

15. その他

チアクロプリドのラットにおける発達神経毒性試験

(資料No. 原体-30)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：2001年9月24日

検体の純度：99.2%

試験動物：Cr1:CD®(SD) IGR BR VAF/Plus®系ラット、雌雄各100匹（一群25匹）

交配開始時；雄約25週齢、雌約10週齢

（体重 雄 514～764g, 雌 216～260g）

投与期間：2000年9月～2000年10月

投与方法：

交配後、検体を0(対照群)、50、300及び500ppmの濃度で飼料に混入し、妊娠雌親動物に妊娠0日から児動物の哺育22日まで投与した。児動物は離乳後、無添加の飼料を試験終了時の出生後75日まで与えた。雌親動物は哺育22日に屠殺した。

投与用量設定の根拠；

用量の設定は検体を用いた繁殖毒性試験(資料No. 原体-20)に基づいた。この試験では、検体を0(対照群)、50、300及び600ppmの濃度で雌雄ラットに2世代にわたって投与した。その結果、600ppm群では、親動物の体重増加抑制、出生時生存率の低下が認められ、300ppm以上の群では難産、哺育期における児動物の体重増加抑制、肝臓及び甲状腺への影響が認められた。また、50ppm群では検体投与に起因した影響は認められなかった。

これらの結果に基づいて、本発達神経毒性試験の設定用量として0、50、300、500ppmを選択した。

試験項目及び結果：

1. 繁殖成績

受胎率、出産率、妊娠期間、着床数、死産児を有する親動物数及び生存児のいない親動物数を指標とした繁殖成績に検体投与の影響は認められなかった。妊娠雌動物数は0(対照群)、50、300及び500ppm群でそれぞれ24、25、24、25匹であった。

2. 親動物

2-1. 臨床観察

少なくとも1日2回生死を確認し、1日に1回自律神経系機能異常（流涙、流涎、眼瞼閉鎖、眼球突出、立毛、呼吸、排尿、排便）、姿勢、動きおよび行動パターン、外観についての検査を妊娠0日より哺育22日まで行った。

試験期間を通じて検体投与に起因した一般状態の変化及び死亡例は認められなかった。

2-2. 体重及び摂餌量

曝露期間中1日1回、体重及び摂餌量の測定を行った。

体重は、500及び300ppm群において、対照群と比較して妊娠0～6日に体重増加量が有意に減少し、妊娠2～16日に平均体重も低下した。哺育期間中では500ppm群の体重増加量が対照群と比較して有意に減少し、500及び300ppm群の平均体重が有意に減少した。

摂餌量は、500及び300ppm群において、妊娠期間中有意に減少した。哺育期間中では有意な減少は認められなかった。

2-3. 検体摂取量

雌親動物における検体の平均1日摂取量は、表1の通りであった。

表1. 検体摂取量(mg/kg体重/日)

用量	50ppm	300ppm	500ppm
妊娠期間(妊娠0～22日)	4.4	25.6	40.8
哺育期間(哺育1～14日)*	8.2	49.4	82.8

*: 哺育15日以降は児動物が飼料を食べ始めると考えられるので検体摂取量の算出には含まなかった。

2-4. 剖検

検査用に選択された児動物の雌親動物は、哺育22日に屠殺し、胸部、腹部及び骨盤内の臓器について肉眼的剖検を実施し、着床数を記録した。それ以外の雌親動物については哺育12日に屠殺し、剖検した。肉眼的病変部位については、病理組織学的検査を実施した。

検体投与に起因した著変はいずれの投与群にも認められなかった。

3. 児動物

3-1. 児動物のデータ

出生日を DP1 と定義した。各群ごとの総産児数、同腹児数、死産児数、出生児数、生存率、哺育率及び性比を検査した。

その結果、これらの項目に投与に起因した変化は認められなかった。

DP5に同腹児数を10匹（雌雄各5匹）に調整し、DP12にその後の検査用に児動物数が適切な腹数各群20を選択し、以下の通りに同腹児雌雄各5匹を無作為に5つのグループに割り当て、それぞれの検査を実施した。

表2 児動物の観察項目

グループ	総児動物数	観察項目	屠殺日
1	雄80匹 雌80匹	体重 DP12：全児動物を屠殺し、脳重量測定 神経組織学的検査（10匹/性/群）	DP12
2	雄79匹 雌79匹	一般状態、体重及び摂餌量、瞳孔（DP21） 性成熟検査/DP28～：膈開口、DP39～：包皮分離 DP23～25、30～32：受動回避 DP59～63、66～70：水迷路	DP70～75
3	雄79匹 雌80匹	一般状態、体重及び摂餌量、瞳孔（DP21） 性成熟検査/DP28～：膈開口、DP39～：包皮分離 DP14、18、22、58～60：自発運動量 DP23、59～61：聴覚性驚愕反応	DP67～72
4	雄78匹 雌80匹	一般状態、体重及び摂餌量、瞳孔（DP21） DP12、離乳後は毎週1回：自律神経機能異常等検査 性成熟検査/DP28～：膈開口、DP39～：包皮分離 DP68～79：屠殺後脳重量測定、神経組織学的検査（10匹/性/群）	DP68～79
5	雄77匹 雌72匹	グループ1～4の調整用 体重	DP22

3-2. 臨床観察

児動物は少なくとも1日2回死亡の有無を確認し、離乳まで1日1回、離乳後は週に1回一般状態を記録した。グループ4の全児動物については、DP12および離乳後は1週間に1回ケージサイドから自律神経機能異常（流涙、流涎、眼瞼閉鎖、眼球

突出、立毛、呼吸、排尿、排便)、姿勢、動きおよび行動パターン、外観について、観察した。グループ2及び3の児動物については、体重測定時あるいは行動試験のためにケージから出した際に毒性症状の有無を観察した。

500ppm群雄において切歯の配列異常及び紅涙を示す動物数が有意に増加した。しかしながら、これらの所見はこの系統のラットに通常よく見られる所見であり、雌動物にはみられていないことから、投与に起因する変化とは考えなかった。

この他検体投与に起因すると考えられる一般状態の変化、自律神経機能異常および死亡例は認められなかった。

3-3. 体重および摂餌量

児動物の体重をDP1、5、8、12、14および22に、離乳後は週に1回及び屠殺時に測定した。摂餌量はDP30から週に1回測定した。

出生時体重では投与群と対照群との間に差は認められなかったが、哺育期間中、500及び300ppm群雌雄に体重増加抑制がみられ、DP8以降対照群と比較して体重が有意に低下した。離乳後の飼育期間中においても、500及び300ppm群雌雄で体重増加が抑制され、対照群と比較して低体重であった。最終体重では雌には有意差が見られなかったが、雄では両群ともに約8.5%減少した。

体重kgあたりの摂餌量では、500および300ppm群雌雄で低体重に関連して有意に増加した。

3-4. 発育の指標

瞳孔収縮および性成熟を表2に従って観察した。

瞳孔収縮に投与による変化は認められなかった。

性成熟では、500及び300ppm群雄の包皮分離日、500ppm群雌の膈開口日が有意に延長した。これらの遅延は体重増加抑制と関係しているものと考えられた。

表3 性成熟

性別	雄				雌			
	0	50	300	500	0	50	300	500
投与量(ppm)								
最終体重*			↓92	↓91				(96)
達成日(日)	46.7	47.3	48.2	48.2	33.4	33.7	33.8	34.7

↑↓: p<0.05, ↑↓: p<0.01 (Dunnett test / Dunn test)

*表中の数値は、対照群に対する変動率(%)

3-5. 受動回避能 (DP22~25、30~32)

各腹雌雄 1 例の児動物(各群雌雄各 20 匹)を用いて、受動回避装置に動物を入れて、その学習能力と短時間記憶能力、長時間記憶能力及び活動性亢進を測定した。各動物を 1 週間間隔で 2 回試験した。

500 及び 300ppm 群雌において、初回の反応潜時(秒)が有意に延長したが、延長よりも短縮の方が毒性影響の結果であると考えられることから、毒性学的に有意な影響とはみなさなかった。

雄の全投与群及び雌の 50ppm 群では、これらの能力獲得において対照群と用量群との間に差は認められなかった。

表 4 受動回避試験の反応潜時

性別	雄			雌		
	50	300	500	50	300	500
投与量 (ppm)	50	300	500	50	300	500
反応潜時 (秒)					↑ 148	↑ 177

↑ ↓ : p<0.05 , ↑ ↓ : p<0.01 (Dunn test)

表中の数値は、対照群に対する変動率 (%)

3-6. M 型水迷路試験 (DP59~63、66~70)

各腹雌雄 1 例の児動物(各群雌雄各 20 匹)について水迷路を用いて、学習能力及び記憶能力を測定した。各動物を 1 週間間隔で 2 回測定した。

その結果、これらの能力獲得において対照群と用量群との間に差は認められなかった。

3-7. 自発運動量試験 (DP14、18、22、58~60)

各腹雌雄 1 例の児動物(各群雌雄各 20 匹)について自発運動量を自動測定器で測定した。

その結果、平均移動数および移動に費やす時間において対照群と用量群との間に差は認められなかった。

3-8. 聴覚性驚愕反応 (DP23、59~61)

自動聴覚測定装置を用い、各腹雌雄 1 例の児動物(各群雌雄各 20 匹)を用いて聴覚刺激に対する反応および繰返し刺激による馴化を測定した。

その結果、児動物の聴覚性驚愕反応に対照群と各用量群の差は認められなかった。

4. 剖検

4-1. グループ 1 の剖検および脳重量測定 (DP12)

DP12 に全児動物を二酸化炭素窒息により屠殺し、肉眼的病変の有無を検査した。摘出したままの脳重量を測定し、10%中性緩衝ホルマリンに保存した。

表 5 脳重量 (DP12)

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		50	300	500	50	300	500
体重			↓ 91	↓ 86			↓ 87
脳	実重量						
	対体重比			↑ 112			↑ 110

↑ ↓ : p<0.05, ↑ ↓ : p<0.01 (統計 Dunn's or Dunnett's test)

表中の数値は、対照群に対する変動率 (%)

500ppm 群雌雄に最終体重 (DP12) の低下が認められ、それに伴い脳の体重比が増加した。

肉眼的に著変は検査した例には認められなかった。

4-2. グループ 4 の剖検 (DP67~79)

試験終了時に各群雌雄各 10 匹を無作為に選択した。それらの児動物を in situ で灌流固定し、肉眼的病変の有無を検査した。

検査した例には肉眼的に著変は認められなかった。

4-3. グループ 2 及び 3 の剖検

検査がすべて終了後、全児動物を屠殺し、肉眼的病変の有無を検査した。

検査した例には肉眼的に著変は認められなかった。

5. 脳の形態計測及び病理組織学的検査

5-1. グループ 1 の脳の形態計測及び病理組織学的検査 (DP12)

高用量群と対照群の雌雄各 10 匹を対象に大脳及び小脳の長軸の長さを計測した。さらに鏡検的に脳の形態計測および病理組織学的検査、肉眼的病変部位の病理組織学的検査を実施した。形態計測は以下の部位を計測した。

前頭葉の厚さ、頭頂葉の厚さ、脳梁の厚さ、線条体の厚さ、海馬の厚さ、小脳高、小脳の外胚芽層の厚さ

鏡検的形態計測では、500ppm 群雄の線条体と脳梁の厚さが有意に減少した。線条体は背景データ (500ppm 群 : 2070~2340、背景データ : 2052~2488) の範囲内で

あった。脳梁の厚さは背景データの範囲を下回った。これらの差は、雌では認められなかったことから、この群の雄における脳重量が統計学的に有意でないものやや低値（対照群に対して雄：96.5%、雌：98.8%）であったためと考えられ、それは検体投与による親動物の体重増加抑制に伴う児動物の体重低下が関係していると考えられた。

[申請者追記]この変化については、雄の生後12日のみに見られ、生後68-79日の最終屠殺時には認められず、投与による影響というよりむしろ、個別の動物間の変動ないし脳切片作成の際生じる技術上排除できないわずかな変動による可能性が高いと考えられた。

表6 脳の形態計測

性別	雄			雌		
	50	300	500	50	300	500
投与量 (ppm)	50	300	500	50	300	500
線条体	-	-	↓96	-	-	
脳梁	-	-	↓86	-	-	

↑ ↓ : p<0.05 (single-factor analysis of variance)

表中の数値は、対照群に対する変動率(%)、- : 計測せず。

大脳および小脳の長軸の長さでは対照群と500ppm群との間に差は認められなかった。投与に起因する病理組織学的変化は認められなかった。

5-2. グループ4の形態計測及び病理組織学的検査(DP68~79)

灌流固定した全群の脳重量を測定し、高用量群と対照群の雌雄各10匹を対象に、大脳及び小脳の長軸の長さを計測した。さらに鏡検的に脳の形態計測、以下の組織の神経組織学的検査および肉眼的病変部の病理組織学的検査を実施した。

脳、ガッサー神経節および三叉神経、前根及び後根(脊髄神経節含む)、脊髄(頸膨大及び腰膨大、胸神経)及び末梢神経(坐骨神経、脛骨神経、腓腹神経)

形態計測はグループ1(ただし、小脳の外胚芽層の厚さは除く)と同様の部位を計測した。

表7 脳の形態計測

性別	雄			雌		
	50	300	500	50	300	500
投与量 (ppm)	50	300	500	50	300	500
線条体	-	-	↓96	-	-	
海馬	-	-	↓95	-	-	

↑ ↓ : p<0.05 (single-factor analysis of variance)

表中の数値は、対照群に対する変動率(%)、- : 計測せず。

鏡検的形態計測では、500ppm群雄の線条体と海馬の幅が有意に減少したが、これらはいずれも対照群との差はわずか5%以内で背景データの範囲内であった。雌では投与に起因する変化は認められなかった。

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

線条体 (500ppm 群 : 2760~3120、背景データ : 2544~3312)

海馬 (500ppm 群 : 1440~1680、背景データ : 1440~1752)

脳重量では対照群と 500ppm 群との間に差は認められなかった。

大脳および小脳の長軸の長さでは対照群と 500ppm 群との間に差は認められなかった。

投与に起因する病理組織学的変化は認められなかった。

5-3. グループ 2 及び 3 の病理組織学的検査

肉眼的病変部位について病理組織学的検査を実施した。

検査した例に投与に関連する著変は認められなかった。

以上、本検体のラットに対する本試験における影響として、親動物では 500 及び 300ppm 群で妊娠ないし哺育期間中に体重増加量および摂餌量の減少が認められた。児動物では、500ppm 群で体重増加量の減少及び性成熟の遅延が認められ、300ppm 群では体重増加量の減少及び性成熟遅延 (雄) が認められた。

したがって、無毒性量は親動物、児動物とも 50ppm (4.4mg/kg 体重/日 [親動物 : 妊娠期間]) であると判断した。

[申請者追記]

EPA における最新の評価 (2013 年) では、ARfD は本発達神経毒性試験の受動回避能への影響をもとに、また急性神経毒性試験の自発運動量の影響も考慮して設定されている。

ARfD : 0.044mg/kg/日 無毒性量 4.4mg/kg 体重/日 安全性係数 100

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免疫毒性試験 (資料 No. 原体-31)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：2012年4月13日

検体純度：98.7%

供試動物：ウィスター系ラット、1群雌10匹

投与開始時 約7週齢、体重163~199g

投与方法：検体を0(対照群)、100、300および1000 ppmの濃度で飼料に混入し28日間にわたり随時摂食させた。

陽性対照群にはシクロホスファミドを滅菌水に溶解して3.5mg/kg/日で28日間強制経口投与した。投与液量は5mL/kgとした。

用量の選択根拠；用量は、既存の毒性資料 No. 原体-20-1 ラットの一世代繁殖試験、原体-18-7 若齢成獣ラットを用いた飼料混入投与による28日間経口毒性試験および原体-9-4 ラットを用いた3週間混餌投与試験に基づいて選択した。

観察・検査項目及び結果：

一般症状及び死亡率；全動物について毎日2回(週末および休日は1回)、死亡および瀕死状態について確認し、一般状態については少なくとも毎日1回観察した。詳細な身体検査は少なくとも週1回実施した。検体投与に起因した一般症状および死亡はいずれの群でも認められなかった。

体重；全動物の体重を、投与前、投与開始日、投与期間中週1回、および剖検前に測定した。

1000ppm群では、試験9日以降試験終了まで平均体重が対照群を統計学的に有意に7~9%($p \leq 0.05$ 、Dunnett's test)低下した。その結果、試験終了時の累積平均体重増加量は対照群を32%下回った($p \leq 0.01$ 、Dunnett's test)。300および100ppm群では投与による体重への影響は認められなかった。

摂餌量；全動物の摂餌量を毎週測定した。

1000ppm 群において、試験 8 日目の摂餌量が対照群を約 33% ($p \leq 0.01$ 、Dunnett's test) 下回り、その後も試験終了まで約 9% (統計学的有意差なし) 下回った。300 および 100ppm 群では、投与による摂餌量への影響は認められなかった。

検体摂取量；投与期間中における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

用量 (ppm)	100	300	1000
検体摂取量 (mg/kg/日)	5.78	25.7	80.7

免疫毒性；投与 26 日後に、羊赤血球 (SRBC) の PBS 溶液 (5.0×10^8 細胞/mL) を 0.5mL/動物の用量で全動物に静注し、免疫性を付与した。SRBC 投与 4 日後 (検体投与 30 日後) に、全動物の眼窩後静脈叢から採血し、血清を得た。血清中の SRBC 特異的 IgM を ELISA 法により測定した。

各群における SRBC 特異的 IgM 濃度を下表に示す。

SRBC 特異的 IgM 濃度は、個体別の変動が対照群、検体処理群共に大きかったものの対照群の平均濃度は高く、試験動物の SRBC に対する感受性が確認された。

検体処理群では SRBC 特異的 IgM 濃度に意義のある変化は認められなかった。投与群で観察されたわずかな差は統計学的に有意ではなく、個体値の変動からみて偶発的なものと考えられた。一方、シクロホスファミドは顕著に SRBC 特異的 IgM 濃度を低下させた。

表 2 平均 SRBC 特異的 IgM 濃度 (u/mL)

対照群	検体			シクロホスファミド 3.5mg/kg/日
	100 ppm	300 ppm	1000 ppm	
9724 (± 4824)	11753 (± 6078)	8521 (± 3041)	8468 (± 3725)	1155** (± 349)

** : $p < 0.01$ (Mann-Whitney U-test)

剖検および臓器重量；投与 30 日後に、全動物の主要臓器、組織および体腔に

ついて剖検を行った。脾臓および胸腺重量を測定し、対体重比を算出した。

各群の最終体重および臓器重量の対照群に対する割合を次表に示す。

1000ppm 群では最終体重が対照群と比較して統計学的に有意 (-10%, $p < 0.01$) %に減少した。

1000ppm 群では脾臓の実重量および対体重比が対照群と比較して統計学的に有意に増加し、300ppm 群でも脾臓の対体重比が統計学的に有意に増加した。これらの変化は投与に関連したものと考えられた。100ppm 群では投与に関連した臓器重量の変化は認められなかった。

[申請者追記]脾重量の増加については、亜急性経口毒性試験(資料 No. 原体-9)では1600ppmの用量まで、慢性毒性/発がん性併合試験(資料 No. 原体-18)では1000ppmの用量まで、重量増加も病理組織学的変化も認められていない。したがって、1000ppmおよび300ppmで認められた脾重量の増加は毒性学的に意味のある変化とは考えられなかった。

一方、シクロホスファミドは最終体重が約5%減少し(統計学的に有意でない)、脾臓および胸腺の実重量、対体重比ともに統計学的に有意に低下した。

表3 臓器重量

試験群	検体			シクロホスファミド 3.5mg/kg/日
	100 ppm	300 ppm	1000 ppm	
最終体重			□90	
脾臓	実重量		□118	□76
	対体重比		□116	□80
胸腺	実重量			↓79
	対体重比			↓83

検体 □□ : $p < 0.01$ (Dunnett's test)

シクロホスファミド ↓ : $p < 0.05$, □ : $p < 0.01$ (T-test)

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の

脾臓および胸腺で認められた肉眼的変化を次表に示す。

検体投与群において、投与に関連した変化は認められなかった。

一方、シクロホスファミド投与群では、脾臓ないし胸腺の萎縮/小型化が認められた。

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

表 4 脾臓および胸腺における肉眼的変化

試験群	対照群	検体			シクロホスファミド 3.5mg/kg/日	
		100 ppm	300 ppm	1000 ppm		
検査動物数	10	10	10	10	10	
脾臓	萎縮/小型化	0	0	1	0	8**
胸腺	萎縮/小型化	1	0	0	2	3

*: $p < 0.001$ (Fisher's exact test、申請者の計算による)

以上の結果から、1000ppm 群において、体重増加抑制および摂餌量の減少、最終体重の低下が認められた。SRBC による免疫性を付与後、28 日間 1000ppm (80.7 mg/kg/日) まで投与しても免疫学的 IgM 反応への影響は認められなかったことから、検体の免疫毒性はないものと考えられた。

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

2. 代謝物

(1) -1 植物代謝物：KK02254 (アミド体) のラットにおける急性経口毒性試験
(資料 No. 代・混-1)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：1995年12月1日

検体の純度 : 98.8%
試験動物 : ウィスター系ラット, 1群雌雄各5匹
試験開始時 ; 雄 7~8週齢(161~194g)
雌 10~11週齢(174~187g)
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、クレモホア EL を含む(2%)脱イオン水で調製した。

投与方法

投与前約 16~18 時間絶食させたラットに胃ゾンデを用いて強制的に単回経口投与した。

投与容量は、体重 100g あたり 1 mL とした。

一般症状の観察及び体重の測定

観察期間は 14 日間とし、検体投与日は頻繁に、翌日からは毎日 1 回以上注意深く臨床観察を行った。

体重測定は、検体投与直前、投与後 7 日及び 14 日に行った。

剖検

観察終了時の全生存動物をジエチルエーテル麻酔下で放血して屠殺後、剖検した。

【結果】

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雄：500, 2000 雌：2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄：> 2000 雌：> 2000
死亡開始時間及び 終了時間	雄：－ 雌：投与後 2 日
症状発現時間及び 消失時間	雄：投与後 6 時間から発現、2 日に消失 雌：投与後 3 時間から発現、3 日に消失
無毒性量 (mg/kg)	雄：－ 雌：－
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：2000 雌：－

一般症状の観察及び体重の測定

中毒症状として、立毛、痙攣、呼吸困難、活動性の低下、糞排泄の減少などが認められた。

これらの症状は、投与後 3 時間（雌 2000mg/kg 群）から 3 日（雌 2000mg/kg 群）にかけて認められ、殆どの症状は 1 日ないし 2 日間継続した。

死亡は、雌 2000mg/kg 群の 1 例のみで投与後 2 日に認められた。

体重の増加推移に、検体に起因する変動は認められなかった。

剖検

剖検において、生存例の雌雄共に検体に起因する所見は認められなかった。

死亡例では、肺と脾臓の暗赤色化、肝臓と腎臓の褪色などの所見が認められた。

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

- (1) - 2 土壌・植物代謝物：WAK6999 (スルホン酸体) のラットにおける
急性経口毒性試験 (資料 No. 代・混-2)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：1996年2月15日

検体の純度 : 95.7%
試験動物 : ウィスター系ラット, 1群雌雄各5匹
試験開始時; 雄 約7週齢(167~174g)
雌 9~10週齢(165~173g)
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、クレモホア EL を含む(2%)脱イオン水で調製した。

投与方法

投与前約 16~18 時間絶食させたラットに胃ゾンデを用いて強制的に単回経口投与した。

投与容量は、体重 100g あたり 1 mL とした。

一般症状の観察及び体重の測定

観察期間は 14 日間とし、検体投与日は頻繁に、翌日からは毎日 1 回以上注意深く臨床観察を行った。

体重測定は、検体投与直前、投与後 7 日及び 14 日に行った。

剖検

観察終了時の全生存動物をジエチルエーテル麻酔下で放血して屠殺後、剖検した。

【結果】

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雄： 2000 雌： 2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄： > 2000 雌： > 2000
死亡開始時間及び 終了時間	雄： - 雌： -
症状発現時間及び 消失時間	雄： 投与 4 時間から発現、6 時間に消失 雌： 投与後 4 時間から発現、2 日に消失
無毒性量 (mg/kg)	雄： - 雌： -
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄： 2000 雌： 2000

一般症状の観察及び体重の測定

中毒症状として、下痢が雌雄に認められたが、投与 2 日目に糞の排泄が雌にみられなかった。

この症状は、投与後 4 時間から 2 日(雌)にかけて認められた。

死亡は、雌雄共に認められなかった。

体重の増加推移に、検体に起因する変動は認められなかった。

剖検

剖検において、雌雄共に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。

- (1) - 3 動物・植物代謝物：NTN41919 (6-クロロニコチン酸) のラットにおける
急性経口毒性試験 (資料 No. 代・混-3)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：1991年3月11日

検体の純度 : 100%
試験動物 : SD系ラット, 1群雌雄各5匹
試験開始時 ; 雄7週齢(198~209g)
雌7週齢(156~165g)
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、ポリエチレングリコール#400で調製した。

投与方法

投与前約16~18時間絶食させたラットに胃ゾンデを用いて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。

一般症状の観察及び体重の測定

観察期間は14日間とし、検体投与日は頻繁に、翌日からは毎日1回以上注意深く臨床観察を行った。

体重測定は、検体投与直前、投与後7日及び14日に行った。

剖検

観察終了時の全生存動物をエーテル麻酔下で放血して屠殺後、剖検した。

【結果】

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雄： 2500, 5000 雌： 2500, 5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄： > 5000 雌： > 5000
死亡開始時間及び 終了時間	雄： - 雌： 投与後 3 日に開始、3 日に終了
症状発現時間及び 消失時間	雄： 投与後 20 分から発現、13 日に消失 雌： 投与後 15 分から発現、9 日に消失
無毒性量 (mg/kg)	雄： - 雌： -
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄： 5000 雌： 2500

一般症状の観察及び体重の測定

中毒症状として、鎮静、呼吸異常とそれに伴う喘鳴及び失禁が雌雄共に、ヒヨコ様鳴声（投与翌日のみ）が雌 1 例に観察された。

発症時期は、2500mg/kg 群の雄で投与後 20 分と 1 時間、雌で投与後 15 分であり、5000mg/kg 群は雌雄共に投与後 2 時間からであった。症状の消失は、2500mg/kg 群の雄では投与後 2 日と 13 日、雌では投与後 9 日であった。5000mg/kg 群は雌雄共に投与後 3 日に消失した。

死亡は、雌 5000mg/kg 群の 1 例のみで投与後 3 日に認められた。

生存例の体重は、雌雄共に順調に増加したが、症状の消失に時間を要した 2500mg/kg 群の雄 1 例は僅かに増加抑制傾向がみられた。死亡例の体重は、投与時に比べて減少した。

剖検

剖検において、肺の赤褐色斑／域が多く認められたことから、症状所見と併せ、本検体は呼吸器系に対して、何らかの炎症性作用を有すると考えられる。

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) - 1 植物代謝物 : KK0 2254 (アミド体) の細菌を用いた復帰突然変異試験
(資料No. 代・混-4)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年月日 : 1995 年 11 月 7 日

検体の純度 : 98.8%

試験系 : 細菌(サルモネラ菌 <TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA102)

【試験方法】

まず、プレート法を、S9-Mix の非存在下と存在下で 0、16、50、158、500、1581、5000 µg/プレートの濃度で予備試験を兼ねて実施した。この試験で生育阻害がみられなかったことから、次のプレインキュベーション法は、S9-Mix の非存在下と存在下でプレート法と同じ濃度で実施した。溶媒として DMSO を用いた。

Ames 試験(プレート法)

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) の 5 株を用いた。屠殺 5 日前に Aroclor 1254 を単回腹腔内投与し、薬物代謝系酵素を誘導したラット肝臓から調製した S9 の非存在及び存在の条件下で Ames らのプレート法で変異原性を検定した。各濃度とも 3 プレートを用いた。

Ames 試験(プレインキュベーション法)

S9-Mix 又は緩衝液 0.5ml と菌培養液 0.1ml、さらに検体液 0.1ml を試験管に加え、37°C の恒温槽で 20 分間インキュベーションしてから、軟寒天液 2ml を試験管に加えて混合し、プレート上に広げた。各濃度とも 3 プレートを用いた。

各菌株とも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。

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。

一方、2 回の試験とも、陽性対照として用いた NF¹⁾、NaN₃²⁾、CUMENE³⁾、4-NPDA⁴⁾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-AA⁵⁾は S-9 Mix を加えることにより代謝活性化され、試験に用いたすべての株に著明な復帰変異を誘起した。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性を有さないものと判断される。

- 1) : nitrofurantoin
- 2) : Sodium azide
- 3) : cumene hydroperoxide
- 4) : 4-nitro-1,2-phenylene diamine
- 5) : 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、プレート法)

代謝 活性化系 の有無	被験物質 濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異コロニー数/プレート										
		塩基対置換型						フレームシフト型				
		TA 100		TA 13535		TA 102		TA 98		TA 1537		
S-9 MIX (-)	DMSO (溶媒対照)	83	96	9	10	324	336	19	24	9	6	
		78	(86)	10	(10)	361	(340)	17	(20)	11	(9)	
	16	102	82	12	10	329	347	28	24	5	8	
		89	(91)	9	(10)	328	(335)	16	(23)	7	(7)	
	50	88	86	11	12	339	328	13	27	12	11	
		82	(85)	9	(11)	355	(341)	18	(19)	9	(11)	
	158	77	91	14	8	385	392	16	22	11	9	
92		(87)	14	(12)	352	(376)	17	(18)	10	(10)		
500	99	85	14	12	366	273	19	20	7	5		
	69	(84)	7	(11)	346	(328)	19	(19)	12	(8)		
1581	99	97	12	7	333	354	14	12	4	11		
	70	(89)	7	(9)	347	(345)	27	(18)	11	(9)		
5000	74	61	4	13	316	341	16	22	13	4		
	82	(72)	10	(9)	325	(327)	13	(17)	7	(8)		
S-9 MIX (+)	DMSO (溶媒対照)	96	89	13	8	373	435	27	26	12	12	
		123	(103)	14	(12)	327	(378)	24	(26)	13	(12)	
	16	106	94	11	10	386	365	19	24	9	11	
		103	(101)	13	(11)	376	(376)	17	(20)	7	(9)	
	50	112	91	7	12	377	404	25	23	9	14	
		115	(106)	16	(12)	385	(389)	19	(22)	9	(11)	
	158	107	102	8	12	366	416	27	31	8	11	
114		(108)	13	(11)	380	(387)	33	(30)	10	(10)		
500	112	97	16	11	340	361	22	33	13	8		
	90	(100)	11	(13)	334	(345)	26	(27)	15	(12)		
1581	90	94	11	15	283	346	36	38	11	6		
	99	(94)	10	(12)	365	(331)	22	(32)	9	(9)		
5000	95	73	18	15	302	251	26	36	9	6		
	102	(90)	15	(16)	282	(278)	30	(31)	12	(12)		
陽 性 対 照	S-9 Mix を必要 とする もの	名称	NF		NaN_3		CUMENE		4-NPDA		4-NPDA	
		($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.2		10		50		0.5		10	
S-9 Mix を必要 とする もの	コロニー数 /プレート	378	351	748	748	730	716	169	173	195	214	
		362	(364)	660	(719)	739	(728)	146	(163)	182	(197)	
S-9 Mix を必要 とする もの	名称	2-AA		2-AA		2-AA		2-AA		2-AA		
		($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	3		3		10		3		3	
S-9 Mix を必要 とする もの	コロニー数 /プレート	1309	1284	254	230	923	938	1298	1431	312	288	
		1413	(1335)	256	(247)	957	(939)	1429	(1386)	297	(299)	

(数値) : 平均値

表 2. 復帰変異試験成績 (第2回目、プラインキュベーション法)

代謝 活性化系 の有無	被験物質 濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異コロニー数/プレート										
		塩基対置換型						フレームシフト型				
		TA 100		TA 13535		TA 102		TA 98		TA 1537		
S-9 MIX (-)	DMSO (溶媒対照)	97	100	8	10	311	339	28	16	8	7	
		100	(99)	7	(8)	388	(346)	22	(22)	12	(9)	
	16	90	102	10	11	308	310	22	22	5	8	
		97	(96)	10	(10)	329	(316)	24	(23)	5	(6)	
	50	84	81	6	12	297	296	29	15	7	8	
		83	(83)	7	(8)	296	(296)	16	(20)	11	(9)	
	158	80	99	13	8	310	274	18	25	5	11	
		91	(90)	13	(11)	297	(294)	17	(20)	11	(9)	
	500	89	83	5	7	351	310	23	16	9	11	
		90	(87)	8	(7)	312	(324)	25	(21)	7	(9)	
	1581	93	107	12	8	321	320	20	27	4	12	
		91	(97)	9	(10)	333	(325)	17	(21)	11	(9)	
	5000	79	70	9	13	245	256	16	20	4	7	
		78	(76)	12	(11)	243	(248)	28	(21)	6	(6)	
S-9 MIX (+)	DMSO (溶媒対照)	120	101	14	15	378	411	26	39	13	9	
		113	(111)	7	(12)	394	(394)	34	(33)	11	(11)	
	16	124	104	6	8	354	346	33	37	11	14	
		103	(110)	8	(7)	390	(363)	28	(33)	11	(12)	
	50	114	115	9	14	387	385	36	38	9	12	
		119	(116)	12	(12)	434	(402)	20	(31)	15	(12)	
	158	112	111	16	8	365	360	23	34	12	9	
		114	(112)	8	(11)	367	(364)	37	(31)	13	(11)	
	500	138	92	11	9	338	324	28	25	13	8	
		117	(116)	12	(11)	313	(325)	17	(23)	9	(10)	
	1581	107	104	9	7	303	282	23	25	11	8	
		115	(109)	9	(8)	326	(304)	28	(25)	12	(10)	
	5000	102	94	9	14	227	259	17	27	14	8	
		101	(99)	7	(10)	325	(270)	27	(24)	12	(11)	
陽性	S-9 Mix を必要 としな いもの	名称	NF		Na ₂ S		CUMENE		4-NPDA		4-NPDA	
		($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.2		10		50		0.5		10	
対照	S-9 Mix を必要 とする もの	コロニー数 /プレート	340	308	684	664	696	729	151	178	133	121
			286	(311)	654	(667)	677	(701)	201	(177)	120	(125)
対照	S-9 Mix を必要 とする もの	名称	2-AA		2-AA		2-AA		2-AA		2-AA	
		($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	3		3		10		3		3	
対照	S-9 Mix を必要 とする もの	コロニー数 /プレート	1633	1589	178	169	620	582	552	606	228	159
			1543	(1588)	202	183	604	(602)	547	(568)	179	(189)

(数値) : 平均値

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) - 2 土壌・植物代謝物：WAK 6999 (スルホン酸体) の細菌を用いた
復帰突然変異試験

(資料No. 代・混-5)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1995年11月8日

検体の純度 : 95.7%

試験系 : 細菌(サルモネラ菌 <TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA102>)

【試験方法】

まず、プレート法を、S9-Mix の非存在下と存在下で 0、16、50、158、500、1581、5000 µg/プレートの濃度で予備試験を兼ねて実施した。この試験で生育阻害がみられなかったことから、次のプレインキュベーション法は、S9-Mix の非存在下と存在下でプレート法と同じ濃度で実施した。溶媒として DMSO を用いた。

Ames 試験(プレート法)

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) の 5 株を用いた。屠殺 5 日前に Aroclor 1254 を単回腹腔内投与し、薬物代謝系酵素を誘導したラット肝臓から調製した S9 の非存在及び存在の条件下で Ames らのプレート法で変異原性を検定した。各濃度とも 3 プレートを用いた。

Ames 試験(プレインキュベーション法)

S9-Mix 又は緩衝液 0.5ml と菌培養液 0.1ml、さらに検体液 0.1ml を試験管に加え、37°C の恒温槽で 20 分間インキュベーションしてから、軟寒天液 2ml のを試験管に加えて混合し、プレート上に広げた。各濃度とも 3 プレートを用いた。

各菌株とも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。

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。

一方、2 回の試験とも、陽性対照として用いた NF¹⁾、NaN₃²⁾、CUMENE³⁾、4-NPDA⁴⁾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-AA⁵⁾は S-9 Mix を加えることにより代謝活性化され、試験に用いたすべての株に著明な復帰変異を誘起した。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性を有さないものと判断される。

- 1) : nitrofurantoin
- 2) : Sodium azide
- 3) : cumene hydroperoxide
- 4) : 4-nitro-1,2-phenylene diamine
- 5) : 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、プレート法)

代謝 活性化 系の有無	被験物質 濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異コロニー数/プレート										
		塩基対置換型						フレームシフト型				
		TA 100		TA 13535		TA 102		TA 98		TA 1537		
S-9 MIX (-)	DMSO (溶媒対照)	102	117	13	8	276	287	13	20	5	11	
		128	<u>116</u>	7	<u>9</u>	282	<u>282</u>	15	<u>16</u>	7	<u>8</u>	
	16	122	119	11	6	313	335	16	13	7	10	
		127	<u>123</u>	6	<u>8</u>	366	<u>338</u>	20	<u>16</u>	4	<u>7</u>	
	50	118	137	8	9	347	372	11	13	6	12	
		145	<u>133</u>	9	<u>9</u>	309	<u>343</u>	19	<u>14</u>	7	<u>8</u>	
	158	113	124	9	12	334	349	13	16	5	11	
		128	<u>122</u>	14	<u>12</u>	366	<u>350</u>	25	<u>18</u>	5	<u>7</u>	
	500	125	94	12	7	296	312	11	18	6	5	
		102	<u>107</u>	7	<u>9</u>	299	<u>302</u>	18	<u>16</u>	8	<u>6</u>	
	1581	95	119	11	10	315	313	20	13	8	10	
		94	<u>103</u>	11	<u>11</u>	316	<u>315</u>	17	<u>17</u>	5	<u>8</u>	
	5000	93	102	8	6	367	377	13	23	5	11	
		83	<u>93</u>	11	<u>8</u>	255	<u>333</u>	14	<u>17</u>	7	<u>8</u>	
S-9 MIX (+)	DMSO (溶媒対照)	130	103	10	11	387	402	35	28	12	7	
		135	<u>123</u>	12	<u>11</u>	385	<u>391</u>	27	<u>30</u>	10	<u>10</u>	
	16	125	108	14	9	423	422	26	30	7	9	
		112	<u>115</u>	8	<u>10</u>	416	<u>420</u>	28	<u>28</u>	8	<u>8</u>	
	50	124	108	14	15	447	410	23	25	8	5	
		104	<u>112</u>	7	<u>12</u>	433	<u>430</u>	20	<u>23</u>	11	<u>8</u>	
	158	93	137	10	9	418	403	26	38	13	9	
		107	<u>112</u>	12	<u>10</u>	470	<u>430</u>	36	<u>33</u>	6	<u>9</u>	
	500	126	111	10	6	409	416	26	30	6	14	
		126	<u>121</u>	15	<u>10</u>	420	<u>415</u>	21	<u>26</u>	5	<u>8</u>	
	1581	106	119	8	10	390	287	28	27	7	9	
		131	<u>119</u>	11	<u>10</u>	445	<u>374</u>	33	<u>29</u>	5	<u>7</u>	
	5000	130	134	13	6	364	374	23	35	13	8	
		135	<u>133</u>	7	<u>9</u>	380	<u>373</u>	27	<u>28</u>	8	<u>10</u>	
陽 性 対 照	S-9 Mix を必要 としな いもの	名称	NF		Na ₂ S ₂ O ₈		CUMENE		4-NPDA		4-NPDA	
		($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.2		10		50		0.5		10	
陽 性 対 照	S-9 Mix を必要 とする もの	コロニー数 /プレート	336	336	614	632	645	644	145	130	147	150
			349	<u>340</u>	617	<u>621</u>	627	<u>639</u>	193	<u>156</u>	169	<u>155</u>
陽 性 対 照	S-9 Mix を必要 とする もの	名称	2-AA		2-AA		2-AA		2-AA		2-AA	
		($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	3		3		10		3		3	
陽 性 対 照	S-9 Mix を必要 とする もの	コロニー数 /プレート	1504	1561	207	190	900	1004	1272	1311	458	409
			1554	<u>1540</u>	205	<u>201</u>	995	<u>966</u>	1117	<u>1233</u>	375	<u>414</u>

平均値：太字にアンダーラインを付し表示

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、プレインキュベーション法)

代謝 活性化 系の有無	被験物質 濃度 (μg /プレート)	復帰変異コロニー数/プレート										
		塩基対置換型						フレームシフト型				
		TA 100		TA 13535		TA 102		TA 98		TA 1537		
S-9 MIX (-)	DMSO (溶媒対照)	104	118	10	8	325	309	16	19	12	8	
		115	<u>112</u>	8	<u>9</u>	275	<u>303</u>	22	<u>19</u>	8	<u>9</u>	
	16	107	172	7	8	240	259	24	24	9	6	
		118	<u>132</u>	11	<u>9</u>	334	<u>278</u>	29	<u>26</u>	8	<u>8</u>	
	50	104	105	11	9	297	257	20	23	8	5	
		112	<u>107</u>	11	<u>10</u>	324	<u>293</u>	27	<u>23</u>	11	<u>8</u>	
	158	115	126	9	9	286	270	23	23	8	8	
		119	<u>120</u>	14	<u>11</u>	271	<u>276</u>	22	<u>23</u>	13	<u>10</u>	
	500	122	122	4	12	284	275	19	16	8	9	
		137	<u>127</u>	10	<u>9</u>	287	<u>282</u>	25	<u>20</u>	7	<u>8</u>	
	1581	135	141	12	9	322	307	26	19	7	14	
		136	<u>137</u>	15	<u>12</u>	270	<u>300</u>	28	<u>24</u>	11	<u>11</u>	
	5000	124	148	8	7	326	328	23	16	13	6	
		139	<u>137</u>	6	<u>7</u>	290	<u>315</u>	15	<u>18</u>	7	<u>9</u>	
S-9 MIX (+)	DMSO (溶媒対照)	162	161	10	7	363	390	33	29	14	12	
		171	<u>165</u>	12	<u>10</u>	379	<u>377</u>	24	<u>29</u>	12	<u>13</u>	
	16	183	164	12	11	376	407	31	28	8	9	
		155	<u>167</u>	12	<u>12</u>	392	<u>392</u>	28	<u>29</u>	10	<u>9</u>	
	50	146	175	13	16	406	381	33	34	7	13	
		141	<u>154</u>	11	<u>13</u>	420	<u>402</u>	26	<u>31</u>	7	<u>9</u>	
	158	157	142	12	20	405	391	27	22	8	8	
		129	<u>143</u>	14	<u>15</u>	361	<u>386</u>	29	<u>26</u>	14	<u>10</u>	
	500	163	169	13	9	375	410	25	35	9	9	
		188	<u>173</u>	10	<u>11</u>	391	<u>392</u>	24	<u>28</u>	12	<u>10</u>	
	1581	188	193	16	11	410	376	31	46	14	9	
		158	<u>180</u>	17	<u>15</u>	410	<u>399</u>	18	<u>32</u>	12	<u>12</u>	
	5000	147	159	10	8	403	348	27	35	13	15	
		172	<u>159</u>	10	<u>9</u>	347	<u>366</u>	35	<u>32</u>	11	<u>13</u>	
陽 性 対 照	S-9 Mix を必要 としな いもの	名称	NF		NaN_3		CUMENE		4-NPDA		4-NPDA	
		(μg /プレート)	0.2		10		50		0.5		10	
	コロニー数 /プレート	318	315	598	620	455	456	201	181	116	113	
		280	<u>304</u>	555	<u>591</u>	472	<u>461</u>	234	<u>205</u>	124	<u>118</u>	
S-9 Mix を必要 とする もの	名称	2-AA		2-AA		2-AA		2-AA		2-AA		
	(μg /プレート)	3		3		10		3		3		
コロニー数 /プレート	1405	1305	160	156	568	545	1159	937	170	226		
	1260	<u>1323</u>	172	<u>163</u>	567	<u>560</u>	1036	<u>1044</u>	171	<u>189</u>		

平均値：太字にアンダーラインを付し表示

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) - 3 動物・植物代謝物：NTN41919 (6-クロロニコチン酸) の細菌を用いた
復帰突然変異試験

(資料No. 代・混-6)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1991年3月29日

検体の純度：100%

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、1000、5000 μg /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、312.5、625、1250、2500、5000 μg /プレートを設定した。しかし1回目の試験で代謝活性化の5000 μg /プレートで全菌株に、2500 μg /プレートでTA1535及びTA1537の各1プレートに生育阻害がみられたことから、2回目の試験の代謝活性化において、2500 μg /プレートを最高濃度として、0、156.3、312.5、625、1250 μg /プレートの6濃度を設定した。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*Escherichia coli*の1株を用いた。フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンで薬物代謝系を誘導したラット肝臓から調製したS9の非存在及び存在の条件下で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。

各菌株とも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】

1 回目の試験において、代謝活性化の 5000 μ g/プレートで全菌株に、2500 μ g/プレートで TA1535 及び TA1537 の各 1 枚のプレートに生育阻害がみられた (表 1)。しかし、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。

一方、2 回の試験とも、陽性対照として用いた AF-2¹⁾、NaN₃²⁾、9-AA³⁾ 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-AA⁴⁾ は S-9 Mix を加えることにより代謝活性化され、試験に用いたすべての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 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数 / プレート					S-9 Mix	復帰変異コロニー数 / プレート				
			塩基対置換型						フレームシフト型				
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒 対照	0	-	108	6	11	30	5	+	102	13	11	50	7
			107	2	10	30	4		113	4	14	39	12
			139	7	10	27	7		104	11	15	35	6
			118	5	10	29	5		106	9	13	41	8
検体	312.5	-	120	7	6	31	9	+	104	6	11	44	14
			135	8	9	27	3		122	10	14	36	5
			136	2	12	39	8		122	9	18	42	13
			130	6	9	32	7		116	8	14	41	11
	625	-	117	7	10	32	4	+	111	12	15	29	13
			125	8	11	29	6		101	9	14	22	13
			138	5	11	35	7		100	6	13	24	16
			127	7	11	32	6		104	9	14	25	13
	1250	-	126	2	13	23	5	+	117	7	13	39	7
			136	4	15	33	6		91	7	13	33	10
			151	10	13	30	9		110	9	12	34	11
			138	5	14	29	7		106	8	13	35	9
	2500	-	110	4	11	31	4	+	107	11	16	46	15
			100	12	7	16	4		110	10	14	43	13
			117	5	5	32	7		101	K	13	38	K
			109	7	8	26	5		106	11	14	42	14
	5000	-	138	5	11	34	6	+	K	K	K	K	K
			106	4	14	28	8		K	K	K	K	K
			127	9	15	38	12		K	K	K	K	K
			124	6	13	33	9		—	—	—	—	—
陽性 対照	-	319 ^{b)}	128 ^{b)}	316 ^{c)}	351 ^{d)}	3404 ^{e)}	+	743 ^{f)}	182 ^{g)}	593 ^{h)}	283 ⁱ⁾	113 ^{h)}	
		350	109	310	356	3559		826	180	587	307	109	
		349	139	277	388	3953		801	185	528	285	116	
		339	125	301	365	3639		790	182	569	292	113	

a) AF-2 : 0.01 $\mu\text{g}/$ プレート

b) NaN₃ : 0.5 $\mu\text{g}/$ プレート

c) AF-2 : 0.04 $\mu\text{g}/$ プレート

d) AF-2 : 0.1 $\mu\text{g}/$ プレート

e) 9-AA : 80.0 $\mu\text{g}/$ プレート

f) 2-AA : 1.0 $\mu\text{g}/$ プレート

g) 2-AA : 2.0 $\mu\text{g}/$ プレート

h) 2-AA : 20.0 $\mu\text{g}/$ プレート

i) 2-AA : 0.5 $\mu\text{g}/$ プレート

点線下の数値は平均値

K : 生育阻害

表 2. 復帰変異試験成績 (第2回目)

物質	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート					S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型						フレームシフト型				
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒 対照	0	-	107	7	9	35	8	+	156	12	19	42	10
			107	8	15	25	9		124	8	16	30	9
			137	9	13	50	9		117	11	18	28	9
			117	8	12	37	9		132	10	18	33	9
検体	156.3	/	/	/	/	/	/	+	122	10	10	31	9
			/	/	/	/	/		130	9	9	31	8
			/	/	/	/	/		100	5	7	28	6
			/	/	/	/	/		117	8	9	30	8
	312.5	-	116	12	8	28	5	+	130	6	14	27	6
			146	12	9	27	4		103	8	10	33	7
			146	17	5	25	7		127	5	10	38	6
			136	14	7	27	5		120	6	11	33	6
	625	-	110	4	12	30	4	+	100	10	13	25	7
			105	10	9	29	2		128	7	18	37	6
			147	4	10	24	5		116	5	20	34	7
			121	6	10	28	4		115	7	17	32	7
	1250	-	141	3	13	30	8	+	123	12	13	31	5
			110	8	11	35	3		108	9	10	26	7
			140	8	8	33	7		113	8	12	32	12
			130	6	11	33	6		115	10	12	30	8
	2500	-	107	7	9	25	6	+	110	5	11	29	11
			145	4	4	25	5		137	7	10	36	11
			113	11	12	34	3		112	6	10	28	9
			122	7	8	28	5		120	6	10	31	10
	5000	-	111	10	7	35	10	/	/	/	/	/	/
			125	8	8	35	7		/	/	/	/	/
			121	5	8	30	8		/	/	/	/	/
			119	8	8	33	8		/	/	/	/	/
陽性 対照	-	280 ^{b)}	70 ^{b)}	296 ^{b)}	291 ^{d)}	2131 ^{d)}	+	532 ^{f)}	127 ^{g)}	455 ^{h)}	160 ^{b)}	88 ^{g)}	
		288	81	320	301	2189		663	122	492	205	73	
		264	84	334	306	2127		660	122	430	180	92	
		277	78	317	299	2149		618	124	459	182	84	

a) AF-2 : 0.01 $\mu\text{g}/$ プレート

b) NaN₃ : 0.5 $\mu\text{g}/$ プレート

c) AF-2 : 0.04 $\mu\text{g}/$ プレート

d) AF-2 : 0.1 $\mu\text{g}/$ プレート

e) 9-AA : 80.0 $\mu\text{g}/$ プレート

f) 2-AA : 1.0 $\mu\text{g}/$ プレート

g) 2-AA : 2.0 $\mu\text{g}/$ プレート

h) 2-AA : 20.0 $\mu\text{g}/$ プレート

i) 2-AA : 0.5 $\mu\text{g}/$ プレート

点線下の数値は平均値

/ : 試験実施せず

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。

3. 製剤

(1) - 1 40%フロアブルのラットにおける急性経口毒性試験 (資料No. 製剤-1)

試験機関：

[GLP 適合]

報告書作成年月日：2000年12月5日

検体の純度：40%水和剤

[組成]チアクロプリド原体；40.0%

水、界面活性剤等；60.0%

試験動物：CD系ラット（8週齢） 一群10匹（雄雌各5匹）

試験開始時体重；雄218～298g 雌206～240g

試験期間：14日間観察

方法：検体原液を経口投与、もしくは蒸留水に分散して経口投与した。

投与容量は0.43～10ml/kgとした。

投与直前の1晩と投与直後3～4時間絶食した。

試験項目：中毒症状および生死を14日間観察した。

体重の測定は投与0日（投与日）、7日および14日または死亡時に行った。

死亡動物及び試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行なった。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	354、500、707、1000、1414
LD50 (mg/kg) (95%信頼限界)	雄：966 (815 - 1145) 雌：771 (570 - 1044)
死亡開始時間及び終了時間	投与後2時間から開始 投与後1日に終了
症状発現時間及び消失時間	投与後1/2時間から発症 投与後1～3日で消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：— 雌：—
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：707 雌：—

中毒症状としては雄雌に関係なく、歪曲姿勢、昏睡、振せんまたは時折起こる振せん、運動失調、間代性痙攣、四肢の蒼白、筋線維束痙攣、眼瞼下垂、呼吸数の減少、呼吸困難、立ち直り反射の喪失、異常歩行および虚脱症状が観察された。

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。

試験期間を通して生存動物の体重は順調な増加傾向を示した。
解剖所見では肺の出血もしくは異常な赤色化、肝臓の暗色化、腎臓の暗色化、胃粘膜の出血と剥離、筋胃部上皮の剥離および小腸の出血が確認された。

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) - 2 40%フロアブルのマウスにおける急性経口毒性試験 (資料No. 製剤 - 2)

試験機関:

[GLP 適合]

報告書作成年月日: 2000年12月5日

検体の純度: 40%水和剤

[組成] チアクロプリド原体; 40.0%
水、界面活性剤等; 60.0%

試験動物: CD-1系マウス(8週齢) 一群10匹(雄雌各5匹)

試験開始時体重: 雄 25~30g 雌 20~27g

試験期間: 14日間観察

方法: 検体を蒸留水に分散して経口投与した。投与容量は10ml/kgとした。
投与直前の1晩と投与直後3~4時間絶食した。

試験項目: 中毒症状及び生死を14日間観察した。体重の測定は投与0日(投与日)、
7日および14日または死亡時に行った。死亡動物及び試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行なった。

結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	50、71、100、141、200
LD50 (mg/kg) (95%信頼限界)	雄: 183 (120 - 281) 雌: 267 (104 - 686)
死亡開始時間及び終了時間	投与後 1/2 時間から開始 投与後 1 日に終了
症状発現時間及び消失時間	投与後 1/2 時間から発現 投与後 1 日~3 日で消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄: 100 雌: 100
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄: 100 雌: 141

中毒症状としては雄雌に関係なく、運動失調、歪曲姿勢、昏睡、立毛、眼瞼下垂、呼吸数の減少、呼吸困難、時折起こる振せんおよび異常歩行が観察された。

試験期間を通して生存動物の体重に著変は認められなかった。解剖所見では肺の出血、肝臓の暗色化または斑状蒼白化、腎臓の暗色化、胃粘膜剥離および小腸の出血が確認された。

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 40%フロアブルのラットにおける急性経皮毒性試験 (資料No. 製剤-3)

試験機関:

[GLP 適合]

報告書作成: 2000年12月5日

検体の純度: 40%水和剤

[組成]チアクロプリド原体; 40.0%
水、界面活性剤等; 60.0%

試験動物: Sprague-Dawley CD系ラット (8週齢) 一群10匹(雄雌各5匹)
試験開始時体重; 雄 215~240 g 雌 212~236 g

試験期間: 14日間観察

方法: 投与前日に各動物の背部および側腹部を剪毛し、検体原液を目盛り付きの注射器を使ってできるだけ均一に塗布した。更に、外科用ガーゼを塗布部位に当て、包帯で半閉塞状態にして24時間貼付した。投与容量は1.72ml/kgとした。

試験項目: 投与後の中毒症状及び生死を14日間観察した。体重の測定は投与0日(投与日)、7日および14日または死亡時に行った。
死亡動物及び試験終了時の全生存動物について適用部位を含む組織の肉眼的病理検査を行なった。また、適用部位の刺激性変化(紅斑・痂皮、浮腫)の有無も14日間毎日観察し、Draize法に従って採点した。

結果:

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	2000
LD50 (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 > 2000 雌 > 2000
死亡開始時間及び終了時間	死亡は認められなかった。
症状発現時間及び消失時間	症状の発現は認められなかった。
死亡例の認められなかった 最高量 (mg/kg)	雄 > 2000 雌 > 2000

中毒症状としては特記すべき変化は認められなかった。
試験期間を通して体重は順調な増加傾向を示した。
解剖所見では主要な組織器官に特記すべき変化は認められなかった。
試験期間を通して適用部位に刺激性変化(紅斑・痂皮、浮腫)は認められず、Draize法による評点は全て0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。

(1) - 4 40%フロアブルのウサギにおける皮膚刺激性試験 (資料No. 製剤- 4)

試験機関 :

[GLP 適合]

報告書作成 : 2000 年 12 月 5 日

検体の純度 : 40%水和剤

[組成]チアクロプリド原体 ; 40.0%

水、界面活性剤等 ; 60.0%

試験動物 : ニュージーランドホワイト種ウサギ (12~16 週齢) 一群雄 6 匹

試験開始時体重 ; 2.60~3.12kg

試験期間 : 3 日間観察

方法 : 検体 0.5mL をガーゼパッチに含ませ、剪毛した背部の皮膚 (2.5cm×2.5 cm) に置き、粘着性テープで固定した。その上からウサギの胴体を弾力性のコルセットで巻き、半閉塞法で 4 時間貼付した。ガーゼパッチ除去後、皮膚に残った検体は蒸留水を含ませたコットンでふきとった。

観察項目 : パッチ除去後 1、24、48、72 時間後に貼付部分の刺激性変化 (紅斑・痂皮、浮腫) の有無を観察し、Draize 法に従って採点した。

検体の皮膚に対する刺激性の評価は、Draize 法により採点した貼付終了 24 時間と 72 時間の各項目の点数を全て合計し、その値を 12 で割って皮膚一次刺激性指数とした。算出された指数は次の項目に従い刺激性の分類を行った。

皮膚一次刺激性指数	刺激性の段階
0	刺激性無し
>0~2	軽度の刺激性
>2~5	中等度の刺激性
>5~8	強い刺激性

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。

結果：Draize 法による刺激性変化の採点は以下の表のとおりである。

動物 番号	項目	最高 評点	貼付終了後時間			
			1 時間	24 時間	48 時間	72 時間
163	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
164	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
166	紅斑・痂皮	4	1	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
167	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
30	紅斑・痂皮	4	1	0	0	0
	浮腫	4	1	0	0	0
80	紅斑・痂皮	4	1	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
合計	紅斑・痂皮	4	3	0	0	0
	浮腫	4	1	0	0	0
平均	紅斑・痂皮	4	1	0	0	0
	浮腫	4	0.3	0	0	0
皮膚一次刺激指数			0/12=0			

パッチ除去後 1 時間で 3 例の皮膚に非常に軽度の紅斑と 1 例の皮膚に非常に軽度の浮腫が認められたが、24 時間後には消失した。
皮膚一次刺激性指数は 0 であった。

以上の結果から、本検体はウサギの皮膚に対して刺激性が無いと考えられる。

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。

(1) - 5 40%フロアブルのウサギにおける眼刺激性試験 (資料No. 製剤-5)

試験機関:

[GLP 適合]

報告書作成: 2000年12月5日

検体の純度: 40%水和剤

[組成]チアクロプリド原体; 40.0%
水、界面活性剤等; 60.0%

試験動物: ニュージーランドホワイト種ウサギ (12~16週齢) 一群雄6匹

試験開始時体重; 2.90~3.18kg

試験期間: 3日間観察

方法: 6匹のウサギの右眼の下瞼を静かに引き、検体の原液0.1mLを結膜のう内に投与した。検体の漏洩を防ぐため、投与後約1秒間両眼を押えた。左眼は無処理のまま対照とし、投与後の洗眼は両眼とも行なわなかった。なお、投与前日に眼の損傷の有無を調べ、眼に傷害のある動物は試験に使用しなかった。

観察項目:

1. 初期疼痛反応

一群の最初の1匹について、投与後すぐに初期疼痛反応を次の基準に従って評価した。

初期疼痛の評点

段階	動物の反応	記述評価
0	反応なし	初期疼痛なし
1	少しまばたきをして、1、2秒以内でもどに戻る	ほとんど初期疼痛なし
2	まばたきをする。目を開けようとするが反射的に閉じてしまう	軽度の初期疼痛
3	瞼を強く閉じたまま前足で目を擦る	中等度の初期疼痛
4	強く目を閉じ、悲鳴を上げる	重度の初期疼痛
5	強く目を閉じ、悲鳴を上げ、爪で目を掻き、飛び跳ね、逃げようとする	非常に重度の初期疼痛

2. 眼刺激性

投与後 1、24、48、72 時間後に角膜、虹彩及び結膜の刺激性変化を観察し、Draize 法に従って採点した。採点した各項目の合計評点は観察時間毎に合計し、得られた総合評点の最大値(最高群平均値)と刺激反応の持続時間から、修正 Kay と Calandra の分類法に従い、刺激性の程度を評価した。

結果：初期疼痛反応の結果、1 匹に段階 3「中等度の初期疼痛」が認められた。他の 5 匹は投与前、両眼に局所麻酔薬を点眼したため、初期疼痛反応は示さなかった。

Draize 法による刺激性変化の採点は次の表のとおりである。

項目	最高 評点	投与後時間					
		1 時間	24 時間	48 時間	72 時間		
動物 番号 55	角膜	程度	4	0	0	0	0
	混濁	面積	4	0	0	0	0
	合計評点		80	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0
	合計評点		10	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	2	1	0	0
		浮腫	4	1	0	0	0
		分泌物	3	1	0	0	0
	合計評点		20	8	2	0	0
	個別別総合評点		110	8	2	0	0
非洗 眼群 動物 番号 114	角膜	程度	4	0	0	0	0
	混濁	面積	4	0	0	0	0
	合計評点		80	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0
	合計評点		10	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	2	1	0	0
		浮腫	4	1	0	0	0
		分泌物	3	2	0	0	0
	合計評点		20	10	2	0	0
	個別別総合評点		110	10	2	0	0
動物 番号 123	角膜	程度	4	0	0	0	0
	混濁	面積	4	0	0	0	0
	合計評点		80	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0
	合計評点		10	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	2	1	0	0
		浮腫	4	1	0	0	0
		分泌物	3	1	1	0	0
	合計評点		20	8	4	0	0
	個別別総合評点		110	8	4	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。

項 目			最高 評点	投与後時間			
				1 時間	24 時間	48 時間	72 時間
動物 番号 138	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0
	合計評点		80	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0
	合計評点		10	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	2	1	0	0
		浮腫	4	1	0	0	0
		分泌物	3	1	0	0	0
	合計評点		20	8	2	0	0
	個体別総合評点		110	8	2	0	0
動物 番号 145	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0
	合計評点		80	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0
	合計評点		10	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1	0	0	0
		浮腫	4	1	0	0	0
		分泌物	3	2	0	0	0
	合計評点		20	8	0	0	0
	個体別総合評点		110	8	0	0	0
動物 番号 148	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0
	合計評点		80	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0
	合計評点		10	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1	0	0	0
		浮腫	4	1	0	0	0
		分泌物	3	1	0	0	0
	合計評点		20	6	0	0	0
	個体別総合評点		110	6	0	0	0
合 計			660	48	10	0	0
平 均			110	8	1.7	0	0

角膜及び虹彩に刺激性変化は認められなかった。

投与後1時間で5例の処置眼に結膜に対する中等度の刺激性が認められ、1例に結膜に対する軽微の刺激性が認められた。24時間後にも4例の処置眼に軽微の結膜に対する刺激性が認められたが、48時間後には刺激性変化は確認できなかった。

表に示す様に、検体の最高群平均値は8.0であり、修正 Kay と Calandra の分類法で、本検体は段階3「軽微の刺激性物質」と分類された。

以上の結果から本検体はウサギの眼に対し軽微の刺激性を有すると考えられる。

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。

(1) - 6 40%フロアブルのモルモットにおける皮膚感作性試験 (資料No. 製剤-6)

試験機関:

[GLP 適合]

報告書作成: 2000年12月5日

検体の純度: 40%水和剤

[組成]チアクロプリド原体; 40.0%

水、界面活性剤等; 60.0%

試験動物: モルモット; Dunkin-Hartley系モルモット (albino) 8~12週齢

一群雄 20匹 (対照群 10匹) 試験開始時体重; 306~424g

試験期間: 約3週間

方法: Guinea-pig Maximization Test (GPM法)

投与量設定根拠

濃度設定試験において4匹のモルモットの剪毛した肩に一連の濃度 (蒸留水中 25%、10%、5%および1%v/v) の皮内注射 (0.1ml/注射部位) をした結果、処理を行った動物に全身毒性の症状は見られなかった。また、他の2頭のモルモット (処理9日前に Freund の完全アジュバンドの皮内注射を行なった) の剪毛した側腹部に原液および75%、50%、25%v/v濃度で48時間貼付したところ、原液の貼付により中等度の紅斑と浮腫が見られた。更に、2匹のモルモットの側腹部に原液および75%、50%、25%v/vの濃度で24時間貼付したところ、濃度50%v/vで軽度の紅斑が見られた。よって感作濃度は皮内感作が25%v/v、貼付感作が原液、惹起濃度は50%v/vと25%v/vとした。

1. 皮内感作

皮内注射直前に各動物の肩甲骨上の約40mm×60mmの範囲を剪毛し、正中線の両側20mm×40mmの範囲に1列 (部位a, 部位b, 部位c) に次の3種類の注射 (各0.1ml) をした。

i) 感作群

a) Freund の完全アジュバンド (FCA) と蒸留水の調製液 (1:1)

b) 蒸留水中 25%v/v の検体配合液

c) FCA と蒸留水の調製液 (1:1) 中 25%v/v の検体配合液

ii) 対照群

a) FCA と蒸留水の調製液 (1:1)

b) 蒸留水

c) FCA と蒸留水の調製液 (1:1)

2. 貼付感作 (皮内注射1週間後)

皮内注射部位を再び剪毛し、次の各液をしみ込ませた濾紙パッチを48時間閉塞貼付した。

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。

- i) 感作群；検体原液
 - ii) 対照群；蒸留水
3. 貼付惹起（皮内注射 3 週間後）
- 惹起処理直前に各動物の側腹部 約 50mm×70mm の範囲を剪毛し、次の各液をしみ込ませた濾紙パッチを 24 時間閉塞貼付した。パッチ除去後、惹起部位を蒸留水に浸したガーゼでふき取った。
- i) 感作群
 - 右側腹部；蒸留水中 50%v/v の検体配合液
 - 左側腹部；蒸留水中 25%v/v の検体配合液
 - ii) 対照群
 - 右側腹部；蒸留水中 50%v/v の検体配合液
 - 左側腹部；蒸留水中 25%v/v の検体配合液

観 察 項 目：貼付除去後 24 時間と 48 時間の皮膚反応を、肉眼的に下記の基準に従って評価した。また、その他の症状も同時に観察した。
各動物の体重は試験開始時と試験終了時に測定した。

皮膚反応の評価点

紅斑及び痂皮形成

紅斑なし	0
かろうじて認識できる紅斑	±
散在性あるいは斑紋状の紅斑	1
中等度びまん性紅斑	2
強い紅斑と隆起	3

最高点 3

浮腫の形成

浮腫なし	0
非常に軽度の浮腫(かろうじて認識できる)	1
軽度浮腫(はっきりした膨隆による明確な縁が確認できる)	2
中等度浮腫(約 1mm の膨隆)	3
高度浮腫(1mm の膨隆と暴露範囲を超えた広がり)	4

最高点 4

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：観察における皮膚反応の判定結果を以下の表に示す。

群	動物数	感作濃度 (%v/v)	惹起濃度 (%v/v)	*皮膚反応	感作反応動物数										感作陽性率 (%)	
					惹起貼付除去後 24 時間					惹起貼付除去後 48 時間					24 時間	48 時間
					皮膚反応評点											
0	1	2	3	4	0	1	2	3	4							
感作群	20	皮内 25% 貼付 100%	50%	①	20	0	0	0	—	20	0	0	0	—	0	0
				②	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0		
			25%	①	20	0	0	0	—	20	0	0	0	—	0	0
				②	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0		
対照群	10	皮内 0% 貼付 0%	50%	①	10	0	0	0	—	10	0	0	0	—	0	0
				②	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
			25%	①	10	0	0	0	—	10	0	0	0	—	0	0
				②	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		

*皮膚反応 ①;紅斑及び痂皮形成 (最高点 3) ②;浮腫形成 (最高点 4)

上記に示す様に、検体 50%, 25%v/v で惹起したとき、皮膚反応は全く認められなかった。

その他の症状に特記すべき異常は観察されなかった。

試験期間を通して全ての動物の体重は順調な増加傾向を示した。

以上の結果から本検体の皮膚感作性は陰性であると考えられる。

なお、既知の皮膚感作性陽性物質 2, 4-ジニトロクロロベンゼン (DNCB) を用いて行った陽性対照試験の結果を次に示す。なお、本試験の感作、惹起に用いられた DNCB の濃度は本試験機関の GPM 法で常時使われているものである。

群	動物数	感作濃度 (%w/w)	惹起濃度 (%w/w)	*皮膚反応	感作反応動物数										感作陽性率 (%)	
					惹起貼付除去後 24 時間					惹起貼付除去後 48 時間					24 時間	48 時間
					皮膚反応評点											
0	1	2	3	4	0	1	2	3	4							
感作群	10	皮内 0.1% 貼付 0.75%	0.25 %	①	0	2	8	0	—	0	8	2	0	—	100	100
				②	7	3	0	0	0	8	2	0	0	0		
			0.1%	①	0	7	3	0	—	6	4	0	0	—	100	40
				②	7	3	0	0	0	10	0	0	0	0		
対照群	10	皮内 0% 貼付 0%	0.25 %	①	2	8	0	0	—	10	0	0	0	—	80	0
				②	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
			0.1%	①	7	3	0	0	—	10	0	0	0	—	30	0
				②	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		

*皮膚反応 ①;紅斑及び痂皮形成 (最高点 3) ②;浮腫形成 (最高点 4)

表に示す様に DNCB には明らかな皮膚感作性が認められ、モルモットの感作性物質に対する感受性が確認された。

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。

(2)-1 30%顆粒水和剤のラットにおける急性経口毒性試験 (資料No. 製剤-7)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：1998年6月18日

検体の純度：30%顆粒水和剤

[組成]チアクロプリド原体；30.0%

鉍物質微粉、界面活性剤等；60.0%

試験動物：SD系ラット、1群雌雄各5匹

試験開始時；雄 7週齢(225~253g)、雌 7週齢(166~184g)

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、蒸留水を加え乳鉢内で磨砕した後、さらに蒸留水で所定濃度の懸濁液を調製した。

投与方法

投与前約16時間絶食させたラットに胃ゾンデを用いて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。

一般症状の観察及び体重の測定

観察期間は14日間とし、検体投与日は頻繁に、翌日からは毎日1回以上注意深く臨床観察を行った。

体重測定は、検体投与直前、投与後1、3、7、10及び14日に行った。

剖検

観察終了時に、全生存動物をエーテル麻酔下で放血して屠殺後、剖検した。

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】

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	390, 550, 760, 1070, 1500
LD ₅₀ (mg/kg)	雄：978 雌：981
死亡開始時間及び 終了時間	雄：投与後 2 時間から開始、1 日に終了 雌：投与後 2 時間から開始、1 日に終了
症状発現時間及び 消失時間	雄：投与後 9 分から発現、2 日に消失 雌：投与後 10 分から発現、4 日に消失
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：390 雌：550

一般症状の観察及び体重の測定

中毒症状は、鎮静、呼吸異常、震え、よろめき歩行、痙攣様苦悶などが用量依存性に認められた。症状の回復は、比較的早く、投与翌日には殆どの動物の症状は消失した。死亡は、投与後 2 時間から翌日まで認められた。

体重の推移において、雄の 760mg/kg 以上、雌 550mg/kg 以上の群で投与翌日に一過性の体重減少がみられたが、その後順調な体重増加を示した。

剖検

剖検において、雌雄共に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。

(2) - 2 30%顆粒水和剤のマウスにおける急性経口毒性試験 (資料No. 製剤-8)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：1998年7月6日

検体の純度：30%顆粒水和剤

[組成]チアクロプリド原体；30.0%

鉍物質微粉、界面活性剤等；60.0%

試験動物：ICR系マウス、1群雌雄各5匹

試験開始時；雄5週齢(22.2~28.5g)、雌5週齢(18.4~20.9g)

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、蒸留水を加え乳鉢内で磨砕した後、さらに蒸留水で所定濃度の懸濁液を調製した。

投与方法

投与前約16時間絶食させたマウスに胃ゾンデを用いて強制的に単回経口投与した。投与容量は、体重10gあたり0.1mLとした。

一般症状の観察及び体重の測定

観察期間は14日間とし、検体投与日は頻繁に、翌日からは毎日1回注意深く臨床観察を行った。

体重測定は、検体投与直前、投与後1、3、7、10及び14日に行った。

剖検

観察終了時に、全生存動物をエーテル麻酔下で放血して屠殺後、剖検した。

【結果】

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	0, 390, 550, 760, 1070, 1500
LD ₅₀ (mg/kg)	雄：804 雌：797
死亡開始時間及び 終了時間	雄：投与後9分から開始、5時間に終了 雌：投与後9分から開始、4時間に終了
症状発現時間及び 消失時間	雄：投与後2分から発現、1日に消失 雌：投与後1分から発現、2日に消失
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：390 雌：—

一般症状の観察及び体重の測定

中毒症状は、鎮静、呼吸異常、震え、よろめき歩行、痙攣様苦悶などが用量依存性に認められた。またヒヨコ様鳴声が、雄390と1500mg/kg群、雌1500mg/kg群を除く全ての投与群で認められた。症状の回復は、比較的早く、投与後5～8時間には殆どの動物の症状は消失した。死亡は、投与後9分から5時間まで認められた。

体重の推移において、雌1070及び1500mg/kgの群で投与後10日に一過性の減少がみられたが、観察期間を通じては概ね体重増加の傾向を示した。この減少は、両群共1匹の所見であり、特に検体に起因するものではないと考えられた。

剖検

剖検において、雌雄共に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。

(2) - 3 30%顆粒水和剤のラットにおける急性経皮毒性試験 (資料No. 製剤-9)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年月日: 1998年6月19日

検体の純度: 30%顆粒水和剤

[組成]チアクロプリド原体; 30.0%

鉍物質微粉、界面活性剤等; 60.0%

試験動物: SD系ラット、1群雌雄各5匹

試験開始時; 雄 7週齢 (252~283g)、雌 7週齢 (176~193g)

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、蒸留水を加え乳鉢内で磨砕した後、さらに蒸留水で500mg/mLの濃度の懸濁液を調製した。

投与方法

投与前日に剪毛した背部皮膚(約 $4 \times 5 \text{ cm} = 20 \text{ cm}^2$)に直接貼布し、ガーゼとスポンジで覆い、さらにサージカルテープを用いて固定した。投与容量は、体重100gあたり0.4mLとした。適用時間は24時間とし、その間動物は個別に収容した。適用時間終了後、適用部位の検体を微温湯で洗浄し、除去した。

一般症状の観察及び体重の測定

観察期間は14日間とし、検体投与日は頻繁に、翌日からは毎日1回注意深く臨床観察を行った。

体重測定は、検体投与直前、投与後1、3、7、10及び14日に行った。

剖検

観察終了時に、全生存動物をエーテル麻酔下で放血して屠殺後、剖検した。

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】

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄：>2000 雌：>2000
死亡開始時間及び 終了時間	雄：－ 雌：－
症状発現時間及び 消失時間	雄：－ 雌：－
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：2000 雌：2000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：2000 雌：2000

一般症状の観察及び体重の測定

中毒症状及び死亡は雌雄共に認められなかった。適用部位においても、発赤などの皮膚刺激所見は認められなかった。

体重の推移において、検体に起因する変動は認められなかった。

剖検

剖検において、雌雄共に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。

(2) - 4 30%顆粒水和剤のウサギにおける皮膚刺激性試験 (資料No. 製剤-10)

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：30%顆粒水和剤

[組成]チアクロプリド原体；30.0%

鋳物質微粉、界面活性剤等；60.0%

試験動物：日本白色種雌ウサギ 6匹、試験開始時；2.44~2.82kg

試験期間：3日間観察

【試験方法】

投与1日前に動物の背部を刈毛した。刈毛した背部を4つの部分にわけ、左側の匹側に検体(被験物質)500mgを2.5×2.5cmのリント布にのせ、0.5mLの注射用水で湿らせてから、油紙で被覆した後、弾性包帯で固定した。同部位の尾側は無処理部位とし、リント布を貼付し、油紙で被覆した後、弾性包帯で固定した。一方、右側の匹側に2.5×2.5cmのリント布に希釈液(2000倍)0.5mLを均一に塗布してから貼付し、油紙で被覆した後、弾性包帯で固定した。同部位の尾側は無処理部位とし、リント布を貼付し、油紙で被覆した後、弾性包帯で固定した。暴露時間は4時間とした。暴露後はリント布を取り除き、注射用水で湿らせた脱脂綿で適用部位を清拭した。

【観察項目】

皮膚刺激性の観察は、両検体除去後1、24、48及び72時間に紅斑と浮腫について行い、皮膚の反応の評価法(Draize法)に従って採点し記録した。

また、一般症状の観察を適用後6時間までは経時的に、その後は1日1回、皮膚の観察時に行った。体重測定は、適用日及び観察終了日に行った。

【評価】

刺激性の評価は皮膚一次刺激指数を算出して行った。皮膚一次刺激指数は、検体除去後1、24、48及び72時間における紅斑及び浮腫の評点の合計を4で割り、個体別の値を求め、更に供試したウサギの6匹の値を平均して算出した。その数値により、以下のように刺激性を区分した。

皮膚一次刺激指数	刺激性
0	無刺激物
0より大きく2未満	軽度刺激物
2以上5未満	中等度刺激物
5以上	強度刺激物

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】

[一般観察]

全例共に一般状態に異常は観察されず、また観察終了日の体重にも著変は見られなかった。

[刺激性]

表にみられる様に、検体除去後 1、24、48 及び 72 時間のいずれの観察においても、全例の皮膚に刺激反応はみられず、皮膚一次刺激指数は 0 であった。

また検体の希釈液についても、何ら皮膚に刺激反応はみられなかった。

無処理部位にも皮膚反応はみられなかった。

刺激性 (6 匹の平均)

項目		最高 評点	Draize による評価点 (平均値)			
			1 時間	24 時間	48 時間	72 時間
検 体	紅斑/痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫形成	4	0	0	0	0
	一次刺激指数		0			
希 釈 液	紅斑/痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫形成	4	0	0	0	0
	一次刺激指数		0			
無 処 理	紅斑/痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫形成	4	0	0	0	0
	一次刺激指数		0			

以上のことから、本剤及びその 2000 倍希釈液ともウサギの皮膚に対して「刺激性なし」と評価した。

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

(2) - 5 30%顆粒水和剤のウサギにおける眼刺激性試験 (資料No. 製剤-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：30%顆粒水和剤

[組成]チアクロプリド原体；30.0%

鉍物質微粉、界面活性剤等；60.0%

試験動物：日本白色種雌ウサギ、試験開始時；2.56～2.94kg

検体投与／被験物質 非洗眼群6匹、洗眼群 3匹

／希釈液(2000倍) 非洗眼群6匹

試験期間：4日間観察

【試験方法】

9匹の動物の左側の下眼瞼を緩やかに眼球から引き離し、検体100mgを結膜嚢内に投与した。検体の漏出を防ぐため、約1秒間両眼瞼をおだやかに合わせ保持した。そのうちの3匹の動物を、検体投与2～3分後に微温湯で洗眼して洗眼群とし、残りの6匹の動物は洗眼を行わず、非洗眼群とした。

また6匹の動物に検体(2000倍希釈液)を0.1mLを同様に投与し、非洗眼群とした。

いずれの群も反対側眼を対照とし、非洗眼群では無処置、洗眼群では洗眼のみを実施した。

【観察項目】

検眼は、投与1、24、48、72及び96時間後に、角膜、虹彩及び結膜について、Draize法に従って採点した。また適用後24時間には2%フルオレセインナトリウム水溶液を1滴点眼し、速やかに注射用水で洗眼した後、角膜の損傷により生じる染色斑の有無を観察した。

また、一般症状の観察を適用後6時間までは経時的に、その後は1日1回、検眼時に行った。体重測定は、適用日及び観察終了日に行った。

【評価】

刺激性の評価はKay and Calandraの方法に従い、その程度を区分した。

すなわち、試験に供した全動物の各項目における刺激点数を観察時間毎に合計し、得られた合計点の平均値(MTS)を求め、適用後96時間以内の平均値の最大値(MMTS)から次頁の表に従い、検体の暫定的刺激度を判定した。

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。

MMTS ^{a)}	暫定的刺激度
0.0 ~ 0.5	刺激性なし
0.5 ~ 2.5	實際上刺激性なし
2.5 ~ 15	極く軽度の刺激性あり
15 ~ 25	軽度の刺激性あり
25 ~ 50	中等度の刺激性あり
50 ~ 80	強度の刺激性あり
80 ~ 100	極度の刺激性あり
100 ~ 110	最大の刺激性あり

a)境界点にあるときは、より強い刺激度の方を選ぶ

更に、暫定的評価を最終評価にするために、下記の表に示される条件を満足しなければならない。万一条件を満たさなければ、一段階の上昇または低下により最終評価とした。

暫定的刺激度	最終評価のための条件 a)
刺激性なし	MTS 24=0; MTS 24>0 の時一段階上昇
實際上刺激性なし	MTS 24=0; MTS 24>0 の時一段階上昇
極く軽度の刺激性あり	MTS 48=0; MTS 48>0 の時一段階上昇
軽度の刺激性あり	MTS 96=0; MTS 96>0 の時一段階上昇
中等度の刺激性あり	1) MTS $f \leq 20$; MTS $f > 20$ の時一段階上昇 2) 60%以上の動物において ITS $f \leq 10$; ITS $f > 30$ の動物が 1 匹もいない ; それ 以外の時一段階上昇
強度の刺激性あり	1) MTS $f \leq 40$; MTS $f > 40$ の時一段階上昇 2) 60%以上の動物において ITS $f \leq 30$; ITS $f > 60$ の動物が 1 匹もいない ; それ 以外の時一段階上昇
極度の刺激性あり	1) MTS $f \leq 80$; MTS $f > 80$ の時一段階上昇 2) 60%以上の動物において ITS $f \leq 60$; ITS $f > 100$ の動物が 1 匹もいない ; それ 以外の時一段階上昇
最大の刺激性あり	1) MTS $f \leq 80$ の時一段階低下 2) 60%以上の動物において ITS $f > 60$; それ以外の時一段階低下

a) MTS; MTS の右の数字 24、48、96 は適用後の時間を示し、f は適用後 7 日を示す。

ITS; 動物 1 匹の刺激合計点

【結果】

[一般観察]

全例共一般状態に異常は観察されず、また観察終了日の体重にも著変は認められなかった。

[刺激性]

検体適用後の眼の反応の結果を表1～表2に示した。

製剤非洗眼群では、適用後1時間の観察において、全例に結膜発赤(評点1)、浮腫(評点1)及び眼脂分泌物(評点2)が認められ、MTSは8.0であった。適用後24時間では4/6例に角膜混濁(程度;評点1、面積;評点1)、全例に結膜発赤(評点1または2)、2/6例に眼脂分泌物(評点1)が認められ、MTSは7.0であった。適用後48時間以降、反応は軽減または消失し、MTSが0となったのは適用後96時間であった。MMTSは適用後1時間の8.0であった。

眼のその他の変化としては、全例で適用直後または適用後1時間に閉眼が観察された。

製剤洗眼群では、適用後1時間の観察において、1/3例に結膜の発赤(評点1)、全例に浮腫(評点1)及び眼脂分泌(評点1)が認められ、MTSは4.7であった。適用後24時間では、全例に結膜の発赤(評点1)がみられ、2/3例に角膜混濁(程度;評点1、面積;評点1)がみられ、MTSは5.3であった。その後反応は軽減し、MTSが0になったのは適用後72時間であった。従ってMMTSは適用後24時間の5.3であった。

眼のその他の変化としては、閉眼が1/3例で適用直後に観察された。

希釈液非洗眼群では、観察期間を通じて刺激反応は認められず、MTSは全て0であった。

各群共に、対照眼の評点は全て0であり、観察期間を通じて変化は何ら認められなかった。

観察した刺激性変化の採点結果は、以下(次頁)のとおりである。

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

表 1. 眼一次刺激性試験成績
被験物質投与群

項 目			最高	投 与 後 時 間				
			評点	1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	96 時間
動物 番号 1101	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0	0
	虹 彩		2	0	0	0	0	0
	結 膜	発赤	3	1	1	1	0	0
		浮腫	4	1	0	0	0	0
		分泌物	3	2	0	0	0	0
	合 計(MTS) [#]			110	8	2	2	0
動物 番号 1102	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0	0
	虹 彩		2	0	0	0	0	0
	結 膜	発赤	3	1	1	0	0	0
		浮腫	4	1	0	0	0	0
		分泌物	3	2	0	0	0	0
	合 計(MTS) [#]			110	8	2	0	0
動物 番号 1103	角膜混濁	程度	4	0	1	1	0	0
		面積	4	0	1	1	0	0
	虹 彩		2	0	0	0	0	0
	結 膜	発赤	3	1	1	1	1	0
		浮腫	4	1	0	0	0	0
		分泌物	3	2	0	0	0	0
	合 計(MTS) [#]			110	8	7	7	2
動物 番号 1104	角膜混濁	程度	4	0	1	1	0	0
		面積	4	0	1	1	0	0
	虹 彩		2	0	0	0	0	0
	結 膜	発赤	3	1	2	1	1	0
		浮腫	4	1	0	0	0	0
		分泌物	3	2	0	0	0	0
	合 計(MTS) [#]			110	8	9	7	2
動物 番号 1105	角膜混濁	程度	4	0	1	0	0	0
		面積	4	0	1	0	0	0
	虹 彩		2	0	0	0	0	0
	結 膜	発赤	3	1	2	1	0	0
		浮腫	4	1	0	0	0	0
		分泌物	3	2	1	0	0	0
	合 計(MTS) [#]			110	8	11	2	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。

項目		最高 評点	投与後時間						
			1時間	24時間	48時間	72時間	96時間		
非洗眼群	動物番号 1106	角膜混濁	程度	4	0	1	0	0	0
			面積	4	0	1	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	2	1	0	0
			浮腫	4	1	0	0	0	0
			分泌物	3	2	1	0	0	0
	合計(MTS) [#]		110	8	11	2	0	0	
	合計		660	40	42	20	4	0	
	平均		110	8.0	7.0	3.3	0.7	0	
洗眼群	3匹平均	角膜混濁	程度	4	0	0.67	0	0	0
			面積	4	0	0.67	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	0.3	1	1	0	0
			浮腫	4	1	0	0	0	0
			分泌物	3	1	0	0	0	0
		合計(MTS) [#]		110	4.7	5.3	2.0	0	0

#: Draize法による評価点(最高110点), 個体毎に計算した合計評点の平均値を記載

希釈液投与群

項目		最高 評点	投与後時間						
			1時間	24時間	48時間	72時間	96時間		
非洗眼群	6匹平均	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0	0
			面積	4	0	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	0	0	0	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0	0
			分泌物	3	0	0	0	0	0
		合計(MTS) [#]		110	0	0	0	0	0

表2. MTS: 適用眼

観察期間 (適用後)	MTS		
	製剤非洗眼群	製剤洗眼群	希釈液非洗眼群
1時間	8.0*	4.7	0
24時間	7.0	5.3*	0
48時間	3.3	2.0	0
72時間	0.7	0	0
96時間	0	0	0

※: 平均値の最大値 (MMTS)

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。

従って、本剤の刺激性を Kay らの刺激性の評価分類表で評価すると、MMTS は適用後 1 時間における 8.0 であったことから、暫定的刺激度は「極く軽度の刺激性あり」であった。しかし、MTS が 0 となったのは適用後 96 時間であったことから、最終評価は「軽度の刺激性あり」となった。

一方、洗眼群では、非洗眼群と同様の反応がみられたが、その反応の程度は非洗眼群に比べ軽度で、MMTS は適用後 24 時間の 5.3 であり、消失も早く適用後 72 時間で認められたことから、洗眼効果が示された。

希釈液非洗眼群では、観察期間を通じて刺激反応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。

(2)-12 30%顆粒水和剤のモルモットにおける皮膚感作性試験 (資料No. 製剤-12)

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: 30%顆粒水和剤

[組成]チアクロプリド原体; 30.0%

鉍物質微粉、界面活性剤等 ; 60.0%

試験動物: ハートレー系雌モルモット、1群20匹、

試験開始時体重; 343~428g

試験期間: 約5週間

【試験方法】

Buehler法により行った。

試験濃度設定の理由

予備試験において、4匹のモルモットに検体を注射用水に5, 10, 25及び50w/w%の濃度で希釈し、モルモットに6時間閉塞貼布したとき、各濃度共に皮膚反応は認められなかったことから、感作濃度及び惹起濃度は50%とした。

試験試料の調製

検体を、所定濃度に注射用水で用時希釈した。無感作群には注射用水を感作用試料として用いた。

感作及び惹起処置

左側胴部を刈毛し、感作試料0.2mLを6時間ずつ7日間隔で3回閉塞貼布した。最後の感作の13日後に全動物の右側胴部を毛刈りし、惹起試料0.2mLを6時間貼布後取り除き、注射用水で投与部位を清拭した。

【観察項目】

紅斑や浮腫などの皮膚反応の観察は、惹起貼布除去後24及び48時間に行い、以下の評価表に従って判定した。

皮膚反応の評価法

紅斑及び痂皮形成

紅斑なし	0
非常に軽度の紅斑(かろうじて識別できる)	1
はっきりした紅斑	2
中等度ないし高度紅斑	3
高度紅斑(beet redness)からわずかな痂皮の形成(深部損傷)まで	4

最高点 4

浮腫の形成

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。

浮腫なし	0
非常に軽度の浮腫(かろうじて識別できる)	1
はっきりした浮腫(はっきりとした膨隆による明確な縁が識別できる)	2
中等度浮腫(約1mmの膨隆)	3
高度浮腫(1mmの膨隆と暴露範囲を越えた広がり)	4

最高点 4

また、一般症状の観察は、惹起後の皮膚の観察終了日まで毎日行った。体重測定は、感作開始日(0日)、感作終了日(14日)、惹起日(28日)及び惹起後2日(30日)に全動物について行った。

【評価】

皮膚反応の程度を個体別に点数化し、観察時間ごとに各試験群の平均評点を算出すると共に陽性率を求め、感作群と無感作群の反応の程度を比較して感作性を評価した。

【結果】

[一般観察]

全例共一般状態に異常は観察されず、また観察終了日の体重にも著変は認められなかった。

[感作性]

各観察時間における皮膚反応の判定結果を以下の表に示す。

群	感作濃度 (%)	惹起濃度 (%)	動物数	感作反応動物数										平均評点		陽性動物数		感作陽性率 (%)	
				惹起貼布除去後 24時間					惹起貼布除去後 48時間					24時間	48時間	24時間	48時間	24時間	48時間
				皮膚反応評点															
				0	1	2	3	4	0	1	2	3	4						
感作	50	50	20	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
無感作	0	50	20	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表に示した様に、検体 50%で惹起したとき、皮膚反応は全く認められず、陽性率は0%であった。

以上の結果から、本剤の皮膚感作性は陰性であると判断する。

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

なお、既知の皮膚感作性陽性物質 DNCB について、別に実施した Buehler 法による試験結果を次に示す。

試験実施日 (1997 年 6 月 12 日～7 月 12 日)

群	感作濃度 (%)	惹起濃度 (%)	動物数	皮膚反応	感作反応動物数										平均評点		陽性動物数		感作陽性率 (%)	
					惹起貼布除去後 24 時間					惹起貼布除去後 48 時間					24 時間	48 時間	24 時間	48 時間	24 時間	48 時間
					皮膚反応評点															
					0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	時間	時間	時間	時間	時間	時間
感作	0.5	0.25	10	①	0	3	7	0	0	0	2	8	0	0	2.4	1.9	10	10	100	100
				②	3	7	0	0	0	9	1	0	0	0						
無感作	0	0.25	10	①	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				②	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0						

① ; 紅斑及び痂皮形成(最高点 4), ② ; 浮腫の形成(最高点 4)

上記に示す様に、既知の皮膚感作性陽性物質 DNCB[#]には明らかな感作性が認められ、動物の感作性物質に対する感受性が確認された。

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)-1 3%フロアブルのラットにおける急性経口毒性試験 (資料No. 製剤-13)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：2001年9月19日

検体の純度：3%フロアブル

[組成]チアクロプリド原体；3.0%

水、界面活性剤等；97.0%

供試動物：SD系ラット（8週齢） 一群10匹（雄雌各5匹）

投与時体重；雄290~302g 雌171~180g

観察期間：14日間

投与方法：検体に蒸留水を加えて300mg/mLの濃度の懸濁液を調製し、投与前日の夕方から絶食させたラットに、体重100g当り1mLを金属製胃ゾンテを用いて強制的に経口投与した。再給餌は、投与3~4時間後に行った。

観察・検査項目：投与後の中毒症状及び生死を14日間観察した。

体重の測定は投与直前、投与後1、3、7及び14日に行った。

供試動物は14日間の観察終了後、屠殺し、剖検の所見を記録した。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	3000
LD50 (mg/kg) (95%信頼限界)	雄：>3000 雌：>3000
死亡開始時間及び終了時間	死亡は認められなかった
症状発現時間及び消失時間	症状の発現は認められなかった
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：3000 雌：3000
死亡例の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	雄：3000 雌：3000

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。

本検体の投与による中毒症状及び死亡は認められず、観察期間終了時の剖検においても、肉眼的異常は全く認められなかった。

また試験期間を通してラットの平均体重はほぼ順調な増加傾向を示した。

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。

(3) - 2 3%フロアブルのマウスにおける急性経口毒性試験 (資料No. 製剤-14)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：2001年9月19日

検体の純度：3%フロアブル

[組成]チアクロプリド原体；3.0%

水、界面活性剤等；97.0%

供試動物：ICR系マウス(6週齢) 一群10匹(雄雌各5匹)

投与時体重；雄30.2~33.6g 雌22.0~24.1g

観察期間：14日間

投与方法：検体に蒸留水を加え、300mg/mLおよび200mg/mLの懸濁液を調製し、投与前日の夕方から絶食させたマウスに、体重100g当り1mLを金属製胃ゾンテを用いて強制的に経口投与した。再給餌は、投与4時間後に行った。

観察・検査項目：投与後の中毒症状及び生死を14日間観察した。

体重の測定は投与直前、投与後1、3、7及び14日に行った。

供試動物は14日間の観察終了後、屠殺し、剖検の所見を記録した。

結 果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	2000、3000
LD50 (mg/kg) (95%信頼限界)	雄：>3000 雌：>3000
死亡開始時間及び終了時間	死亡は認められなかった
症状発現時間及び消失時間	投与後 10 分以内に発症 投与後 1 日で消失
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：3000 雌：3000

本検体の投与による中毒症状としては雄雌共に全例でふるえ及び呼吸異常が認められ、雄の 2000mg/kg 投与群の 1 例を除き、鎮静も全例で認められた。また、雄雌共全投与群で各 2 例ずつヒヨコ様鳴き声を確認した。試験期間を通してマウスの平均体重は雄雌共に順調な増加を示した。投与後 14 日間の観察期間終了時の剖検において、雄雌共に肉眼的異常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。

(3) - 3 3%フロアブルのラットにおける急性経皮毒性試験 (資料No. 製剤-15)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：2001年11月21日

検体の純度：3%フロアブル

[組成]チアクロプリド原体；3.0%
水、界面活性剤等；97.0%

供試動物：SD系ラット（8週齢） 一群10匹（雄雌各5匹）

投与時体重；雄286～306g 雌200～221g

観察期間：14日間

投与方法：検体に蒸留水を加えて500mg/mLの濃度の懸濁液を調製し、体重100g当たり0.4mLを剪毛した背部中央(4×5cm)に経皮投与した。適用部位はガーゼとスポンジで覆い、外科用絆創膏で固定した。適用時間は24時間とし、適用終了後は、検体の懸濁液を微温湯で洗浄して取り除いた。再給餌は、投与3～4時間後に行った。

観察・検査項目：投与後の中毒症状及び生死を14日間観察した。

体重の測定は投与直前、投与後1、3、7及び14日に行った。

供試動物は14日間の観察終了後、屠殺し、剖検の所見を記録した。

結 果：

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	2000
LD50 (mg/kg) (95%信頼限界)	雄：>2000 雌：>2000
死亡開始時間及び終了時間	死亡は認められなかった
症状発現時間及び消失時間	症状の発現は認められなかった
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：2000 雌：2000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：2000 雌：2000

本検体の経皮投与による中毒症状及び死亡は、雄雌共に認められなかった。
また、投与部位の皮膚にも異常は認められなかった。

平均体重の推移において、投与1日後に雄雌共に体重の減少が認められたが、この体重の減少は経皮投与方法において通常起こる範囲のものであり、
検体の投与に起因したものではない。

観察期間終了後の剖検においても、肉眼的異常は全く認められなかった。

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) - 4 3%フロアブルのウサギにおける皮膚刺激性試験 (資料No. 製剤-16)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：2001年12月24日

検体の純度：3%フロアブル

[組成]チアクロプリド原体；3.0%
水、界面活性剤等；97.0%

試験動物：ニュージーランドホワイト種ウサギ（12～16週齢）一群雄3匹

試験開始時体重；2.0～3.5kg

試験期間：3日間観察

方法：検体0.5mLをガーゼパッチに含ませ、剪毛した背部の皮膚（2.5cm×2.5cm）に置き、粘着性テープで固定した。その上からウサギの胴体を弾力性のコルセットで巻き、半閉塞法で4時間貼付した。ガーゼパッチ除去後、皮膚に残った検体は蒸留水を含ませたコットンで拭き取った。

観察項目：パッチ除去後1、24、48、72時間後に貼付部分の刺激性変化（紅斑・痂皮、浮腫）の有無を観察し、Draize法[#]に従って採点した。

検体の皮膚に対する刺激性の評価は、Draize法により採点した貼付終了24時間と72時間の各項目の点数を全て合計し、その値を6で割って皮膚一次刺激性指数とした。算出された指数は以下の表に従い刺激性の分類を行った。また、その他の症状も同時に観察した。

各動物の体重は試験開始前と試験終了時に測定した。

皮膚一次刺激性指数	刺激性の段階
0	刺激性無し
>0～2	軽度の刺激性
>2～5	中等度の刺激性
>5～8	強い刺激性

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。

結果：Draize 法による刺激性変化の採点(3匹の平均)は以下の表のとおりである。

動物 番号	項目	最高 評点	貼付終了後時間			
			1 時間	24 時間	48 時間	72 時間
132	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
133	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
135	紅斑・痂皮	4	1	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
合計	紅斑・痂皮	4	1	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
平均	紅斑・痂皮	4	0.3	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
皮膚一次刺激指数			0/6=0			

パッチ除去後 1 時間で 1 匹の皮膚に非常に軽度の紅斑が認められたが、24 時間後には消失した。

皮膚一次刺激性指数は 0.0 であった。

体重はすべての動物で順調な増加傾向を示した。

以上の結果から、本検体はウサギの皮膚に対して刺激性が無いと考えられる。

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。

(3)-5 3%フロアブルのウサギにおける眼刺激性試験 (資料No. 製剤-17)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：2001年12月24日

検体の純度：3%フロアブル

[組成]チアクロプリド原体；3.0%

水、界面活性剤等；97.0%

供試動物：ニュージーランドホワイト種ウサギ（12～16週齢）一群雄3匹

試験開始時体重；2.5～3.5kg

観察期間：3日間

投与方法：3匹のウサギの右眼の下瞼を静かに引き、検体0.1mLを結膜のう内に投与した。検体の漏洩を防ぐため、投与後約1秒間両眼を押えた。左眼は無処理のまま対照とした。なお、投与前日に眼の損傷の有無を調べ、眼に傷害のない動物を試験に使用した。

観察項目：

1. 初期疼痛反応

すべての供試動物について、投与後すぐに初期疼痛反応を次の基準に従って評価した。

初期疼痛の評点

段階	動物の反応	記述評価
0	反応なし	初期疼痛なし
1	少しまばたきをして、1、2秒以内でもとに戻る	ほとんど初期疼痛なし
2	まばたきをする。目を開けようとするが反射的に閉じてしまう	軽度の初期疼痛
3	瞼を強く閉じたまま前足で目を擦る	中等度の初期疼痛
4	強く目を閉じ、悲鳴を上げる	重度の初期疼痛
5	強く目を閉じ、悲鳴を上げ、爪で目を掻き、飛び跳ね、逃げようとする	非常に重度の初期疼痛

2. 眼刺激性

投与後 1、24、48、72 時間後に角膜、虹彩及び結膜の刺激性変化を観察し、Draize 法^{*1}に従って採点した。

採点した各項目の合計評点は観察時間毎に合計し、得られた総合評点の最大値(最高群平均値)と刺激反応の持続時間から、修正 Kay と Calandra の分類法^{*2}に従い、刺激性の程度を評価した。また、その他の症状も同時に観察した。

各動物の体重は試験開始時と試験終了時に測定した。

結果：初期疼痛反応の結果は、供試した 3 匹すべて段階 2「軽度の初期疼痛」を示した。

Draize 法による刺激性変化の採点(群平均値)は次の表のとおりである。

項目			最高 評点	投 与 後 時 間				
				1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	
非 洗 眼 群	動物 番号 134	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
			面積	4	0	0	0	0
		虹 彩		2	0	0	0	0
		結 膜	発赤	3	1	0	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0
			分泌物	3	1	0	0	0
	合 計(MTS)			110	4	0	0	0
	動物 番号 25	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
			面積	4	0	0	0	0
		虹 彩		2	0	0	0	0
結 膜		発赤	3	1	0	0	0	
		浮腫	4	0	0	0	0	
		分泌物	3	1	0	0	0	
合 計(MTS)			110	4	0	0	0	
動物 番号 58	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0	
		面積	4	0	0	0	0	
	虹 彩		2	0	0	0	0	
	結 膜	発赤	3	1	0	0	0	
		浮腫	4	0	0	0	0	
		分泌物	3	1	0	0	0	
合 計(MTS)			110	4	0	0	0	
合 計			660	12	0	0	0	
平 均			110	4	0	0	0	

角膜及び虹彩に刺激性変化は認められなかった。

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

投与 1 時間後に 3 匹の処置眼で結膜に対する軽微の刺激性が認められたが、24 時間後には刺激性変化は確認できなかった。

表に示す様に、検体の最高群平均値は 4.0 であり、修正 Kay と Calandra の分類法で、本検体は段階 3「軽微の刺激性物質」と分類された。

その他の症状に特記すべき異常は観察されなかった。

体重はすべての動物で順調な増加傾向を示した。

以上の結果から、本検体はウサギの眼粘膜に対し軽微の刺激性を有すると考えられる。

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。

(3) - 6 3%フロアブルのモルモットにおける皮膚感作性試験 (資料No. 製剤-18)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年月日: 2001年12月24日

検体の純度: 3%フロアブル

[組成]チアクロプリド原体; 3.0%

水、界面活性剤等; 97.0%

供試動物: モルモット; Dunkin-Hartley系モルモット (albino) 8~12週齢

1群雄30匹 (試験群20匹、対照群10匹、試験開始時体重; 300~450g)

観察期間: 30日間

試験操作: Buehler法

投与量設定根拠

局所感作濃度; 濃度設定試験において2匹のモルモットの剪毛した腹部に4濃度 (100%、75%、50%、および25%v/v) の検体の懸濁液を6時間閉塞貼付したところ、処理を行ったすべての皮膚に刺激性反応は見られなかった。従って最高濃度である100%液 (検体原液) を局所感作濃度に設定した。

局所惹起濃度; 濃度設定試験において2匹のモルモットの剪毛した腹部に2濃度 (100%、75%v/v) の検体の懸濁液を6時間閉塞貼付した。また惹起濃度設定試験開始7日目および14日目にも同様の手順で6時間の閉塞貼付を行った。その結果、処理を行ったすべての皮膚に刺激性反応は見られなかった。従って皮膚刺激性の確認されない最高濃度である100%液 (検体原液) とそれよりも1段階低い濃度である75%液を局所惹起濃度に設定した。

1. 局所感作

剪毛したモルモットの左腹側部に、検体原液をしみ込ませたパッチ (大きさ 約20mm×20mm) を6時間閉塞貼付した。6時間後にパッチを除去し、適用部位を蒸留水で拭き取った。試験開始7日目、14日目にも同じ手順で再感作を行った。

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。

2. 局所惹起

試験開始 28 日目 (再感作 14 日後)、剪毛したモルモットの右腹側部に 2 濃度 (100%、75%v/v) の検体の懸濁液をしみ込ませたそれぞれのパッチ (大きさ 約 20mm×20mm) を 6 時間閉塞貼付した。6 時間後にパッチを除去し、適用部位を蒸留水で拭き取った。

観察項目：局所惹起の閉塞貼付終了 24 時間後と 48 時間後の皮膚反応を、視覚的に下記の基準に従って評価した。また、その他の症状も同時に観察した。
各動物の体重は試験開始時と試験終了時に測定した。

皮膚反応の評価点

紅斑の形成	
紅斑なし	0
散在性又は斑状の紅斑	1
中等度びまん性紅斑	2
強い紅斑と隆起	3

最高点 3

浮腫の形成	
浮腫なし	0
非常に軽度の浮腫 (かろうじて認識できる)	1
軽度浮腫 (はっきりした膨隆による明確な縁が確認できる)	2
中等度浮腫 (約 1mm の膨隆)	3
高度浮腫 (1mm の膨隆と暴露範囲を超えた広がり)	4

最高点 4

結果：観察における皮膚反応の判定結果を以下の表に示す。

群	動物数	感作濃度 (% v/v)	惹起濃度 (% v/v)	* 皮膚反応	感作反応動物数										感作陽性率 (%)	
					惹起貼付除去後 24 時間					惹起貼付除去後 48 時間					24 時間	48 時間
					皮膚反応評点											
0	1	2	3	4	0	1	2	3	4							
試験群	20	100%	100%	①	20	0	0	0	—	20	0	0	0	—	0	0
				②	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0		
			75%	①	20	0	0	0	—	20	0	0	0	—	0	0
				②	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0		
対照群	10	0%	100%	①	10	0	0	0	—	10	0	0	0	—	0	0
				②	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
			75%	①	10	0	0	0	—	10	0	0	0	—	0	0
				②	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		

*皮膚反応 ①紅斑及び痂皮形成 (最高点 3) ②浮腫形成 (最高点 4)

上記に示す様に、検体原液および 75%液で惹起したとき、皮膚反応は全

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。

く認められなかった。その他の症状に特記すべき異常は観察されなかった。体重はすべての動物で順調な増加傾向を示した。

以上の結果から、本検体の皮膚感作性は陰性であると考えられる。

本試験機関において既知の皮膚感作性陽性物質 2-メルカプトベンゾチアゾール、 α -ヘキシルシンナムアルデヒドを用いて行った陽性対照試験 (Buehler 法) の結果を次に示す。

試験開始日	陽性対照物質	動物の供試数 および性別		濃度		感作性の 発生率
		試験群	対照群	局所感作	局所惹起	
1998. 05. 21	2-メルカプトベンゾチアゾール	20 メス	10 メス	50%(アセトン希釈) :PEG 400 (70:30)	50%(アセトン希釈) :PEG 400 (70:30)	37% (7/19)
1999. 12. 23	2-メルカプトベンゾチアゾール	20 メス	10 メス	50%(アセトン希釈) :PEG 400 (70:30)	50%(アセトン希釈) :PEG 400 (70:30)	55% (11/20)
1999. 06. 24	2-メルカプトベンゾチアゾール	20 メス	10 メス	50%(アセトン希釈) :PEG 400 (70:30)	50%および 25% (アセトン希釈) :PEG 400 (70:30)	53% (10/19)
2000. 01. 20	2-メルカプトベンゾチアゾール	20 オス	10 オス	50%(アセトン希釈) :PEG 400 (70:30)	50%および 25% (アセトン希釈) :PEG 400 (70:30)	80% (16/20)
2000. 06. 28	α -ヘキシルシンナムアルデヒド	20 オス	10 オス	100%	100%および 75% (ラッカセイ油 BP 希釈)	25% (5/20)
2001. 01. 23	α -ヘキシルシンナムアルデヒド	20 オス	10 オス	100%	100%および 75% (ラッカセイ油 BP 希釈)	15% (3/20)
2001. 09. 26	α -ヘキシルシンナムアルデヒド	20 オス	10 オス	100%	100%および 75% (ラッカセイ油 BP 希釈)	25% (5/20)

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。

表に示す様に 2-メルカプトベンゾチアゾールおよび α -ヘキシルシナナムアルデヒドには明らかな皮膚感作性が認められ、モルモットの感作性物質に対する感受性が確認された。

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。

(4) - 1 1%粒剤のラットにおける急性経口毒性試験 (資料No. 製剤-19)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：2001年5月27日

検体の純度：1.0%粒剤

[組成]チアクロプリド原体；1.0%

鋳物質微粉等；99.0%

試験動物：SD系ラット、1群雌雄各5匹

試験開始時；雄 7週齢(242~253g)、雌 7週齢(168~175g)

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、蒸留水を加え乳鉢内で磨砕した後、さらに蒸留水で250mg/mLの濃度の懸濁液を調製した。

投与方法

投与前約16時間絶食させたラットに胃ゾンデを用いて強制的に単回経口投与した。投与容量は、体重100gあたり2mLとした。

一般症状の観察及び体重の測定

観察期間は14日間とし、検体投与日は頻繁に、翌日からは毎日1回以上注意深く臨床観察を行った。

体重測定は、検体投与直前、投与後1、3、7、10及び14日に行った。

剖検

観察終了時に、全生存動物をエーテル麻酔下で放血して屠殺後、剖検した。

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】

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄：>5000 雌：>5000
死亡開始時間及び 終了時間	雄：－ 雌：－
症状発現時間及び 消失時間	雄：－ 雌：－
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：5000 雌：5000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：5000 雌：5000

一般症状の観察及び体重の測定

中毒症状及び死亡は、雌雄共に認められなかった。

体重の推移において、雌雄共順調な体重増加を示した。

剖検

剖検において、雌雄共に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。

(4) - 2 1%粒剤のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料No. 製剤-20)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：2001年5月27日

検体の純度：1.0%粒剤

[組成]チアクロプリド原体；1.0%

鉍物質微粉等；99.0%

試験動物：ICR系マウス、1群雌雄各5匹

試験開始時；雄5週齢(23.0~24.6g)、雌5週齢(18.8~21.7g)

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、蒸留水を加え乳鉢内で磨砕後、さらに蒸留水で250mg/mLの濃度の懸濁液を調製した。

投与方法

投与前約16時間絶食させたマウスに胃ゾンデを用いて強制的に単回経口投与した。投与容量は、体重10gあたり0.2mLとした。

一般症状の観察及び体重の測定

観察期間は14日間とし、検体投与日は頻繁に、翌日からは毎日1回注意深く臨床観察を行った。

体重測定は、検体投与直前、投与後1、3、7、10及び14日に行った。

剖検

観察終了時に、全生存動物をエーテル麻酔下で放血して屠殺後、剖検した。

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】

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄：>5000 雌：>5000
死亡開始時間及び 終了時間	雄：－ 雌：－
症状発現時間及び 消失時間	雄：投与後2分から発現、8時間に消失 雌：投与後1分から発現、7時間に消失
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：5000 雌：5000

一般症状の観察及び体重の測定

中毒症状は、鎮静、呼吸異常、震え、歩行異常（雌群のみ）が認められた。症状の発現は早く、また消失時間も投与後8時間と比較的早かった。死亡は、雌雄共認められなかった。

体重の推移において、雌雄共順調な体重増加を示した。

剖検

剖検において、雌雄共に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。

(4) - 3 1%粒剤のラットにおける急性経皮毒性試験 (資料No. 製剤-21)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：2001年5月27日

検体の純度：1.0%粒剤

[組成]チアクロプリド原体；1.0%

鉍物質微粉等；99.0%

試験動物：SD系ラット、1群雌雄各5匹

試験開始時；雄 7週齢 (257~272g)、雌 7週齢 (179~196g)

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、蒸留水を加え乳鉢内で摩砕した後、さらに蒸留水で500mg/mLの懸濁液を調製した。

投与方法

投与前日に剪毛した背部皮膚(約 $4 \times 5 \text{ cm} = 20 \text{ cm}^2$)に直接貼布し、ガーゼとスポンジで覆い、さらにサージカルテープを用いて固定した。適用時間は24時間とし、その間動物は個別に収容した。適用時間終了後、適用部位の検体を微温湯で洗浄し、除去した。

一般症状の観察及び体重の測定

観察期間は14日間とし、検体投与日は頻繁に、翌日からは毎日1回注意深く臨床観察を行った。

体重測定は、検体投与直前、投与後1、3、7、10及び14日に行った。

剖検

観察終了時に、全生存動物をエーテル麻酔下で放血して屠殺後、剖検した。

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】

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄：>2000 雌：>2000
死亡開始時間及び 終了時間	雄：－ 雌：－
症状発現時間及び 消失時間	雄：－ 雌：－
毒性徴候の認められなかった 量最高投与量 (mg/kg)	雄：2000 雌：2000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：2000 雌：2000

一般症状の観察及び体重の測定

中毒症状及び死亡は雌雄共に認められなかった。適用部位においても、発赤などの皮膚刺激所見は認められなかった。

体重の推移において、検体に起因する変動は認められなかった。

剖検

剖検において、雌雄共に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。

(4) - 4 1%粒剤のウサギにおける皮膚刺激性毒性試験 (資料No. 製剤-22)

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：1.0%粒剤

[組成]チアクロプリド原体；1.0%

鉍物質微粉等；99.0%

試験動物：日本白色種雌ウサギ 6匹、試験開始時体重；2.46~2.70kg

試験期間：3日間観察

【試験方法】

投与1日前に動物の背部を刈毛した。刈毛した背部を2つの部分にわけ、左側に検体500mgを2.5×2.5cmのリント布にのせ、0.5mLの注射用水で湿らせてから、油紙で被覆した後、弾性包帯で固定した。右側には無処理部位とし、リント布を貼付し、油紙で被覆した後、弾性包帯で固定した。暴露時間は4時間とした。暴露後はリント布を取り除き、注射用水で湿らせた脱脂綿で適用部位を清拭した。

【観察項目】

皮膚刺激性の観察は、両検体除去後1、24、48及び72時間に紅斑と浮腫について行い、皮膚の反応の評価法(Draize法)に従って採点し記録した。

また、一般症状の観察を適用後6時間までは経時的に、その後は1日1回、皮膚の観察時に行った。体重測定は、適用日及び観察終了日に行った。

【評価】

刺激性の評価は皮膚一次刺激指数を算出して行った。皮膚一次刺激指数は、検体除去後1、24、48及び72時間における紅斑及び浮腫の評点の合計を4で割り、個体別の値を求め、更に供試したウサギの6匹の値を平均して算出した。その数値により、以下のように刺激性を区分した。

皮膚一次刺激指数	刺激性
0	無刺激物
0より大きく2未満	軽度刺激物
2以上5未満	中等度刺激物
5以上	強度刺激物

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】

[一般観察]

全例共に一般状態に異常は観察されず、また観察終了日の体重にも著変は見られなかった。

[刺激性]

表にみられる様に、検体除去後 1、24、48 及び 72 時間のいずれの観察においても、全例の皮膚反応に刺激反応はみられず、皮膚一次刺激指数は 0 であった。

無処理部位にも皮膚反応はみられなかった。

刺激性（6 匹の平均）

項目	最高 評点	Draize による評価点（平均値）				
		1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	
検 体	紅斑／痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫形成	4	0	0	0	0
	一次刺激指数		0			
無 処 理	紅斑／痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫形成	4	0	0	0	0
	一次刺激指数		0			

以上のことから、本剤は「刺激性なし」と評価した。

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

(4) - 5 1%粒剤のウサギにおける眼刺激性毒性試験 (資料No. 製剤-23)

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: 1.0%粒剤

[組成]チアクロプリド原体; 1.0%
鉍物質微粉等; 99.0%

試験動物: 日本白色種雌ウサギ
検体投与/被験物質 非洗眼群 6匹, 洗眼群 3匹
試験開始時体重; 2.53~2.97kg

試験期間: 3日間観察

【試験方法】

9匹の動物の左側の下眼瞼を緩やかに眼球から引き離し、検体 100mg を結膜嚢内に投与した。検体の損失を防ぐため、約1秒間両眼瞼を緩やかに合わせ保持した。そのうちの3匹の動物を、検体投与2~3分後に微温湯で洗眼して洗眼群とし、残りの6匹の動物は洗眼を行わず、非洗眼群とした。

いずれの群も反対側眼を対照とし、非洗眼群では無処置、洗眼群では洗眼のみを実施した。

【観察項目】

検眼は、投与1、24、48、72及び96時間後に、角膜、虹彩及び結膜について、Draize法に従って採点した。また適用後24時間には2%フルオレセインナトリウム水溶液を1滴点眼し、速やかに注射用水で洗眼した後、角膜の損傷により生じる染色斑の有無を観察した。

また、一般症状の観察を適用後6時間までは経時的に、その後は1日1回、検眼時に行った。体重測定は、適用日及び観察終了日に行った。

【評価】

刺激性の評価はKay and Calandraの方法に従い、その程度を区分した。

すなわち、試験に供した全動物の各項目における刺激点数を観察時間毎に合計し、得られた合計点の平均値(MTS)を求め、適用後96時間以内の平均値の最大値(MMTS)から次頁の表に従い、検体の暫定的刺激度を決めた。

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。

MMTSa)	暫定的刺激度
0.0 ~ 0.5	刺激性なし
0.5 ~ 2.5	實際上刺激性なし
2.5 ~ 15	極く軽度の刺激性あり
15 ~ 25	軽度の刺激性あり
25 ~ 50	中等度の刺激性あり
50 ~ 80	強度の刺激性あり
80 ~ 100	極度の刺激性あり
100 ~ 110	最大の刺激性あり

a)境界点にあるときは、より強い刺激度の方を選ぶ

更に、暫定的評価を最終評価にするために、下記の表に示される条件を満足しなければならない。万一条件を満たさなければ、一段階の上昇または低下により最終評価とした。

暫定的刺激度	最終評価のための条件 a)
刺激性なし	MTS 24=0; MTS 24>0 の時一段階上昇
實際上刺激性なし	MTS 24=0; MTS 24>0 の時一段階上昇
極く軽度の刺激性あり	MTS 48=0; MTS 48>0 の時一段階上昇
軽度の刺激性あり	MTS 96=0; MTS 96>0 の時一段階上昇
中等度の刺激性あり	1) MTS $f \leq 20$; MTS $f > 20$ の時一段階上昇 2) 60%以上の動物において ITS $f \leq 10$; ITS $f > 30$ の動物が 1 匹もいない ; それ 以外の時一段階上昇
強度の刺激性あり	1) MTS $f \leq 40$; MTS $f > 40$ の時一段階上昇 2) 60%以上の動物において ITS $f \leq 30$; ITS $f > 60$ の動物が 1 匹もいない ; それ 以外の時一段階上昇
極度の刺激性あり	1) MTS $f \leq 80$; MTS $f > 80$ の時一段階上昇 2) 60%以上の動物において ITS $f \leq 60$; ITS $f > 100$ の動物が 1 匹もいない ; それ 以外の時一段階上昇
最大の刺激性あり	1) MTS $f \leq 80$ の時一段階低下 2) 60%以上の動物において ITS $f > 60$; それ以外の時一段階低下

a) MTS; MTS の右の数字 24、48、96 は適用後の時間を示し、f は適用後 7 日を示す。

ITS; 動物 1 匹の刺激合計点

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】

[一般観察]

全例共一般状態に異常は観察されず、また観察終了日の体重にも著変は認められなかった。

[刺激性]

検体適用後の眼の反応の結果を表1～表2に示した。

非洗眼群では、適用後1時間の観察において、全例に結膜発赤(評点1)、浮腫(評点1)及び眼脂分泌物(評点1)が認められ、MTSは6.0であった。適用後24時間では2/6例に結膜発赤(評点1)が認められ、MTSは0.7であった。適用後48時間以降、反応は消失した。MTSが0となったのは適用後48時間であった。MMTSは適用後1時間の6.0であった。

眼のその他の変化としては、全例で適用直後に閉眼が観察された。

洗眼群では、適用後1時間の観察において、全例に非洗眼群と同様の反応が認められ、消失時期も同様であった。

眼のその他の変化は、何ら観察されなかった。

各群共に、対照眼の評点は全て0であり、観察期間を通じて変化は何ら認められなかった。

観察した刺激性変化の採点結果は、以下(次頁)のとおりである。

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

表 1. 眼一次刺激性試験成績
被験物質投与群

項目			最高	投与後時間			
			評点	1時間	24時間	48時間	72時間
動物 番号 1101	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1	0	0	0
		浮腫	4	1	0	0	0
		分泌物	3	1	0	0	0
	合計(MTS) [#]			110	6	0	0
動物 番号 1102	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1	0	0	0
		浮腫	4	1	0	0	0
		分泌物	3	1	0	0	0
	合計(MTS) [#]			110	6	0	0
動物 番号 1103	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1	0	0	0
		浮腫	4	1	0	0	0
		分泌物	3	1	0	0	0
	合計(MTS) [#]			110	6	0	0
動物 番号 1104	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1	0	0	0
		浮腫	4	1	0	0	0
		分泌物	3	1	0	0	0
	合計(MTS) [#]			110	6	0	0
動物 番号 1105	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1	1	0	0
		浮腫	4	1	0	0	0
		分泌物	3	1	0	0	0
	合計(MTS) [#]			110	6	2	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。

項目			最高	投与後時間				
			評点	1時間	24時間	48時間	72時間	
非洗眼群	動物番号 1106	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
			面積	4	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	1	0	0
			浮腫	4	1	0	0	0
			分泌物	3	1	0	0	0
		合計(MTS)#		110	6	2	0	0
		合計		660	36	4	0	0
		平均		110	6.0	0.7	0	0
洗眼群	3匹平均	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
			面積	4	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	0.3	0	0
			浮腫	4	1	0	0	0
			分泌物	3	1	0	0	0
		合計(MTS)#		110	6	0.7	0	0

#: Draize 法による評価点 (最高 110 点), 個体毎に計算した合計評点の平均値を記載

表 2. MTS : 適用眼

観察期間 (適用後)	MTS	
	非洗眼群	洗眼群
1時間	6.0*	6.0*
24時間	0.7	0.7
48時間	0	0
72時間	0	0

※ : 平均値の最大値 (MMTS)

従って、本剤の刺激性を Kay らの刺激性の評価分類表で評価すると、MMTS は適用後 1 時間における 6.0 であったことから、暫定的刺激度は「極く軽度の刺激性あり」であった。また、MTS が 0 となったのは適用後 48 時間であったことから、最終評価も「極く軽度の刺激性あり」となった。

一方、洗眼群では、非洗眼群と同様の反応がみられたが、非洗眼群にみられた閉眼はみられず、洗眼効果が認められた。

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

(4) - 5 1%粒剤のモルモットにおける皮膚感作性毒性試験 (資料No. 製剤-24)

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: 1.0%粒剤

[組成]チアクロプリド原体; 1.0%

鉍物質微粉等; 99.0%

試験動物: ハートレー系雌モルモット、1群20匹、
試験開始時体重; 330~420g

試験期間: 約5週間

【試験方法】

Buehler法により行った。

試験濃度設定の理由

予備試験において、4匹のモルモットに検体を注射用水に5, 10, 25及び50w/w%の濃度で希釈し、モルモットに6時間閉塞貼布したとき、各濃度共に皮膚反応は認められなかったことから、感作濃度及び惹起濃度は50%とした。

試験試料の調製

検体を、所定濃度に注射用水で用時希釈した。無感作群には注射用水を感作用試料として用いた。

感作及び惹起処置

左側胴部を刈毛し、感作試料0.2mLを6時間ずつ7日間隔で3回閉塞貼布した。最後の感作の13日後に全動物の右側胴部を毛刈りし、惹起試料0.2mLを6時間貼布後取り除き、注射用水で投与部位を清拭した。

【観察項目】

紅斑や浮腫などの皮膚反応の観察は、惹起貼布除去後24及び48時間に行い、以下の評価表に従って判定した。

皮膚反応の評価法

紅斑及び痂皮形成

紅斑なし	0
非常に軽度の紅斑(かろうじて識別できる)	1
はっきりした紅斑	2
中等度ないし高度紅斑	3
高度紅斑(beet redness)からわずかな痂皮の形成(深部損傷)まで	4

最高点 4

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。

浮腫の形成

浮腫なし	0
非常に軽度の浮腫(かろうじて識別できる)	1
はっきりした浮腫(はっきりとした膨隆による明確な縁が識別できる)	2
中等度浮腫(約 1mm の膨隆)	3
高度浮腫(1mm の膨隆と暴露範囲を越えた広がり)	4

最高点 4

また、一般症状の観察は、惹起後の皮膚の観察終了日まで毎日行った。体重測定は、感作開始日(0日)、感作終了日(14日)、惹起日(28日)及び惹起後2日(30日)に全動物について行った。

【評価】

皮膚反応の程度を個体別に点数化し、観察時間ごとに各試験群の平均評点を算出すると共に陽性率を求め、感作群と無感作群の反応の程度を比較して感作性を評価した。

【結果】

[一般観察]

全例共一般状態に異常は観察されず、また観察終了日の体重にも著変は認められなかった。

[感作性]

各観察時間における皮膚反応の判定結果を以下の表に示す。

群	感作濃度 (%)	惹起濃度 (%)	動物数	感作反応動物数										平均評点		陽性動物数		感作陽性率 (%)	
				惹起貼布除去後 24 時間					惹起貼布除去後 48 時間					24 時間	48 時間	24 時間	48 時間	24 時間	48 時間
				皮膚反応評点															
				0	1	2	3	4	0	1	2	3	4						
感作	50	50	20	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
無感作	0	50	20	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表に示した様に、検体 50%で惹起したとき、皮膚反応は全く認められず、陽性率は 0%であった。

以上の結果から、本剤の皮膚感作性は陰性であると判断する。