連するものであると考えられる。その理由として、後述の骨格検査で四肢骨形成不全が50mg/kg群の数例の母動物からの胎児に観察されたからである。50mg/kg群で1例の胎児に重複奇形(腹壁破裂、短顎症、口蓋裂、四肢の変異等)がみられた。50mg/kgでのこの所見は非常に低頻度ではあるが、明らかな母動物毒性、後期吸収胚の増加、後述の骨格への影響を考慮すると、検体に起因した可能性を否定することはできない。その他には、検体の投与に起因する外表異常は認められなかった。

内臓検査では、水腎症<sup>2</sup>が対照群を含む全群に見られた。10 mg/kg群と50 mg/kg群の水腎症の発生頻度は対照群と比較するとわずかに増加しているように見えたが、明瞭な用量との関連性を示さず、また50 mg/kg群の値は、最近実施した別試験の対照群のデータに比べ極く僅かに高いか(児動物)、あるいは低い(母動物)だけであるので、この所見は検体の投与によるものであるとは考えられなかった。

<sup>1</sup> 具体的には骨格検査において上腕骨、尺骨あるいは橈骨の形成異常が認められた。

<sup>2</sup> 申請者注：試験報告書では下記に示す定義に従って腎盂拡張として、「軽度腎盂拡張」と「腎盂拡張」とに区別して評価しているが、これらの所見は程度の差はみられるものともに「水腎症」を示しているものと考えられ、「水腎症」として両所見を合わせて評価した。

軽度腎盂拡張：腎盂の拡張を印象づける程度で、腎乳頭は存在するが短く観察された場合。

腎盂拡張：大きく拡張した腎盂、乳頭の欠如あるいは実質の減少が観察された場合。

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。

### 水腎症の発生頻度

投与量	胎児単位 (%)	母動物単位 (%)
0mg/kg群	16.0	50.0
2mg/kg群	13.3	41.9
10mg/kg群	27.8	71.9
50mg/kg群	25.4	62.1
別試験の対照群	23.2	69.2

更にこの所見は、対照群においても多数例に認められていることから、本試験が行われた1996年近辺の背景データ（966例中188例に発生）をもとに自然発生奇形の可能性を統計学的な検定により調べた<sup>3</sup>。その結果、供試したラット系統におけるこの所見の出現頻度は、検体に起因するものではなく、自然発生奇形の出現変動範囲内に入るものとみなされた。

骨格検査では、骨化遅延の例として50 mg/kg群でみられた胎児単位でも母動物単位でも有意な所見は、遠位指節骨と胸骨骨化不全、泉門拡張であった。また、50 mg/kg群で骨格変異として波状肋骨と非対称胸骨が観察された。10 mg/kg以下の群では検体による骨化遅延の所見は認められなかった。

胎児単位での奇形の発生頻度は、対照群と比較すると50 mg/kg群では統計的に有意に増加している。50 mg/kg群で観察された奇形の発生頻度の増加は特に、四肢骨形成異常（長管骨、鎖骨及び肩甲骨）によるものであった。これらの四肢骨奇形は本試験に用いた系統のラットで一般的に出現する自然発生的な奇形でもある。しかし、50 mg/kgでは奇形の発生頻度が増加したのに加えて、1例の重複奇形が観察された。この群での発生頻度の増加は、母体の著明な増体重抑制（一部体重減少）にみられるように検体投与による強い母体毒性の結果と考えられる。

2及び10 mg/kg群では、奇形の種類、又は発生頻度から投与に起因する影響を示唆するものは何もなかった。

<sup>3</sup> 申請者が実施した。

引用文献： 、 、 （1989）：催奇形性試験での自然発生奇形を見分けるための統計検定法、獣医畜産新報、817：49-54。

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。

以上の結果より、本検体を妊娠ラットに投与したときの母動物及び胎児における無毒性量は 10mg/kg/日であった。また、50mg/kg/日群でこの系統のラットで一般的に出現する奇形の増加が認められたが、本検体の著明な母体毒性に基づくものと考えられた。

投与量 mg/kg	0	2	10	50		
交尾動物数	35	35	35	35		
受胎動物数(a)	28	31	32	30		
妊娠維持動物数(b)	28	31	32	29		
母動物	一般症状					
	流産					
	全吸収胚雌数				1	
	体重				↓(89)	
	摂餌量				↓(36~91)	
	飲水量				低下(投与開始時)	
	剖検所見					
	着床所見	黄体数★ (b)	14.1	14.1	14.3	14.0
		着床数★ (b)	12.4	11.5	11.4	11.8
		着床前死胚★ (b)	1.7	2.6	2.9	2.2
		着床後死胚★ (a)	0.9	0.9	0.5	2.8*
		着床後死胚★ (b)	0.9	0.9	0.5	2.5
		後期吸収胚★ (a)	0.9	0.8	0.5	2.8
		後期吸収胚★ (b)	0.9	0.8	0.5	2.4
		生存胎児数★ (b)	11.5	10.6	10.9	9.3
		雄の割合	51.3	53.1	56.0	47.6
	生存胎児体重(g)	3.70	3.73	3.69	3.20**	
胎盤重量(g)	0.60	0.64	0.60	0.60		

\*: p<0.05 \*\* : p<0.01 [フィッシャー検定] ↓ : p<0.05 ↑ ↓ : p<0.01 [Dunnett 検定]

★ : 1 匹の妊娠動物あたり 空欄 : 異常なし

a: 全吸収胚を含む b: 全吸収胚を含まない

( ) 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。

投与量 mg/kg		0	2	10	50	
胎	総胎児数	321	329	348	270	
	外表検査					
	奇形 変異	重複奇形&				1
		前肢の変異(deviation)				3(1)
	内臓検査 検査胎児数	156	158	169	130	
	奇形	小眼球/無眼球症	5(5)	2(2)	2(2)	7(6)
		全内臓逆位			1	
		脳奇形	1			
	変異	水腎症	25(14)	21(13)	47*(23)	33(18)
	骨格検査 検査胎児数	143	148	156	97	
児 形	四肢骨奇形	1	2(2)		8*(6)	
	上腕骨形成異常	1	1		6*(#2, 3, 5, 6)	
	尺骨形成異常				2(#5)	
	橈骨形成異常				5*(#2, 3, 5)	
	肩甲骨形成異常		1		7*(#1, 2, 3, 5, 6)	
	鎖骨形成異常				3(#3, 4, 5)	
	大腿骨形成異常				3(#2, 5)	
	脛骨形成異常				1(#5)	
	腓骨形成異常				1(#5)	
	曲尾	1				
変異 骨 化 遅延	肋骨奇形(軟骨部)			1		
	椎骨奇形		3(3)	1	1	
	骨盤シフト		2(2)			
	波状肋骨(第5)	6(3)	4(4)	2(2)	14**(10**)	
	第3胸骨非対称	5(5)	7(6)	15(10)	15**(11)	
	第5遠位指節骨未骨化	52(17)	40(14)	40(21)	56**(20**)	
	第3胸骨骨化不全	2(2)	9(7)	11(7)	17**(11**)	
	泉門拡張	6(5)	8(5)	15(11)	40**(17**)	

\*: p<0.05 \*\* : p<0.01 [フィッシャー検定]

空欄: 異常なし ( ): 母動物数または母動物番号

母動物番号 (#1: 6357, #2: 6361, #3: 6384, #4: 6688, #5: 6708, #6: 6352)

&: 腹壁破裂、短顎症、口蓋裂、四肢異常等

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) チアクロプリドのウサギを用いた催奇形性試験

(資料 No. 原体-22)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：1996年1月26日

検体の純度 : 97.3 %  
試験動物 : ヒマラヤン系ウサギ 1群交尾雌 24匹  
(妊娠0日雌体重；2185～3130g)  
試験期間 : 1995年6月～9月  
投与期間；23日間(妊娠6～28日)

【試験方法】：

検体を、0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁し、動物に5ml/kgの容量で0(対照群)、2、10、45mg/kgの投与量を、妊娠6日目から28日目までの23日間毎日1回経口投与した。

無処理の雌雄各1匹のウサギを同居させ、肉眼的に交尾を確認した。交尾が観察された雌を、無作為に対照群と投与群に配分した。交尾が確認された日を妊娠0日とし、妊娠29日目に動物を屠殺し、検査した。

投与用量設定の理由：

用量設定試験では各群3匹のヒマラヤン系ウサギに0、3、10、30、40、50mg/kgを妊娠6日から28日まで毎日強制経口投与した。この結果、全群で動物の外観や行動に影響はみられなかった。摂餌量が30mg/kg以上の群で減少し、糞量の減少となった。飲水量と排尿の減少は40mg/kg以上の群で減少し、尿の変色と赤色尿は50mg/kg群でみられた。30と40mg/kg群では投与後最初の数日に一時的な体重増加の抑制がみられたが、投与期間中及び全妊娠期間中の体重増加に影響は見られなかった。50mg/kg群で投与期間中及び全妊娠期間中の体重増加の減少が見られた。

妊娠率は50mg/kg群まで投与に起因した変化は認められなかった。50mg/kg群で吸収胚の割合のわずかな増加が見られ、生存胎児数が減少した。胎児体重は40、50mg/kgで低値であった。

外表奇形として50mg/kg群で関節拘縮の増加がみられた。検体投与に起因した内臓異常は認められなかった。骨格検査では50mg/kg群で1例の胸骨と肋骨の異常及び骨化遅延と骨格変異がみられた。これらの結果に基づいて、0(対照群)、2、10、45mg/kgを設定した。



試験項目：

妊娠動物について、交配後から屠殺までの間、一般症状を毎日観察した。体重を妊娠0日、6日から29日まで測定し、摂餌量を妊娠0～6、6～11、11～16、16～21、21～24、24～29日に測定した。飲水量は飲み残し量を肉眼的に評価した。

屠殺時には、内臓の肉眼的検査、黄体数、着床数、胎盤の外観と重量、生存胎児数、死亡胎児数及び吸収胚数について検査した。

生存胎児については性別、体重、外表奇形を観察し、胎児を70%エタノール液に固定した。内臓観察と脳に対する薄切の検査後にアルシャンブルーでの軟骨染色とアリザリンレッドSでの染色後に骨格検査に供した。

【試験結果】

1. 親動物

試験期間中に流産が2、45mg/kg群でそれぞれ1、2例にみられた。45mg/kg群における2例の流産は、この群における動物には明らかな摂餌量の減少及び体重増加量の抑制（体重減少）が起こっていることから、投与に関連したものと考えられた。しかし、2mg/kg群における1例の流産は10mg/kg群では見られなかったことと本系統のウサギの背景データから、偶発的なものと考えた。

全投与群の動物の臨床所見に投与の影響は認められなかった。

摂餌量の減少は45mg/kg群で投与期間中に、10mg/kg群で妊娠6～11日に認められた。10、45mg/kg群で摂餌量の低下に伴う糞量の減少も観察された。2mg/kg群では摂餌量に影響はみられなかった。

飲水量の減少を示した動物数は45mg/kg群で増加した。この飲水量の減少に伴い排尿量が減少した動物数も増加した。2、10mg/kg群では飲水量に影響はみられなかった。

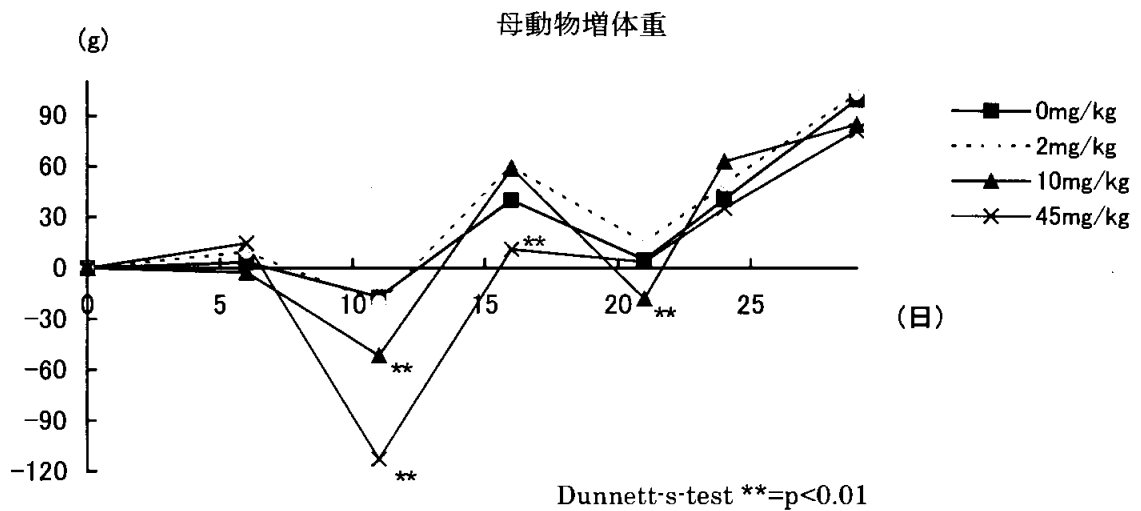
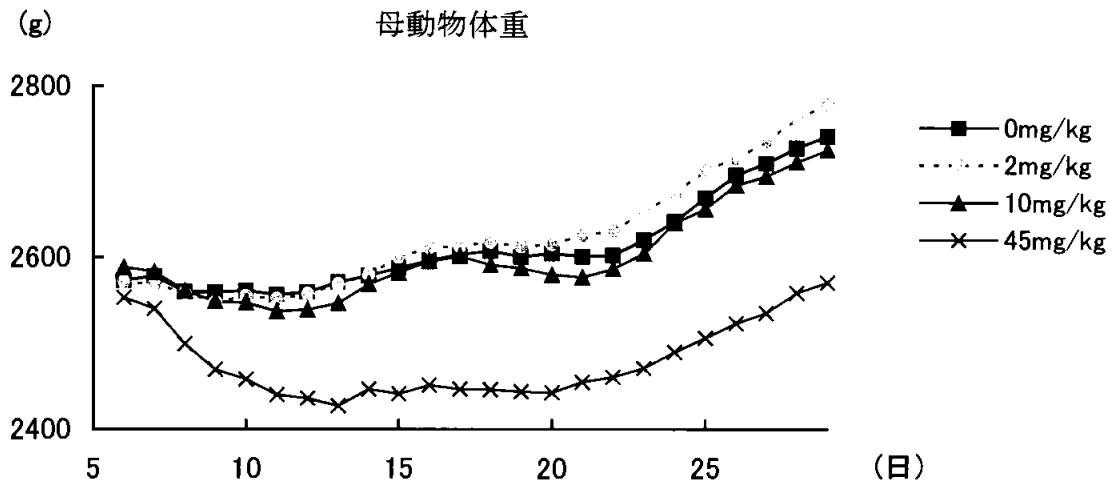
体重増加の抑制（一部体重減少）は45mg/kg群で投与期間中著明に認められた。10mg/kg群では体重増加の抑制は投与開始初期の妊娠6～11日まで認められたが、妊娠11日以降は対照群と同様な推移を示した。2mg/kg群では体重増加に影響はみられなかった。

[申請者追記]摂餌量については、10mg/kg群での6～11日に認められた減少（対照群と比較して $\downarrow 72$ 、 $p < 0.01$ )は、5日毎の測定であったことから単回投与による急性毒性影響かどうか不明であった。一方、同群で同じく6～11日にみられた体重増加量の抑制は、投与翌日の7日の体重が対照群も含めて投与前の6日の体重とほとんど変化がなかった(下表)ことから、単回投与による急性毒性影響ではないと考えた。したがって、体重に急性毒性影響がみられなかったことから、6～11日の摂餌量の減少を単回投与による毒性影響と判断しなかった。なお、予備試験においても10及び3mg/kg群では摂餌量および体重に影響は認められていない。

妊娠6～7日の体重変化量

投与量 mg/kg/日	0	2	10	45
体重変化量(g)	4.5(100%)	-2.9(100%)	-5.6(100%)	-13.2(99%)

( )内数字は投与前（妊娠6日）に対する投与後（妊娠7日）の割合



剖検において、45mg/kg 群の流産動物や全吸収胚の動物で胃に固い内容物と小腸に血管走行の明瞭化がみられ、流産や全吸収胚との関連が疑われた。2、10mg/kg 群では投与に起因した肉眼所見は認められなかった。

妊娠率は 45mg/kg 群で 2 例の流産と 3 例の全吸収胚の発現のために低下した。

黄体数、着床数、着床前死胚率及び生存胎児数には対照群と全投与群の間で有意な差は認められなかった。着床後死胚率では、全吸収胚動物を除いた場合、対照群と全投与群の間で有意な差は認められなかったが、45mg/kg 群では 3 匹の全吸収胚がみられたため、これを加味した場合は増加の傾向がみられた。

## 2. 児動物

胎児の性比について 45mg/kg 群でのみ雄の比率が有意に減少した。しかし、胎児の外表及び内臓評価でも雄の雌化の兆候は認められなかったこと、予備試験において、胎児の性比に差が認められていないこと、さらに背景データで本系統のウサギは大きな範囲で変動することがみられていることから、雄胎児の低い割合は偶発的なものと考えられる<sup>申請者註</sup>。胎児体重は 45mg/kg 群で有意に低下し、10mg/kg 群でわずかに低下した（胎児単位では有意で、母動物単位では有意でない）。

胎盤重量は母動物単位では全投与群とも有意な差はみられなかったが、胎児単位の検定では 45mg/kg 群でのみ有意な減少となった。

45mg/kg 群で増加した奇形は、主として関節拘縮<sup>1</sup>であり、本系統のウサギに最も多く自然発生的に見られるものであったが、その発生率（4.4%）は背景データにおける上限（5.6%）内であった。

また、45mg/kg 群で 2 例の過剰第13肋骨を伴う過剰腰椎（奇形）を有する胎児がみられたが、その発生率（1.8%）は、背景データの範囲（1.3%）の上限を僅かに上回っているだけであった。しかし、45mg/kg 群において、過剰第13肋骨の発生頻度が増加しており、投与との関連性が疑われる。

従って、45mg/kg 群で関節拘縮と過剰 13 肋骨を伴う過剰腰椎が低頻度ではあるが出現していることは、検体の投与による強い母体毒性の結果と考えられる。その他の奇形の出現は低頻度であり、投与によるものとは考えられなかった。

以上の結果より、本剤の妊娠ウサギに投与したときの母動物及び胎児における無毒性量は 2mg/kg/日であった。一般的で非特異的な奇形のわずかな増加が 45mg/kg/日群で認められたが、本剤の著明な母体毒性に基づくものと考えられた。

<sup>1</sup> 申請者註：この外表検査における関節拘縮は肢の湾曲であり、多くの場合、この湾曲は前肢でのみ生じており、片側あるいは両側でその影響がみられることがある。前肢（手部）の末端は、手首（手根関節部）付近で尾状に曲がっている。胎児骨格検査では、関節拘縮の場合、湾曲を除き関節部に他の形態学的変化は認められない。

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。

-申請者註- 本試験で見られた雄胎児減少についての考察

1) 本試験でみられた性比についての統計学的評価

45mg/kg 群（最高用量群）では、結果に示したように、一腹単位の雄胎児の割合に統計学的に有意な減少がみられた。そこで雌雄出現の偏りに関する統計解析を行った。次表に対照群と 45mg/kg 群の雌雄胎児数及び雄がこのパターンで生まれる確率を示した。

一腹毎に雄胎児が生まれる確率（対照群；51.4%，45mg/kg 群；35.5%）

mg/kg	雄数	雌数	合計	雄がこのパターンで生まれる確率	mg/kg	雄数	雌数	合計	雄がこのパターンで生まれる確率
0 対照群	4	5	9	0.246	45 最高用量群	1	2	3	0.375
	8	2	10	0.0439		1	4	5	0.156
	2	5	7	0.164		1	2	3	0.375
	2	4	6	0.234		1	4	5	0.156
	4	3	7	0.273		3	3	6	0.313
	0	7	7	0.00781		1	2	3	0.375
	3	5	8	0.219		2	4	6	0.234
	5	3	8	0.219		1	4	5	0.156
	3	1	4	0.25		3	5	8	0.219
	3	2	5	0.313		2	5	7	0.164
	4	6	10	0.205		4	4	8	0.273
	5	3	8	0.219		4	7	11	0.161
	2	1	3	0.375		4	2	6	0.234
	4	2	6	0.234		4	6	10	0.205
	2	3	5	0.313		4	2	6	0.234
	4	3	7	0.273		2	2	4	0.375
	2	6	8	0.109		2	4	6	0.234
	4	1	5	0.156		0	3	3	0.125
	4	2	6	0.234		2	7	9	0.0703
	3	4	7	0.273					
3	3	6	0.313						
5	4	9	0.246						

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。

まず雄胎児または雌胎児を多く有する腹数が期待される腹数（1：1）とどれ程偏りがあつたかをみるためにカイ二乗検定を行った。

その結果、以下のものであつた。

母動物数 19 匹

雄胎児数>雌胎児数 2 腹

雄胎児数<雌胎児数 14 腹

雄胎児数=雌胎児数 3 腹

これを期待される腹数 9.5 腹と比較し  $\chi^2$  値を求めると

$\chi^2 = 7.58 [2 \times (15.5 - 9.5)^2 / 9.5]$  となり 1% の危険率で有意であつた。

次にこの偏りが偶発的な雌腹の存在によって生じたかどうかをみた。その結果表にみられるように 45mg/kg 群で特に雄胎児を極端に少なく有する腹（雌腹）は認められず（目安として 0.05 以下）、その可能性は否定された。

従つて、この統計解析結果は、45mg/kg における雄胎児比率の有意な減少を支持するものであつた。

## 2) 本試験における雄胎児に対する外表及び内臓検査の結果

投与用量 mg/kg	検査胎児数 -雄-	雌化兆候を示唆する所見 をもつた雄胎児数
0	76	0
2	52	0
10	76	0
45	42	0

上表でみられるように、本試験において、外表及び内臓検査で雌化兆候を示す雄胎児は各群共に 1 例も認められなかつた。

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) 本試験で用いられたヒマラヤン系ウサギの胎児の性比に関する背景データ  
一腹単位 雄胎児の割合

1988 - 1993 年 ; 39.7~62.3% (18 試験における対照群の平均値幅)

1995 - 1997 年 ; 35.3~56.9% (11 試験における対照群の平均値幅)

以上のように、かなりの雄の胎児数の割合には巾がみられた。このうち最も低値を示した 35.3%群のデータ (16 腹) を以下に示した。

雄数	雌数	総数	雄がこの数だけ生まれる確率
3	3	6	0.313
3	4	7	0.273
3	7	10	0.117
4	4	8	0.273
1	6	7	0.0546
0	5	5	<u>0.0313</u>
3	4	7	0.273
1	7	8	<u>0.0313</u>
2	6	8	0.109
1	3	4	0.25
3	4	7	0.273
2	2	4	0.375
5	2	7	0.164
2	4	6	0.234
3	3	6	0.313
2	6	8	0.109

1) で行った群内の雌雄偏りの分析をこのデータについても実施した。  
その結果、以下のようであった。

母動物数 16 匹

雄胎児数 > 雌胎児数 1 腹

雄胎児数 < 雌胎児数 11 腹

雄胎児数 = 雌胎児数 4 腹

これを期待される腹数 8 腹と比較し  $\chi^2$  値を求めると

$\chi^2 = 6.25$  となり 5% の危険率で有意であった。

2 例にいわゆる雌腹例 (目安として雄がこのパターンで生まれる確率が 5% 以下のもの) がみられたので、この 2 例をのぞいてカイ二乗検定を行った。

その結果以下のようであった。

母動物数 14 匹

雄胎児数 > 雌胎児数 1 匹

雄胎児数 < 雌胎児数 9 匹

雄胎児数 = 雌胎児数 4 匹

同様に  $\chi^2$  値を求めると  $\chi^2 = 4.57$  となり、5% の危険率でこの対照群のデータに

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。

において雄胎児比率の減少を示唆する雌雄の偏りが認められた。

これらのことから、本試験における 45mg/kg 群の雄胎児の比率は 35.5%であったが、本試験系統において、背景データからみてこの程度の偏りは生じ得ることが示唆された。

#### 4) 予備試験における胎児の性比

予備試験では検体を 0、3、10、30、40、50mg/kg で妊娠 6～28 日までの間経口投与した。本試験の最高用量群は 45mg/kg 群であったことから、統計学的解析は予備試験における 40、50mg/kg 群を 1 つの群としてみなして実施した。

#### 対照群と投与群(40+50mg/kg)との比較

群	mg/kg	雄数	雌数	総数	雄の割合(%)		雄がこのパターンで生まれる確率
					胎児単位	一腹単位	
対照群	0	2	3	5		40	0.313
	0	5	3	8		62.5	0.219
	0	4	5	9		44.4	0.243
		11	11	22	50	49.0	
投与群	40	3	5	8		37.5	0.219
	40	2	4	6		33.3	0.234
	40	6	0	6		100	<u>0.0156</u>
	50	4	1	5		80	0.156
	50	1	7	8		12.5	<u>0.031</u>
	50	2	1	3		66.7	0.375
		18	18	36	50	55.0	

対照群と投与群における雌雄胎児数は対照群、投与群共に雌雄同数であった。また一腹毎の雄胎児の比率も順位和検定の結果、対照群と投与群との間に有意差は認められなかった。また投与群において (1) で行った雌雄の偏りについて調べた結果、雄胎児のほうが多い母体は 3 腹、雌胎児のほうが多い母体は 3 腹と同数であった。また雄胎児あるいは雌胎児が各パターンで生まれる確率で 5% 以下の例はそれぞれ 1 例みられた。

なお、同様に予備試験の各用量群 (3～50mg/kg) に特異的な性の偏りは認められなかった。

以上、本試験において、最高用量群で胎児雌雄の比率に偏りが統計学的に有意にみられた。しかし、雄胎児の外表及び内臓検査でも雌化の兆候は認められなかったこと、本系統は性比のばらつきが大きく、背景データにおいて投与群のように雄胎児の割合が少ない群もみられたこと、また予備試験の結果を更に統計学的に検定した結果、有意な差がみられていないことから、今回認められた腹毎の雄胎児の割合の減少については、試験責任者の結論、すなわち偶発的な所見であることを指示できるものと推察する。

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

投与量 mg/kg		0	2	10	45			
交尾動物数		24#	24#	24	24			
着床動物数		22	22	24	24			
生存胎児を有する動物数		22	20	24	19			
母動物	全吸収胚雌数		0	1	0	3		
	流産		0	1	0	2		
	一般症状							
	体重増加量 (6-28 日) d		154.5g	191.4g	122.5g	5.4g↓		
	摂餌量 d				↓ (6~11 日)	↓ (6~21, 24~29 日)		
	飲水量					低下		
	剖検所見							
	胃/固い内容物					1		
	腸/著明な血管像					2		
				(a)20例	(b)21例		(a)19例	(b)22例
	黄体数 ★ d		8.4	8.1	8.1	7.8	7.7	7.6
	着床数 ★ d		7.8	7.3	7.4	7.5	7.0	7.0
	着床前死胚数★ k		0.6	0.8	0.7	0.3	0.7	0.6
	着床後死胚数★ k		0.9	0.8	1.1	0.3	1.0	1.8
	着床前死胚率 <sup>1)</sup> f		7.1	9.3	8.8	4.3	8.9	7.8
	着床前死胚率 <sup>2)</sup> k		7.2	9.7	9.2	4.1	7.8	6.7
	着床後死胚率 <sup>1)</sup> f		11.7	10.2	14.8	4.4	14.3	26.0**
	着床後死胚率 <sup>2)</sup> k+dn	k*	11.5	12.1	-	4.1	14.5	-
		k**	11.5	-	16.3	4.1	-	26.2
生存胎児数 ★ d		6.9	6.6	6.3	7.2	6.0	5.2	
雄の割合 (a) k		51.4	42.6	44.5	35.5**			
雄の割合& f		50.3	39.4	44.2	36.8			
生存胎児体重(g) (a) d		35.8	36.7	33.6	28.6↓			
生存胎児体重(g) & d		35.1	35.3	32.9↓	27.5↓			
胎盤重量(g)		3.91/3.99	4.01/4.30	3.83/3.92	3.37↓/3.56			
胎児単位/母動物単位								

d : Dunnett 多重比較 (↓ : p<0.05, ↓↓ : p<0.01),

k : Kruskal-Wallis 検定 (\*又はk\* : p<0.05, \*\*又はk\*\* : p<0.01)

k+dn : Kruskal-Wallis 検定 + Dunn 多重比較

f : Fisher 検定 (+ : p<0.05, ++ : p<0.01)

# : 子宮異常 (0 mg/kg で 2 例, 2 mg/kg で 1 例), 空欄 : 異常なし, ( ): 母動物数

(a) : 生存胎児を有する動物数, (b) : 生存胎児を有する動物数 + 全吸収胚雌数

1) : 各群総数で算出, 2) : 各母動物で算出, ★ : 1 匹の母動物あたり, & : 胎児単位



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。

投与量 mg/kg		0	2	10	45
胎	検査動物数	151 (22)	132 (20)	172 (24)	114 (19)
	外表検査				
	奇形 関節拘縮	3 (2)	1	3 (3)	5 (2)
	内臓検査				
	奇形 小眼窩	1			
	内水頭症		1	1	
	心室中隔欠損	1	1	3 (3)	2 (1)
	腎臓欠損				1
	胆嚢欠損	1	1		
	骨格検査				
児	奇形 肋骨癒合 13肋骨を伴う過剰腰椎 過剰腰椎		2 (2)		2 (2)
	変異 過剰 13 肋骨		2 (2)	1	4 (3)
	骨化遅延 第 5 中節骨	2 (2)	2 (2)	6 (2)	36** (16**)
	中手骨		1	1	9** (4)
	踵骨				9** (4)
	第 1 頸椎	10 (3)	11 (6)	13 (7)	32** (11)
	舌骨	73 (19)	73 (17)	70 (22)	81** (17)

\* : p<0.05 \*\* : p<0.01 [フィッシャー検定]

空欄 : 異常なし

( ) : 母動物数

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。

### 13. 変異原性

(1) チアクロプリドの細菌を用いた復帰突然変異性試験 (資料No. 原体-23)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1995年8月24日

検体の純度：96.8%

試験系：細菌(サルモネラ菌〈TA98、TA100、TA1535、TA1537〉大腸菌〈WP2uvrA〉)

#### 【試験方法】

##### 試験用量設定の理由及び試験液の調製方法

0、312.5、625、1250、2500、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の濃度で、S9-Mixの非存在下と存在下で行った予備試験の結果、検体はいずれの濃度でも生育阻害を示さなかったことから、本試験の用量として0、313、625、1250、2500、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ を設定した。溶媒としてDMSOを用いた。

##### Ames試験(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*)の4株およびトリプトファン要求性の大腸菌(*Escherichia coli*)の1株を用い、フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンで酵素誘導したラット肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S9-Mix)の非存在下及び存在下でAmesらの方法により変異原性を検定した。

各濃度とも3プレートを用いた。試験は再現性をみるために2回行った。

各菌株及び各濃度毎の平均復帰変異コロニー数が、溶媒対照の平均復帰コロニー数の2倍以上で用量相関性のある増加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 に示したように、2 回の試験とも代謝活性化の有無にかかわらず、ど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、かつ用量相関性のある増加は認められなかった。しかし、5000 $\mu$ g/プレートで、代謝活性化の有無にかかわらず 5 菌株全てに結晶の析出が認められた。

一方、2 回の試験とも、陽性対照として用いた AF-2<sup>1)</sup>、NaN<sub>3</sub><sup>2)</sup>、9-AA<sup>3)</sup>では溶媒対照と比較して著明な復帰変異コロニー数の増加が認められ、また、2-AA<sup>4)</sup>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菌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を有さないものと判断される。

1) : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

2) : Sodium azide

3) : 9-Aminoacridine

4) : 2-Aminoanthracene

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 1. 復帰変異試験成績 (第1回目)

物質	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 復帰変異コロニー数/プレート					S-9 復帰変異コロニー数/プレート						
		Mix	塩基対置換型			フレームシフト型	Mix	塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98		TA1537	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒 対照	0	-	107	11	19	42	10	+	124	18	21	46	13
			118	10	20	38	8		106	14	23	43	20
			124	10	17	35	11		117	20	27	46	10
			116	10	19	38	10		116	17	24	45	14
検体	313	-	122	10	16	36	14	+	126	13	20	47	15
			129	6	15	36	9		114	18	20	51	12
			123	13	17	47	12		121	9	31	50	10
			125	10	16	40	12		120	13	24	49	12
	625	-	125	7	16	33	12	+	107	11	23	53	17
			130	9	13	30	12		127	14	34	45	12
			115	6	16	33	10		116	7	22	49	15
			123	7	15	32	11		117	11	26	49	15
	1250	-	119	8	15	29	7	+	105	12	26	39	6
			117	10	18	27	11		115	13	25	40	12
			125	11	12	35	13		103	13	31	37	9
			120	10	15	30	10		108	13	27	39	9
	2500	-	107	5	18	34	9	+	103	11	22	39	9
			113	5	19	25	10		116	7	19	46	13
			112	8	16	29	5		117	13	27	43	10
			111	6	18	29	8		112	10	23	43	11
	5000*	-	114	7	10	25	5	+	110	10	20	39	10
			104	6	17	27	6		131	13	18	33	6
			105	6	16	20	4		119	8	18	44	11
			108	6	14	24	5		120	10	19	39	9
陽性 対照	-	453 <sup>a)</sup>	155 <sup>b)</sup>	129 <sup>a)</sup>	458 <sup>c)</sup>	407 <sup>d)</sup>	+	486 <sup>e)</sup>	142 <sup>f)</sup>	365 <sup>e)</sup>	192 <sup>h)</sup>	80 <sup>f)</sup>	
		403	136	137	389	399		532	135	327	211	80	
		418	124	122	395	355		548	126	362	195	73	
		425	138	129	414	387		522	134	351	199	78	

a) AF-2 : 0.01 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

b) Na<sub>3</sub> : 0.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

c) AF-2 : 0.1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

d) 9-AA : 80.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

e) 2-AA : 1.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

f) 2-AA : 2.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

g) 2-AA : 10 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

h) 2-AA : 0.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

点線下の数値は平均値

\* : 結晶析出

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 2. 復帰変異試験成績 (第2回目)

物質	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 復帰変異コロニー数/プレート					S-9 復帰変異コロニー数/プレート						
		Mix	塩基対置換型			フレームシフト型	Mix	塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98		TA1537	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒 対照	0	-	108	16	16	33	10	+	99	14	23	31	9
			93	24	16	29	14		103	13	17	36	10
			103	20	17	30	5		100	16	21	37	9
			101	20	16	31	10		101	14	20	35	9
検体	313	-	106	18	16	29	9	+	105	17	26	29	9
			119	20	13	28	8		105	25	23	40	9
			104	22	18	33	9		114	17	25	46	10
			110	20	16	30	9		108	20	25	38	9
	625	-	106	15	15	26	10	+	118	15	23	37	7
			108	14	15	40	9		108	22	19	31	10
			110	22	14	37	8		117	14	17	38	9
			108	17	15	34	9		114	17	20	35	9
	1250	-	94	18	16	26	8	+	101	13	23	29	12
			101	16	13	22	4		94	12	23	25	7
			95	18	18	30	8		117	19	24	28	7
			97	17	16	26	7		104	15	23	27	9
	2500	-	107	16	12	19	5	+	103	16	17	33	16
			96	15	15	28	4		85	18	20	36	6
			91	18	12	30	6		90	20	20	39	8
			98	16	13	26	5		93	18	19	36	10
	5000*	-	97	11	14	22	4	+	85	16	14	34	7
			100	15	16	25	5		83	15	17	28	5
			104	19	11	27	6		90	16	20	31	7
			100	15	14	25	5		86	16	17	31	6
陽性 対照		-	531 <sup>a)</sup>	157 <sup>b)</sup>	110 <sup>a)</sup>	401 <sup>c)</sup>	468 <sup>d)</sup>	+	360 <sup>e)</sup>	110 <sup>f)</sup>	489 <sup>e)</sup>	193 <sup>h)</sup>	62 <sup>d)</sup>
			470	147	107	371	444		396	96	369	210	62
			490	154	99	358	521		400	122	461	183	70
			497	153	105	377	478		385	109	440	195	65

a) AF-2 : 0.01 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

b)  $\text{NaN}_3$  : 0.5  $\mu\text{g}/\text{プレート}$

c) AF-2 : 0.1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

d) 9-AA : 80.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

e) 2-AA : 1.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

f) 2-AA : 2.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

g) 2-AA : 10 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

h) 2-AA : 0.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

点線下の数値は平均値

\* : 結晶析出

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) チアクロプリドのチャイニーズハムスター由来V79培養細胞を用いた  
in vitro 染色体異常試験 (資料No. 原体-24)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1995年11月24日

検体の純度：97.2% (1994年9月)、96.8% (1995年2月)

試験系：チャイニーズハムスターV79由来培養細胞

試験期間：処理(4時間)開始後18(全濃度)及び30時間観察(溶媒対照, 最高濃度のみ)

#### 【試験方法】

継代培養したチャイニーズハムスターV79由来培養細胞を用い、代謝活性化、非代謝活性化の条件下で染色体異常誘発性を検定した。

#### 投与用量の決定

本試験の投与用量は、予備試験(S9-Mix非存在下, S9-Mix存在下, 4時間処理, 処理後24時間観察)の結果で得られた細胞毒性に基づいて設定した。この試験では、1~750 µg/mLの範囲で行った。その結果、溶媒対照群に比較して有糸分裂指数も生存細胞数ともS9-Mix非存在下とS9-Mix存在下で強い影響はみられなかった。そこで、750 µg/mLを本試験の最高濃度とした。従って、S9-Mix非存在下とS9-Mix存在下とも、0(溶媒対照, 無処理)、75、300、750 µg/mLの濃度を設定した。

#### 検体の調製

検体を所定量のDMSOに溶解し、2種の陽性対照物質はハンクス液に溶解した。

#### 標本の作成

フラスコに牛胎仔血清を含む培地20mLを入れ、そこに $1 \times 10^6$ 個のV79由来培養細胞を播種した。これを一定時間炭酸ガス恒温器内で培養した。その後培養液を捨て、S9-Mix非存在下では20mLの新鮮な培地と0.2mLの検体液を、S9-Mix存在下では19mLの新鮮な培地、1mLのS9-Mix、0.2mLの検体液を加えて4時間炭酸ガス恒温器内で処理した。その後さらに新鮮な培地と交換し、18時間と30時間培養した。各培養の終

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。

了 2 時間前に中期分裂細胞を集めるためにコルセミドを培養液中に添加した。なお、S9 分画は Aroclor 1254 を投与したラット肝臓から調製されたものを用いた。各濃度とも 2 連で培養した。

培養終了後、各染色体標本を作製した。培養後の細胞を 0.56% KCl 液で低張処理をした後に、冷エタノール/酢酸混液(3:1)中で固定した。冷却した水に浸したスライドガラス上に固定細胞液を滴下して乾燥後、ギムザ液で染色した。1 培養当たり 2 枚のスライド標本(1 枚はバックアップ用で通常評価には使用せず)を作製した。陽性対照では培養 18 時間後にのみ標本を同様に作製した。陽性対照物質として、S9-Mix 非存在下の場合はマイトマイシン C (0.1 $\mu$ g/mL)、S9-Mix 存在下の場合はシクロホスファミド (2.0 $\mu$ g/mL)を用いた。

#### 細胞生存率

培養終了後トリプシン処理してから適当な希釈液について、血球計数機を用いて生存細胞数を測定した。

#### 有糸分裂指数

1 培養あたり、1000 個の細胞を算定することにより有糸分裂指数を求めた。

#### 中期分裂細胞の検査

光学顕微鏡を用いてスライドあたり 100 個の中期分裂細胞の染色体と染色分体についてギャップ、切断、断片、欠失、交換、重複異常などの構造異常を検査した。従って、2 連で培養を行っているので各濃度当たり 200 個の中期分裂細胞の染色体を観察した。

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。

## 【結果】

### 1) 一般事項

最高濃度の 750  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度では、培地の浸透圧及び pH に変化はみられなかった。また、培地中での検体の沈殿もみられなかった。

### 2) 細胞生存率

S9-Mix 非存在下では 750  $\mu\text{g}/\text{mL}$  における 18 時間の標本で有糸分裂指数は、溶媒対照に対して 27%に抑制され、S9-Mix 存在下では 750  $\mu\text{g}/\text{mL}$  における 30 時間の標本で有糸分裂指数は、溶媒対照に対して 38%に抑制された。

### 3) 細胞分裂頻度

S9-Mix 非存在下では、750  $\mu\text{g}/\text{mL}$  における 18 時間の標本で、有糸分裂指数は溶媒対照に対して 22%が抑制されたが、30 時間の標本で、有糸分裂指数は溶媒対照に対して抑制されなかった。一方、S9-Mix 存在下においては、いずれの処理群にも有糸分裂指数の抑制は認められなかった。

### 4) 染色体異常

検査結果は、次頁の表に示した。

検体は S9-Mix の存在下及び非存在下の両者において、すべての処理群でいずれの標本作製時間においても染色体異常を示す中期分裂細胞数の増加を示さなかった。

陽性対照として使用したマイトマイシン C、シクロホスファミドでは染色体異常を示す中期分裂細胞が明らかに増加した。

以上の結果より、検体は、代謝活性化を含む本試験条件下でチャイニーズハムスター V79 由来培養細胞系で染色体異常を誘発しないものと判断される。



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

実験群 濃度 µg/mL	S9- Mix	回収 時間	観察 細胞数	ギャップ		構造異常の分類										構造異常細胞 <sup>c</sup>				
						染色体型			染色体型			その他								
						g	ig	b	f	d	ib	if	id	ex	maE	ma	cd	含む	除外	交換
溶媒対照	-	18	200	1	0	1	0	0	0	3	2	0	0	0	0	3.5	3.0	0.0		
無処理			200	0	0	1	0	0	0	2	4	0	0	0	0	3.0	3.0	0.0		
75			200	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	1.5	1.5	0.5		
300			200	2	0	1	1	0	4	0	2	4	0	0	0	5.0	4.0	1.5		
750			200	0	0	0	0	0	1	2	2	1	0	0	0	3.0	3.0	0.5		
陽性対照 <sup>A</sup>			200	13	0	34	4	0	38	19	4	43	3	0	0	54.0*	51.5*	21.0*		
溶媒対照			+	18	200	4	0	1	0	0	1	1	2	1	0	0	0	4.5	2.5	0.5
無処理					200	0	0	1	2	0	1	3	2	3	0	0	0	4.5	4.5	1.5
75					200	0	0	0	0	0	3	2	0	1	0	0	0	2.0	2.0	0.5
300					200	2	0	1	0	0	0	3	1	1	0	0	0	4.0	3.0	0.5
750	200	1			0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	2.0	1.5	0.5		
陽性対照 <sup>B</sup>	200	8			1	15	8	0	27	12	4	35	0	0	0	38.0*	37.0*	14.5*		
溶媒対照	-	30			200	0	0	0	0	0	2	2	1	0	0	0	2.5	2.5	0.0	
750			200	0	0	0	0	0	2	3	2	2	0	0	0	4.5	4.5	1.0		
溶媒対照			+	30	200	1	0	0	0	0	1	2	3	0	0	0	3.5	3.0	1.5	
750					200	0	0	0	0	0	1	5	0	0	0	0	2.5	2.5	0.0	

処理時間; 4時間

\* :  $p \leq 0.01$  (Fisherの直接確率法)

A: マイトマイシンC(0.1 µg/mL),

B: シクロホスファミド(2.0 µg/mL)

C: 百分率

g; 染色体型ギャップ ig; 染色体型ギャップ

b; 染色体型切断 ib; 染色体型切断

f; 染色体型断片 if; 染色体型断片

d; 染色体型欠失 id; 染色体型欠失

ex; 交換, maE; 交換を含む重複異常

ma; 重複異常, cd; 染色体破損

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) チアクロプリドの細菌を用いた DNA 修復試験

(資料No. 原体-25)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 1998 年 1 月 8 日

検体の純度 : 96.9%

試験系 : 枯草菌 *Bacillus subtilis*(H17 株、M45 株)

【試験方法】

試験用量設定の理由及び試験液の調製方法

0、247、741、2222、6667  $\mu$ g/ディスクの用量による予備試験の結果、検体の最高濃度（溶解限界濃度）である 6667  $\mu$ g/ディスクでも生育阻害は認められなかった。このことから、本試験では 0、416、833、1665、3330、6660  $\mu$ g/ディスクを設定した。

Rec-assay (孢子法)

DNA 損傷の誘起作用を調べるために、枯草菌 (*B. subtilis*) の野生株である組み換え修復機構保持株 (H17) とその変異株である欠損株 (M45) の孢子を用いた。

両菌株の孢子は、孢子浮遊液として 4°C で保持しているものを使用した。約 45°C に保った孢子法用のニュートリエントアガー 1L あたり 10mL の割合で孢子浮遊液を加え、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\*0.1mL をシャーレに分注してから孢子法用の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試料 20  $\mu$ 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°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 20  $\mu$ L、検体あるいは対照物質を含む試料 20  $\mu$ L をしみ込ませ同様な操作を行った。そして、両菌株の生育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。その結果、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\*；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

【試験結果】

物質	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ )	S-9(-)			S-9(+)		
		阻止円 (mm)*		差 (mm)	阻止円 (mm)		差 (mm)
		H17	M45		H17	M45	
検体	416	0	0	0	0	0	0
	833	0	0	0	0	0	0
	1665	0	0	0	0	0	0
	3330	0	0	0	0	0	0
	6660	0	0	0	0	0	0
2-アミノアントラセン (2-AA)	5	0	0	0	0	11	11
	20	0	0	0	0	12	12
マイトマイシン C (MMC)	0.005	0	11	11	—	—	—
	0.01	1	18	17	—	—	—
硫酸カマイシン (KM)	0.5	10	11	1	—	—	—
	1.0	12	15	3	—	—	—
ジメチルスルホキシド <sup>®</sup>	(20 $\mu\text{L}$ )	0	0	0	0	0	0

\*: 1濃度当り2ディスクの平均値

検体は、代謝活性化の有無にかかわらず、溶解限界である6660 $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ においても、両菌株に対し生育阻害は認められなかった。

一方、陽性対照物質であるMMC(S-9非存在下)及び2-AA(S-9存在下)では、H17株に比べ、M45株で明らかな生育阻害が認められ、判定は陽性であった。

陰性対照物質のKM(S-9非存在下)では、両菌株に対し生育阻害が認められたが、両菌株の差が5mm以内であり、陰性であった。

以上の結果より、検体は、代謝活性化の有無にかかわらず本試験条件下でDNA損傷の誘発性を有さないものと判断される。

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

(4) チアクロプリドのラット初代肝臓培養細胞を用いた in vitro 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験 (資料No. 原体-26)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年月日 : 1996 年 9 月 16 日

検体の純度 : 97.2%  
供試生物 : ラット初代培養肝細胞  
試験期間 : 処理開始後 24 時間培養

【試験方法】

DNA 損傷性について、ラットの初代肝培養細胞を用いて in vitro 系の変異原性試験を実施した。通常、in vitro 系の変異原性試験では S9-Mix を代表とする外因的な代謝活性化系が検体及びその代謝物の変異原性を検定するのに必須である。これに対して、肝初代培養細胞ではそれ自身が高い内因性の代謝能を有している点の特徴となっており、ここで使用されている陽性対照物質の 2-アセチルアミノフルオレン (2-AAF) は代謝を受けて実際に変異原性を示すことが知られているものである。

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 DMSO に溶解した。

2. 肝細胞の単離

無処理の雄の SD 系ラットをネンブタール麻酔下でコラゲナーゼ液等で生体位灌流し、肝臓を摘出してから肝細胞を単離した。

3. 肝細胞毒性と用量設定

単離した肝細胞は、L-グルタミン、硫酸ゲンタマイシン、不活化牛胎児血清を添加した Williams E 培養液で培養した。

まず、単層細胞を得るために、ペトリ皿に  $7.5 \times 10^5$  個の肝細胞を加え、90~120 分間 5%炭酸ガス下の加湿された空気中で 37°C で培養した。その後 PBS (磷酸緩衝液) での洗浄により未接着の細胞を除去した後、所定の検体液を添加して 18~24 時間培養した。生存細胞の検査は、トリパンブルー色素排除法で行った。溶媒対照群の生存細胞数に対する検体処理群の生存細胞数から、相対生存率を求めた。

細胞毒性を確認するための予備試験 (0, 25~500  $\mu$ g/mL, 22 時間培養) の結果、生存率は 500  $\mu$ g/mL 群で減少し、著しい細胞毒性がみられた。この結果に基づいて、本試験では 0, 75, 150, 300, 350, 400, 450, 500  $\mu$ g/mL を設定した。

#### 4. UDS 検査用標本の作製と観察

肝細胞毒性試験と同様に、単層細胞を得てから、所定の検体液とともに  $10 \mu\text{Ci/mL}$  の  $^3\text{H}$ -チミジンを含む培養液で 16~24 時間培養した。その後、1%クエン酸ナトリウムでの核の膨化処理に続いて、氷酢酸と純エタノール混液(1:3)で細胞の固定を行い、水洗後に風乾した。

オートラジオグラフィ処理のために、スライドガラスを NTB-2 写真用乳剤で処理し、暗箱中において  $-20^\circ\text{C}$  で 4~10 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 50 細胞を観察した。従って、各濃度あたり 150 細胞を評価した。 $^3\text{H}$ -チンジンの取り込みを反映する細胞中の粒子を、顕微鏡に接続した TV カラーモニターを用いて計測した。

#### 5. 観察結果の表示

補正核粒子数 = 3 枚のスライドガラス(計 150 細胞)における補正核粒子数の平均値

細胞質粒子数の平均値 = 3 枚のスライドガラス(1 細胞あたり 3 ヲ所)での細胞質粒子数の平均値

5 個以上の粒子を有する核(%) = 検査細胞数(150 細胞)に対する 3 枚のスライドガラスにおける 5 個以上の補正粒子数を有する細胞数の百分率

生存率(%) = 溶媒対照群と比較した生存細胞数の割合

#### 6. 試験の評価

試験の信頼性については、主に下記の項目について評価した。

1. 溶媒対照群の生存細胞数は 16~24 時間後に 60%以上であること。
2. 溶媒対照群の平均補正核粒子数は「-6~0 個」の範囲にあり、修復期の細胞が 10%を超えないこと。
3. 陽性対照物質の 2-AAF( $1 \mu\text{g/mL}$ )において、補正粒子数を 5 以上有する細胞の割合が、60~100%であって、補正粒子数が 6~20 個の範囲にあること。
4. 検体群の補正粒子数が +2 以上(全細胞の平均値)で 20%以上の細胞が反応していれば、その反応は陽性と判定する。

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

## 【結果】

本試験で得られた、補正した核粒子数、細胞質中の粒子数、5個以上の粒子を有する核(修復中の細胞)の要約を次の表に示した。

試験群 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	核当たりの補 正粒子数	核当たり の粒子数	細胞質中の 平均粒子数	修復中の細 胞割合(%)	生存率 (%)
溶媒対照群	-1.24	2.49	3.72	0.0	100.0
検体群 75	-2.22	2.11	4.33	0.0	101.8
150	-0.79	2.10	2.89	0.0	94.1
300	-0.56	2.15	2.71	0.0	88.8
350	-0.90	1.75	2.65	0.0	94.8
400	-0.34	1.27	1.61	0.0	91.3
450	-0.42	1.33	1.75	0.0	69.8
500	-0.48	0.91	1.38	0.0	45.5
陽性対照群 2-AAF 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	9.56	13.43	3.88	92.7*	91.5

2-AAF : 2-アセチルアミノフルオレン \* :  $P \leq 0.05$  ( $\chi^2$ 検定)

すべての濃度の検体処理群では、溶媒対照群に比較して、核当たりの補正粒子数に増加傾向や修復中の細胞の割合について統計学的に有意な増加は認められなかった。陽性対照群では核当たりの補正粒子数と修復中の細胞の割合について著明な増加を示した。

以上の結果より、検体は、ラット肝臓の初代培養細胞における UDS を指標とした DNA 損傷性を有さないものと判断される。

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

(5) チアクロプリドのV79-HPRT(前進突然変異)法による in vitro 変異原性誘発試験  
(資料No. 原体-27)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1996年6月13日

検体の純度：96.8% (1995年2月)、97.2% (1995年8月)

試験系：チャイニーズハムスターV79由来培養細胞

**【試験方法】**

試験用量設定の理由及び試験液の調製方法

検体の細胞毒性は7.81~1000  $\mu\text{g/mL}$  で検討した。500  $\mu\text{g/mL}$  の濃度で被験物質の沈殿が観察された。しかし、S9mix 非存在下および存在下ですべての濃度で細胞毒性は観察されなかった。従って、S9mix 非存在下およびS9mix 存在下とも15.6~500  $\mu\text{g/mL}$  の範囲で6濃度を設定した。なお、最高濃度の500  $\mu\text{g/mL}$  で浸透圧を測定したところ、溶媒対照群と同等であった。その他、陰性対照群1群、溶媒対照群1群、陽性対照群(非代謝活性化：EMS、代謝活性化：DMBA)1群を設定した。溶媒にはDMSOを用いた。

コロニー形成率と突然変異試験

$4 \times 10^6$  個のV79由来細胞を培養液中に播種して培養した。接着後(16~24時間後)に、交換した培養液に各濃度の検体を添加して非代謝活性下及び代謝活性下条件で各々5時間暴露した。その後、単層の細胞をPBSで洗浄し、トリプシン処理し、細胞浮遊液を作製し、3枚のペトリディッシュそれぞれに200個の細胞を再播種した。

ペトリディッシュは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、4日と7日に継代した。最初の継代のときに、各用量群および対照群当たり2個の250mLフラスコに $1.5 \times 10^6$  個の細胞を再播種し、ほぼ7日間培養した。変異株細胞選抜のために100 $\mu\text{g/mL}$  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ディッシュ(合計8ディッシュ)に $3 \times 10^5$  個の細胞を播種した。また絶対コロニー形成率を求めるためにディッシュ(3枚のディッシュ)に200個の細胞を培養液に播種した。さらに、37°C、約5%の炭酸ガスの条件下で6~7日間培養した後、コロニーを固定し、ギムザ液で染色した。突然変異株選択用ディッシュでは6-TG耐性コロニー数を、また

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。

コロニー形成率測定用ディッシュではコロニー数を計測した。ただし 50 個以下の細胞から形成されるコロニーは除外した。

## 【結果及び考察】

### 1. コロニー形成率

突然変異試験の溶媒対照群の絶対コロニー形成率は非代謝活性化条件下で 62.0～84.2%、代謝活性化条件下で 51.3～96.3%の範囲であった。従って試験におけるコロニー形成状態は良好であった。

### 2. 非代謝活性化条件における突然変異

非代謝活性化条件下で 2 回の試験を行い、いずれも細胞毒性はみられなかった。62.5 µg/mL 群の 2 回目の試験で変異率の増加がみられた。しかし、この増加に再現性はなく、用量関連性もなかったことから、検体に起因した変化とは考えられなかった。また、この増加した変異率 (2.8～8.6) は対照群の背景データの範囲内 (1.0～22.6) にあった。陽性対照物質の EMS は 2 回の試験で明らかな変異原性を誘発した。したがって、検体は非代謝活性化条件下で変異原性はないと評価した。

### 3. 代謝活性化条件における突然変異

代謝活性化条件下で 3 回の試験を行った。いずれの試験にも、細胞毒性はみられなかった。突然変異出現頻度の僅かな増加は、2 回目の試験の 125、250、500 µg/mL 濃度群に認められた。これらの増加は、2 回目の試験の併行して処理した濃度あるいは 1 回目と 2 回目の試験とで再現性はなく、生物学的に意味があるとは考えられなかった。3 回の試験を一緒にした統計評価では、試験したいずれの濃度においても溶媒対照群を越える突然変異出現頻度の統計的に有意な増加は認められなかった。陽性対照物質である DMBA は明らかな変異原性を示した。したがって、検体は本試験系の代謝活性化の存在下で変異原性はないと評価した。

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前進変異誘発性を有さないものと判断される。



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

非代謝活性化

群	濃度 µg/mL	1回目試験					2回目試験				
		生存 細胞数	相対 増殖 <sup>A</sup>	総変異 株数 <sup>B</sup>	コロニー 形成率 <sup>C</sup>	変異率 ×10 <sup>-6</sup>	生存 細胞数	相対 増殖 <sup>A</sup>	総変異 株数 <sup>B</sup>	コロニー 形成率 <sup>C</sup>	変異率 ×10 <sup>-6</sup>
陰性対照		167.0	111.3	9 6	62.0 61.5	6.0 4.1	161.3	112.0	5 6	59.8 66.0	3.5 3.8
溶媒対照 (DMSO)		150.0	100.0	7 7	66.5 62.0	4.4 4.7	144.0	100.0	2 9	84.2 67.3	1.0 5.6
陽性対照 EMS	900	39.0	26.0	965 1183	43.3 69.5	1061* 709*	102.0	70.8	871 740	48.0 59.0	756.1* 696.8*
検体	15.6	142.0	94.7	2 10	57.3 72.5	1.7 6.6	126.7	88.0	7 3	68.2 50.0	4.3 2.5
	31.3	220.3	146.9	2 8	57.8 79.8	1.9 4.2	144.7	100.5	6 11	85.5 64.5	3.3 7.1
	62.5	168.0	112.0	12 5	66.5 73.3	7.5 2.8	152.3	105.8	9 12	66.0 58.2	5.7* 8.6*
	125.0	181.7	121.1	3 10	61.7 71.8	2.3 5.8	188.3	130.8	12 4	72.0 70.5	6.9 2.4
	250.0	123.0	82.0	15 5	75.0 80.0	11.1 2.6	139.7	97.0	5 1	67.0 71.8	3.1 0.6
	500.0	137.3	91.6	11 17	64.8 77.2	11.3 9.2	111.5	77.4	1 3	52.0 61.0	0.8 2.0

A: 溶媒対照に対する百分率      B: 8ディッシュのコロニーの合計      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

\* : p<0.05 ( DUNNETT )

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。

代謝活性化

群	濃度 μg/mL	1回目試験					2回目試験				
		生存 細胞数	相対 増殖 <sup>A</sup>	総変異 株数 <sup>B</sup>	コロニー 形成率 <sup>C</sup>	変異率 ×10 <sup>-6</sup>	生存 細胞数	相対 増殖 <sup>A</sup>	総変異 株数 <sup>B</sup>	コロニー 形成率 <sup>C</sup>	変異率 ×10 <sup>-6</sup>
陰性対照		169.7	115.9	1	73.8	0.6	150.3	84.3	19	74.8	10.6
				1	56.0	0.7			16	81.8	8.1
溶媒対照 (DMSO)		146.3	100.0	6	70.2	4.1	178.3	100.0	19	92.5	8.6
				6	64.7	3.9			20	96.3	8.7
陽性対照 DMBA	20	179.3	122.6	177	59.3	124.4*	157.0	88.0	125	82.8	62.9*
検体	15.6	206.3	141.0	1	67.3	0.6	181.7	101.9	35	101.8	14.3
				2	66.8	1.2			34	84.0	16.9
	31.3	140.7	96.1	2	71.5	1.2	107.3	60.2	30	64.3	19.4
				4	65.0	2.6			24	80.8	12.4
	62.5	154.7	105.7	1	66.7	0.6	115.7	64.9	27	87.8	14.6
				2	58.2	1.4			16	69.7	9.6
	125.0	171.7	117.3	1	58.2	0.7	161.0	90.3	39	80.2	20.3
4				67.8	2.5	21			101.7	8.6	
250.0	156.0	106.6	5	66.0	3.2	112.0	62.8	33	63.7	21.6	
			7	70.3	4.1			15	79.5	7.9	
500.0	146.7	100.2	7	52.7	5.5	132.0	74.0	46	60.0	31.9	
			5	65.3	3.2			13	70.2	7.7	

群	濃度 μg/mL	3回目試験				
		生存 細胞数	相対 増殖 <sup>A</sup>	総変異 株数 <sup>B</sup>	コロニー 形成率 <sup>C</sup>	変異率 ×10 <sup>-6</sup>
陰性対照		136.7	79.2	1	63.7	0.7
				1	71.7	0.6
溶媒対照 (DMSO)		172.7	100.0	3	51.3	2.4
				1	86.0	0.5
陽性対照 DMBA	20	142.0	82.2	45	86.0	21.8*
検体	15.6	187.3	108.5	3	64.7	1.9
				1	93.5	0.4
	31.3	178.3	103.3	4	91.5	1.8
				0	87.2	0.0
	62.5	155.3	90.0	5	74.5	2.8
				2	82.7	1.3
	125.0	190.5	110.3	2	106.8	0.8
7				53.3	5.5	
250.0	180.3	104.4	1	105.0	0.4	
			2	69.8	1.4	
500.0	132.7	76.8	1	53.5	0.8	
			3	112.2	1.5	

A: 溶媒対照に対する百分率 B: 8ディッシュのコロニーの合計 C: 細胞200個あたりのコロニー形成率

DMBA: ジメチルベンズアントラセン

\*: p<0.05 (DUNNETT)

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) チアクロプリドのマウスにおける小核試験

(資料No. 原体-28)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1995年11月24日

検体の純度：97.2% (1994年9月)、96.8% (1995年2月)

試験系：NMRI系マウス、1群雌雄各5匹  
(試験開始時 約6~12週齢、体重27~43g)

試験期間：16, 24, 48時間

【試験方法】

検体を0.5%クレモホア液に懸濁して、1群雌雄各5匹のマウスに60mg/kgを1回腹腔内投与し、16、24、48時間後に屠殺し、大腿骨の骨髄を摘出した。

陰性対照として0.5%クレモホア液のみを、陽性対照として脱イオン水に溶解したシクロホスファミドの20mg/kgを検体と同様に腹腔内投与した。24時間後に屠殺し、大腿骨の骨髄を摘出した。

投与容量は、検体、陰性対照、陽性対照とも10mL/kgとした。

検査用の標本はSchmidの方法により作製し、光学顕微鏡により評価した。即ち、1動物につき1000個の多染性赤血球を観察し、同時に正染性赤血球数も観察した。

投与量設定は、雌雄計5匹の1群に100、75、50、10mg/kgの検体をそれぞれ腹腔内投与した予備試験に基づいた。この予備試験では50 mg/kg以上の群に無関心、自発運動量低下、けいれん、筋攣縮、ふるえ、呼吸困難等が1時間までにみられ、75 mg/kg群で5例中1匹、100mg/kgでは5匹全例に死亡が観察された。この結果から本試験での投与量として60mg/kgを選択した。

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。

## 【試験結果】

### 1) 一般症状

腹腔内投与後16時間までの間に、無関心、被毛粗剛、けいれん、呼吸困難等がみられた。

死亡は検体投与群の40匹中3匹に認められた。

### 2) 突然変異誘発性

多染性赤血球の観察結果は、雌雄間に差は認められなかったのでまとめて評価し、下表に示した。

投与群	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
陰性対照群	10000	1066 ± 279	1.0 ± 1.2	1.9 ± 1.1
検体 16時間	10000	901 ± 178	2.0 ± 1.5	2.7 ± 1.3
検体 24時間	10000	993 ± 204	1.5 ± 1.0	2.4 ± 1.4
検体 48時間	10000	979 ± 448	2.0 ± 1.4	1.8 ± 0.8
陽性対照 シクロホスファミド <sup>6</sup>	10000	911 ± 248	2.6 ± 1.4	18.5* ± 4.6

\* : Wilcoxonの順位和検定で有意差 (p < 0.01) あり

60mg/kgの検体を腹腔内に投与した群と陰性対照群との間の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、1.9/1000、検体投与群では、16、24、48時間後の屠殺でそれぞれ、2.7/1000、2.4/1000及び1.8/1000であった。これらの頻度は陽性の結果を意味するものではなかった。多染性赤血球に対する正染性赤血球の割合は、検体投与群で影響はみられなかった。

陽性対照薬剤のシクロホスファミドの作用は、小核を有する多染性赤血球の著明な増加（頻度は18.5/1000）がみられたことによって確認された。小核を有する正染性赤血球数は投与群と陽性対照群とも有意な増加を認めなかった。

以上の結果から、本検体には突然変異誘発作用はないものと判断された。

#### 14. 生体の機能に及ぼす影響

チアクロプリドの生体機能に及ぼす影響に関する試験

(資料 No. 原体-29)

試験機関：

報告書作成年月日：1998年5月19日

検体の純度：96.9%

供試動物：ICR系マウス、SD系ラット、日本白色在来種ウサギ

試験期間：1997年11月～1998年5月

##### 【試験項目及び結果】

検体をクレモホア EL を加え摩砕後、注射用蒸留水に懸濁した（クレモホア EL 最終濃度；2%）。投与方法は経口投与とし、投与前 18～24 時間絶食した。検体の投与用量は、マウスは 10、30、100mg/kg、ラットは 30、100、300mg/kg、ウサギは 10、30、100、300、1000mg/kg とした。いずれの検査時においても対照群として、溶媒のみが投与された。投与容量は、いずれの動物種とも 10mL/kg とした。

##### 1. 一般症状及び行動に対する影響

###### 1) マウスにおける一般症状

供試動物：ICR系雄マウス、8週齢、体重；28.5～32.1g、1群各5匹

方 法：投与前、投与後 0.5、1、2、4、6 及び 24 時間に Irwin 法に準じた症状観察を行った。

結 果：Irwin 法に準じて観察した一般症状において、溶媒及び検体 10、30mg/kg 投与群ともに、投与前と比較して、投与後のいずれの観察時間でも変化はみられなかった。しかし、100mg/kg 群では、握力の低下、歩行異常、ヒョコ様鳴声、震え等が投与 0.5 時間後に観察され、2 時間後に 1 例痙攣を伴った死亡例がみられた。4 時間以降では、投与前と比較して、変化なかった。

###### 2) ウサギの一般症状

供試動物：日本在来種雄ウサギ、8～10 週齢、体重；1.8～2.2kg、1群各3匹

方 法：投与前、投与後 0.5、1、2、4、6、24、48 及び 72 時間にケージ内で一般

症状(全身状態, 眼, 吻, 耳介等)の観察を行った。

結 果 : 溶媒及び検体 10mg/kg 投与群ともに、一般症状は投与前と比較してほとんど変化なかった。30 及び 100mg/kg 群では、投与 6 時間以内で動物に触れた時の体幹の緊張、眼の対光反射の低下がみられたが、24 時間後には回復した。300mg/kg 群では震えも認められたが、72 時間後には回復した。1000mg/kg 群では痙攣等の症状も加わり、24 時間以内に全例死亡した。

## 2. 中枢神経系に対する影響

### 1) マウスの自発運動量に対する影響

供試動物 : ICR 系雄マウス, 8 週齢, 体重 ; 27.4~31.9g, 1 群各 5 匹

方 法 : 14 時頃に Supermex の測定箱に収容し、16 時に投与し、翌日 7 時までの運動量を水平及び垂直の成分に分け、1 時間ごとに積算した。

結 果 : 検体 100mg/kg 群では、5 匹中 2 匹が死亡し、自発運動量に有意な抑制がみられた。10 及び 30 mg/kg 群では、投与 1~3 時間に自発運動量が有意に抑制される場合があったが、10mg/kg 群の変化はわずかで投与による影響は 30 mg/kg 群以上で認められるものと考えられた。なお、30mg/kg 群では、投与 1~3 時間以降は溶媒対照群と比較してほとんど変化は認められなかった。

### 2) ウサギの体温に対する影響

供試動物 : 日本白色種雄ウサギ, 8~10 週齢, 体重 ; 1.9~2.3kg, 1 群各 3 匹

方 法 : 投与前に体温が安定していることが確認されたウサギを用い、経口投与前及び投与後 6 時間まで 1 時間ごとに、そして投与後 24 時間までパイロジェンテスト用温度計を用いて直腸温を測定した。

結 果 : 検体 30 及び 100mg/kg 群では、溶媒対照群と比較して差は認められなかった。300mg/kg 群では、投与後にわずかな下降が一時的にみられた。

### 3. 自律神経系に対する影響

#### 1) ウサギの瞳孔に対する影響

供試動物：日本白色種雄ウサギ，8～10週齢，体重；1.9～2.3kg，1群各3匹

方 法：この検査は、ウサギの一般症状観察の試験と並行して実施された。経口投与前及び投与後0.5、1、2、4、6及び24時間に、瞳孔径を三田式万能瞳孔計で測定した。

結 果：検体10、30、100及び300mg/kg群では、明らかな変化は認められなかった。1000mg/kg群では、投与後0.5時間に有意な散大が認められた。

### 4. 呼吸・循環器系に対する影響

#### 1) 無麻酔ウサギの呼吸・血圧・心拍数・心電図に対する影響

供試動物：日本在来種雄ウサギ，8～11週齢，体重；2.0～2.4kg，1群各3匹

方 法：動物をペントバルビタール・ナトリウム(50mg/kg)の静注で麻酔し、右大腿動脈にヘパリン加生理食塩液(100U/mL)で満たしたポリエチレン・カテーテルを挿入し、一端を体外に露出し固定した。翌日、動物を保定箱に保定し、鼻部に呼吸センサを取り付け呼吸数を、右大腿動脈に挿入したカニユーレに装着した観血式血圧トランスデューサーを介して血圧を、血圧脈波で心拍数計の駆動により心拍数を、また、四肢に電極を取り付け、心電図を測定し記録した。なお、投与前、投与後0.5、1、2、4、6時間に各パラメーターを測定した。

結 果：検体30mg/kg群では、呼吸数及び血圧に明らかな変動はみられなかった。100及び300mg/kg群では、呼吸数の減少傾向が認められた。また血圧でも、同じ用量群で有意な低下が認められた。心拍数、心電図では、いずれの用量群にも著しい影響は認められなかった。

### 5. 体性神経系に及ぼす影響

#### 1) マウスの運動機能に及ぼす影響

供試動物：ICR系雄マウス，8週齢，体重；29.0～31.9g，1群各5匹

投与用量：0，10，30，100mg/kg

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。

#### a. 回転棒法

方 法：予め運動機能の検査(毎分 5.26 回転する直径 3cm の回転棒上に 1 分間以上滞留できることを確認)を行い、更に検査当日に動物の運動機能を再確認した。検査は、回転棒上に 1 分間以上滞留できるかを指標として投与前と投与後 0.5、1、2、4、6 及び 24 時間に行った。

結 果：回転棒法により測定したマウスの運動協調性では、最高用量の 100mg/kg まで影響が認められなかった。

#### b. 懸垂法

方 法：a 項の回転棒法と並行して実施された。動物の前肢を直径 1.5mm の針金にかけて懸垂させ、5 秒以内に針金に後肢をかけて体勢を保持できるものを正常と判定した。

結 果：懸垂法により測定したマウスの筋力及び運動協調性では、最高用量の 100mg/kg まで影響が認められなかった。

### 6. 消化管に及ぼす影響

#### 1) マウスの炭末輸送能に及ぼす影響

供試動物：ICR 系雄マウス，8 週齢，体重；27.4～33.9g，1 群各 5 匹

方 法：溶媒または検体経口投与 0.5 時間後に 5%アラビアゴム液で調製した 5%炭末懸濁液(0.2ml/動物)を経口投与した。その 0.5 時間後に動物を頸椎脱臼で屠殺し、全小腸を摘出して、炭末輸送状態を観察した。炭末輸送能の評価は、幽門から回盲弁までの長さを 100 とし、これに対する幽門から運ばれた炭末の先端までの長さを百分率で表わし比較した。

結 果：マウスの消化管炭末輸送能に対して、検体 10mg/kg 群と溶媒対照群との間に差は認められなかった。30 及び 100mg/kg 群では、有意な抑制が認められた。



## 7. 腎機能に及ぼす影響

### 1) ラットの腎機能に及ぼす影響

供試動物：SD系雄ラット，8週齢，体重；264.3～315.2g，1群各5匹

方 法：代謝ケージに個別飼育し、投与前3日間はこのケージ内で予備観察した。溶媒または検体投与後、直ちに生理食塩水 20mL/kg を経口負荷した。給餌給水を断って6時間尿を採取した後、給餌給水し6～24時間尿を採取した。そして、尿量、電解質 ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) 濃度を、電解質分析装置を用い測定した。また、pHをpHメーターで測定した。

結 果：検体 30mg/kg では投与に起因する影響は認められなかった。300mg/kg 群でカリウム排泄量の増加が、投与後 0～6 時間の蓄尿において、また 100 及び 300mg/kg 群でカリウム排泄量の有意な減少が、6～24 時間の蓄尿においてそれぞれ認められた。尿 pH には、すべての群に投与による影響は認められなかった。なお、300mg/kg 群の 5 例中 3 例が投与 24 時間以内に死亡した。

## 8. 血液に及ぼす影響

### 1) ラットでの血液凝固能に及ぼす影響

供試動物：SD系雄ラット，8週齢，体重；261.0～291.1g，1群各5匹

方 法：投与用量は 0, 30, 100, 300mg/kg とした。

溶媒または検体経口投与 1 時間後にペントバルビタール・ナトリウム麻酔下 (50mg/kg、腹腔内) で腹部大静脈より抗凝固剤として 3.8% クエン酸を用いて採血した。冷却遠心分離 (2100×g, 15 分間) により上清を分離してプロトロンビン時間及び活性部分トロンボプラスチン時間を測定した。

結 果：ラットの血液凝固系に対して、最高用量の 300mg/kg まで影響は認められなかった。

### 2) ラットでの血液の溶血性に及ぼす影響

供試動物：SD系雄ラット，8週齢，体重；265.0～298.6g，1群各5匹

方 法：投与用量は 0, 30, 100, 300mg/kg とした。

溶媒または検体経口投与 1 時間後にエーテル麻酔下で腹部大動脈より抗凝

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。

固剤としてヘパリンを用いて採血した。

10%リン酸加食塩液を調製してこれを注射用蒸留水で1%溶液を作製した。これを0.05%ずつ段階的に希釈して0.85~0.10%の溶液を調製した。各溶液を試験管に5mLずつ分注し、採血した血液の0.05mLを加えて転倒混和して室温に0.5時間放置した。続いて再混和してから遠心後(700×g, 5分間)、得られた上清の540nmにおける吸光度を測定して溶血の有無を確認した。この時、0.1%溶液での溶血を100%、0.85%溶液での溶血を0%とした。

結 果：540nmにおける吸光度において、検体投与群と溶媒投与群との間に差は認められなかった。

以上の試験結果より、本剤の経口投与による生理機能への影響は、一般症状、自律神経系、呼吸（血圧下降に伴う呼吸抑制）及び消化器系に比較的低用量（マウス、ウサギ：30mg/kg、ラット：100mg/kg）から明らかに認められた。

「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

試験項目 (試験動物)		投与 経路	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
一般 症状	マウスの一般 症状 Irwin法	経口	0, 10, 30, 100	♂ 5	30	100	100mg/kg 群で 1/5 例死亡。
	ウサギの一般 症状 Irwin法	経口	0, 10, 30, 100, 300, 1000	♂ 3	10	30	1000mg/kg 群 で 3/3 例死 亡。
中 枢 神 系	マウスの自発 運動量	経口	0, 10, 30, 100	♂ 5	10	30	100mg/kg 群で 2/5 例死亡。
	ウサギの体温	経口	0, 30, 100 300	♂ 3	100	300	一時的にわず かに下降し た。
自律 神経 系	ウサギの 瞳孔	経口	0, 10, 30, 100, 300, 1000	♂ 3	300	1000	一時的な有意 な散大。
呼吸 ・ 循環 器系	ウサギ(無麻酔) の呼吸数・ 血圧・心拍数・ 心電図	経口	0, 30, 100 300	♂ 3	30	100	心拍数・心 電図に影響な し。血圧低下、 呼吸数減少。
体性 神経 系	マウスの 運動機能 a) 回転棒法 b) 懸垂法	経口	0, 10, 30, 100	♂ 5 ♂ 5	100 100	>100 >100	影響なし
消化 管	マウスの 炭末輸送能	経口	0, 10, 30, 100	♂ 5	10	30	100mg/kg 群で 1/5 例死亡
腎 機 能	ラットの尿排泄	経口	0, 30, 100 300	♂ 5	30	100	300mg/kg 群で 3/5 例死亡。 尿量減少、カリウ ム排泄量変化
血 液	ラットの 凝固時間	経口	0, 30, 100 300	♂ 5	300	>300	影響なし
	ラットの溶血 (in vivo)	経口	0, 30, 100 300	♂ 5	300	>300	影響なし