

9) 変異原性試験

9-1) ピラクロストロビンの細菌を用いた復帰変異試験

(資料 27)

試験機関：BASF 毒性研究所(ドイツ)

[GLP 対応]

報告書作成年：1997 年

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 [Salmonella typhimurium (TA1535, TA100, TA1537, TA98 株)] 及びトリプトファン要求性の大腸菌 [Escherichia coli (WP2 uvrA 株)] を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 Mix) の存在下及び非存在下で、標準プレート法及びプレインキュベーション法により Ames の方法で変異原性を検定した。溶媒として DMSO を用い、試験濃度は「毒性に関する試験成績を作成するに当たっての指針」等に基づき最高 5000 μ g/plate とした。

結 果：

標準プレート法

[数値は 3 プレートの平均, () 内は S D]

薬 物	濃 度 (μ g/ plate)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/plate				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2 uvrA	TA1535	TA100	TA1537	TA98
対照 (DMSO)		-	32 (2)	19 (2)	113 (7)	11 (4)	22 (1)
検 体	20	-	31 (3)	14 (1)	125 (7)	8 (1)	29 (3)
	100	-	31 (3)	21 (8)	133 (9)	8 (1)	25 (4)
	500	-	34 (2)	18 (2)	122 (3)	7 (1)	28 (7)
	2500*1	-	30 (2)	23 (5)	132 (13)	7 (2)	31 (7)
	5000*1	-	33 (1)	20 (4)	108 (4)	9 (1)	25 (3)
対照 (DMSO)		+	44 (4)	21 (3)	128 (3)	13 (1)	39 (4)
検 体	20	+	53 (7)	23 (8)	105 (2)	12 (2)	39 (3)
	100	+	51 (2)	19 (6)	114 (12)	13 (0)	47 (7)
	500	+	52 (4)	18 (5)	124 (3)	10 (2)	44 (4)
	2500*1	+	41 (3)	14 (4)	130 (15)	7 (3)	36 (2)
	5000*1	+	45 (1)	9 (1)	121 (7)	8 (1)	36 (6)
陽性対照*2	2-AA 2.5	+		136 (16)	1263 (72)	114 (15)	1050 (32)
	2-AA 60	+	188 (26)				
	AAC 100	-				516 (67)	
	ENNG 10	-	762 (38)				
	MNNG 5.0	-		1207 (161)	1121 (106)		
	NOPD 10	-					1105 (37)

*1. 約 2500 μ g/plate 以上で不溶性沈殿物を認める。

*2. 2-AA : 2-aminoanthracene

AAC : 9-aminoacridine chloride monohydrate

ENNG : N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

MNNG : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

NOPD : 4-nitro-o-phenyldiamine

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ株式会社にある。

プレインキュベーション法

〔数値は3プレートの平均, ()内はSD〕

薬 物	濃 度 (μ g/ plate)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/plate				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2 uvrA	TA1535	TA100	TA1537	TA98
対照 (DMSO)		-	29 (1)	20 (2)	132 (15)	12 (2)	28 (2)
検 体	20	-	30 (3)	19 (2)	111 (8)	10 (2)	27 (3)
	100	-	30 (2)	19 (1)	119 (3)	10 (1)	27 (3)
	500	-	31 (4)	20 (1)	123 (7)	8 (1)	25 (4)
	2500*1	-	31 (3)	21 (1)	108 (8)	8 (2)	26 (2)
	5000*1	-	30 (3)	20 (2)	107 (5)	9 (2)	25 (5)
対照 (DMSO)		+	38 (3)	20 (3)	128 (2)	11 (2)	39 (2)
検 体	20	+	32 (5)	19 (1)	129 (10)	12 (2)	40 (4)
	100	+	30 (3)	19 (2)	137 (9)	11 (2)	37 (3)
	500	+	25 (2)	17 (2)	142 (10)	11 (3)	31 (1)
	2500*1	+	27 (1)	15 (2)	122 (4)	11 (2)	30 (1)
	5000*1	+	26 (1)	14 (0)	107 (15)	12 (2)	27 (5)
陽性対照*2	2-AA 2.5	+		135 (29)	1377 (36)	139 (13)	677 (59)
	2-AA 60	+	210 (14)				
	AAC 100	-				614 (72)	
	ENNG 10	-	523 (17)				
	MNNG 5.0	-		1068 (39)	751 (40)		
	NOPD 10	-					1200 (70)

*1. 約 2500 μ g/plate 以上で不溶性沈殿物を認める。

*2. 2-AA : 2-aminoanthracene

AAC : 9-aminoacridine chloride monohydrate

ENNG : N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

MNNG : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

NOPD : 4-nitro-o-phenyldiamine

検体は代謝活性化系の存在下及び非存在下の試験において、5000 μ g/plate の濃度においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-AA, MNNG, ENNG, AAC 及び NOPD では、全ての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、検体は復帰変異誘発性は有しないものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ株式会社にある。

9-2) ピラクロストロビンのチャイニーズハムスターV79 細胞を用いた

in vitro 染色体異常誘発性試験 (資料 28)

試験機関: BASF 毒性研究所(ドイツ)

[GLP 対応]

報告書作成年: 1999 年

検体純度:

試験方法:

V79 細胞を用いて、検体の染色体異常誘発性を薬物代謝酵素系(S-9 Mix)の存在下及び非存在下で検索した。検体は水に対する溶解性が低いため、DMSO に溶解した。

検体処理時間及び標本作製時間を変えて 2 回の独立した試験を実施した。

実験 1: 細胞播種約 24~30 時間後に血清の入っていない新しい培地と交換し、S-9 Mix を添加した培地及び添加していない培地に検体を添加し、4 時間処理した。4 時間後に血清を含む新しい培地と交換し、14 時間培養後、細胞を回収して染色体標本作製した。

処理濃度は細胞毒性予備試験の結果に基づいて設定し、S-9 Mix の有無にかかわらず 6.25, 12.5 及び 25.0 $\mu\text{g/mL}$ の 3 濃度について染色体観察を行った。

実験 2: S-9 Mix を添加せずに、血清を含む培地中で検体を 18 時間連続処理した後標本作製する方法、及び新しい培地と交換して更に 10 時間培養後に標本作製する方法、S-9 Mix を添加して実験 1 と同様に血清の入っていない培地中で検体を 4 時間処理後、血清を含む培地と交換し、24 時間培養後に染色体標本作製する方法で試験した。

処理濃度は細胞毒性予備試験及び実験 1 の細胞毒性の結果に基づいて設定し、S-9 Mix 無添加、18 時間被験物質処理、標本作製時間(含被験物質処理時間)18 時間の場合は 0.005, 0.010 及び 0.050 $\mu\text{g/mL}$ の 3 濃度、標本作製時間(含被験物質処理時間)28 時間の場合は 0.100 $\mu\text{g/mL}$ の濃度について染色体観察を行った。また、S-9 Mix 添加、4 時間被験物質処理、標本作製時間(含被験物質処理時間)28 時間の場合は 3.125, 6.25 及び 12.5 $\mu\text{g/mL}$ の 3 濃度について染色体観察を行った。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ株式会社にある。

陽性対照として、S-9 Mix を添加しない場合はエチルメタンスルフォネート (EMS) を $350 \mu\text{g/mL}$ の濃度で、S-9 Mix を添加する場合はシクロフォスファミド (CPP) を $0.5 \mu\text{g/mL}$ の濃度で用いた。また、溶媒対照を設け、同様に試験した。

試験はすべて、各濃度あたり 2 系列で実施した。

染色体標本作製後、検体処理群及び溶媒対照群は各培養あたり 100 個、各濃度あたり 200 個、陽性対照群は各培養あたり 50 個、各濃度あたり 100 個のよく広がった中期分裂像を顕微鏡で観察し、構造的染色体異常の各型について分類し、計数した。また、数的染色体異常として、異数体(染色体本数が増えた場合のみ)及び倍数性細胞の出現数を計数した。統計学的解析には Bonferroni-Holm 補正後 Fisher's 直接確率計算法(片側)を用い、溶媒対照群と各用量群の間で検定を行った。染色体異常誘発性の判定は構造的染色体異常と数的異常のそれぞれについて行った。判定は以下の基準で行った。

構造的染色体異常を有する細胞数が用量相関性を伴って有意に増加し、この増加に再現性があり、染色体異常を有する細胞の出現頻度が同時に実施した溶媒対照群の値及び溶媒対照群の背景値の範囲を超えている場合は陽性と判定する。また、溶媒対照群に比べて染色体異常を有する細胞の出現頻度に有意な増加が認められず、溶媒対照の背景値の範囲内である場合は陰性と判定する。

結 果：

結果を表-1 及び-2 に示した。

検体は S-9 Mix の有無にかかわらず、異なる被験物質処理時間(4 時間処理あるいは 18 時間連続処理)及び標本作製時間(含被験物質処理時間；18 時間あるいは 28 時間)で実施した独立した 2 回の実験において、生物学的に意味のある構造的染色体異常を有する細胞の増加を誘発しなかった。実験 1 の S-9 Mix 添加、 $6.25 \mu\text{g/mL}$ [被験物質処理 4 時間、標本作製時間(含被験物質処理時間)18 時間]の用量及び実験 2 の S-9 Mix 無添加、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ [被験物質処理 18 時間、標本作製時間(含被験物質処理時間)28 時間]の用量においてギャップを含む染色体異常を有する細胞数に統計学的に有意な増加が認められたが、下記の理由から偶発的な結果であり染色体損傷によるものとは考えられなかった。

- 観察された値は背景対照値の範囲内あるいは近似した値であった。
- 用量相関性が認められなかった。
- ギャップは被験物質の染色体損傷性を評価するにふさわしい基準ではない。

数的異常を有する細胞数の増加も認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ株式会社にある。

陽性対照物質である EMS 及び CPP は何れも、明らかな染色体異常出現頻度の上昇を誘発し、試験方法の感受性及び使用した S-9 Mix の活性が確認された。また、溶媒対照群における異常細胞出現頻度は背景値の管理範囲以内であった。従って、本試験の有効性が確認された。

以上の結果より、本検体は薬物代謝酵素系の有無にかかわらず、本実験条件下において構造的染色体異常誘発性及び数的染色体異常誘発性を有さないものと結論された。

表-1. 染色体異常試験結果 (実験 1)

薬 剤	濃 度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	処理 時間	標本作 製時 間	S9 mix の有無	異数 体細胞	倍数 体細胞	判 定	各染色体異常出現頻度 (%)										異常細胞の 出現頻度 (%)			判定
								染色分体型				染 色 体 型			交 換	そ の 他	+Gap	-Gap			
								切 断	断 片	欠 失	切 断	断 片	欠 失								
溶媒対照 (DMSO)		4	18	-	0.0	0.0		0.5	0.5	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	6.0	2.0				
検 体	6.25	4	18	-	0.0	0.0	-	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	8.0	1.5	-	-		
	12.5				0.0	0.0	-	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	10.0	2.0	-	-		
	25.0				0.0	0.0	-	0.5	0.5	0.0	0.5	0.5	0.0	0.5	0.0	10.5	2.0	-	-		
陽性対照 (EMS)	350	4	18	-	0.0	0.0	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	9.0**	ND	16.0*	14.0* *	+	+		
溶媒対照 (DMSO)		4	18	+	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	4.5	1.0				
検 体	6.25	4	18	+	0.0	0.0	-	0.5	0.0	0.0	0.5	0.5	0.5	2.0	0.0	11.0*	4.0	-	-		
	12.5				0.0	2.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	1.0	0.0	7.0	1.5	-	-		
	25.0				0.0	0.0	-	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	4.5	1.0	-	-		
陽性対照 (QPP)	0.5	4	18	+	0.0	0.0	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	14.0**	ND	19.0**	19.0* *	+	+		

検体処理群及び溶媒対照群は各培養当り 100 個，各濃度当り計 200 個，陽性対照群は各培養当り 50 個，各濃度当り計 100 個の細胞を観察

* 標本作製時間は被験物質処理時間を含む

+Gap：ギャップを含める，

-Gap：ギャップを含めない

EMS：エチルメタンスルフォネート

CPP：シクロフォスファミド

溶媒対照群に対し，*： $p \leq 0.05$ ，**： $p \leq 0.01$ ，***： $p \leq 0.001$ 有意 (Bonferroni-Holm 補正後 Fisher's 直接確率計算法)

ND：データなし

表一2. 染色体異常試験結果 (実験2)

薬 剤	濃 度 ($\mu\text{g/ml}$)	処理 時間	標本作 製時 間	S-9 Mix の有無	異数 体細胞	倍数 体細胞	判 定	各染色体異常出現頻度 (%)										異常細胞の 出現頻度 (%)		判定
								染色分体型				染色体型			交換	その他				
								切 断	断片	欠失	切 断	断片	欠失							
								切 断	断片	欠失	切 断	断片	欠失							
溶媒対照 (DMSO)		18	18	-	0.0	0.0		0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	0.0	5.5	2.0			
検 体	0.005				0.0	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	2.5	0.0	0.0	10.5	3.0	-		
	0.010	18	18	-	0.0	1.5	-	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	2.0	0.0	0.0	6.0	2.0	-		
	0.050				0.0	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	4.0	0.5	-			
陽性対照 (EMS)	350	18	18	-	0.0	0.0	-	ND	ND	ND	ND	ND	14.0**	1.0(mA)	18.0* *	17.0**	+			
溶媒対照 (DMSO)		18	28	-	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	4.0	2.5				
検 体	0.100	18	28	-	0.0	0.0	-	1.0	0.0	0.0	0.5	0.5	0.5	0.0	10.0*	2.5	-			
溶媒対照 (DMSO)		4	28	+	0.0	1.0		0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	6.5	1.5				
検 体	3.125				0.0	0.5	-	0.0	0.0	0.0	2.0	0.5	1.0	0.0	6.5	3.5	-			
	6.25	4	28	+	0.0	1.0	-	1.0	0.0	0.0	1.0	0.5	0.5	0.0	4.5	3.0	-			
	12.5				0.0	1.5	-	1.0	0.0	0.0	1.0	0.0	2.0	0.5(mA)	9.5	5.0	-			
陽性対照 (GPP)	0.5	4	28	+	0.0	0.0	-	ND	ND	ND	ND	ND	8.0**	1.0(mA)	19.0**	15.0**	+			

検体処理群及び溶媒対照群は各培養当り100個、各濃度当り計200個、陽性対照群は各培養当り50個、各濃度当り計100個の細胞を観察
* 標本作製時間は被験物質処理時間を含む

+Gap: ギャップを含める,

-Gap: ギャップを含めない

EMS: エチルメタンスルフォネート

GPP: シクロフォスファミド

溶媒対照群に対し、*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$ で有意 (Bonferroni-Holm 補正後 Fisher's 直接確率計算法)

mA: ギャップを含まない構造的染色体異常を5個以上有する細胞

ND: データなし

9-3) ピラクロストロビンのマウス骨髄における小核試験

(資料 29)

試験機関: BASF 毒性研究所 (ドイツ)

[GLP 対応]

報告書作成年: 1998 年

検体純度:

試験動物: NMRI マウス (平均体重約 27.1g), 1 群雌雄各 5 匹

方法: 投与量を下記の用量設定根拠に基づき 75mg/kg, 150mg/kg, 300mg/kg とし, 試験動物の体重 (kg) 当たりに投与する検体量をオリーブ油に溶解し投与した。陰性対照としてオリーブ油のみを投与し, 陽性対照としては cyclophosphamide 20mg/kg 及び vincristine 0.15mg/kg をそれぞれ純水に溶解して投与した。投与は経口投与とし, 投与容量は 10mL/kg とした。

用量設定根拠:

観察項目:

一般状態; 投与後の毒性症状の有無を検査した。

顕微鏡検査; 投与後所定の時間に屠殺し, 両側の大腿骨から骨髄標本を作製した。

原則として, 全ての試験群の各雌雄動物について 1 動物当たり 2000 個の多染性赤血球について小核の有無を検査し, また正染性赤血球 (正常赤血球) も計数した。以下の項目を記録した。

- ・多染性赤血球の数
- ・小核を有する多染性赤血球の数
- ・正染性赤血球の数
- ・小核を有する正染性赤血球の数
- ・多染性赤血球の正染性赤血球に対する比率
- ・「小さい小核」($d < D/4$) 及び「大きい小核」($d \geq D/4$) の数

[d: 小核の直径, D: 細胞の直径]

結果:

一般状態; 陰性対照群ではいかなる毒性症状も観察されなかった。

検体投与群では全ての用量群に投与 30 分後に「立毛及び蹲り姿勢」が観察されたが, 投与 1 日後には回復し症状は観察されなかった。最高用量 300mg/kg を投与した 48 時間後屠殺群の雄 1 例が投与 2 日後に死亡した。

陽性対照物質を投与したそれぞれの試験群では, 毒性症状は観察されなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ株式会社にある。

顕微鏡検査；以下の表に示すとおり，小核を有する正染性赤血球の数は陰性対照群あるいは検体の各用量群のいずれの屠殺時期においても有意な差は認められなかった。また，検体投与による小核の割合の増加もなく，「小さい小核」あるいは「大きい小核」を有する正染性及び多染性赤血球の数はいずれの屠殺時期においても陰性対照群の値と差がなかった。

一方，陽性対照群においては，染色体異常誘発性に対する陽性物質 cyclo-phosphamide 投与群及び紡錘体毒作用に対する陽性物質 vincristine 投与群いずれにおいても小核を有する多染性赤血球の予期された明らかな増加が認められた。

表 1. 多染性赤血球及び正染性赤血球に関する結果

		処理後 24 時間				処理後 48 時間			
		A	B	C	D	A	B	C	D
陰性対照		20000	7934	1.3	0.9	20000	9948	0.8	0.4
検体	75	20000	7478	0.9	0.7				
	150	20000	7977	1.0	0.6				
	300	20000	9033	0.9	1.3	18000 ¹	9459	1.1	0.3
陽性対照	CPP	10000	3629	14.2**	0.3				
	VCR	10000	4180	63.2**	0.7				

** ; $p \leq 0.01$; Wilcoxon 検定 (片側)，陰性対照に対して検定

注： 1. 雄 1 例が投与 2 日後に死亡

A : 検査した多染性赤血球数

B : 正染性赤血球数

陰性対照：オリーブ油

C : 多染性赤血球 1000 個当りの小核を有するもの (平均)

陽性対照：CPP (Cyclophosphamide) ; 20mg/kg

D : 正染性赤血球 1000 個当りの小核を有するもの (平均)

陽性対照：VCR (Vincristine) ; 0.15mg/kg

表 2. 多染性赤血球に関する結果；「小さい小核」と「大きい小核」の差

		処理後 24 時間			処理後 48 時間		
		A	B	C	A	B	C
陰性対照		20000	1.3	0.1	20000	0.8	0.0
検体	75	20000	0.9	0.0			
	150	20000	0.9	0.1			
	300	20000	0.8	0.1	18000 ¹	1.1	0.0
陽性対照	CPP	10000	13.3**	0.9			
	VCR	10000	45.4**	17.8**			

** ; $p \leq 0.01$; Wilcoxon 検定 (片側)，陰性対照に対して検定

注： 1. 雄 1 例が投与 2 日後に死亡

A : 検査した多染性赤血球数

陰性対照：オリーブ油

B : 多染性赤血球 1000 個当りの「小さい小核 ($d < D/4$)」

陽性対照：CPP (Cyclophosphamide) ; 20mg/kg

C : 多染性赤血球 1000 個当りの「大きい小核 ($d \geq D/4$)」

陽性対照：VCR (Vincristine) ; 0.15mg/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 BASF アグロ株式会社にある。

以上の結果、検体の 3 投与量群 (75, 150, 300mg/kg) 及び各屠殺時期 (24, 48 時間) いずれにおいても陰性対照群との間に小核を有する赤血球の出現頻度に生物学的意義のある差は認められなかった。

従って、検体は染色体異常誘発性はなく、また有糸分裂過程における染色体の分配異常も引き起こさないことが本試験において確認された。

9-4) ピラクロストロビンのラット初代培養肝細胞を用いた *in vitro* 不定期 DNA 合成試験
(資料 30)

試験機関：BASF 毒性研究所(ドイツ)
[GLP 対応]

報告書作成年：1998 年

検体純度：

試験方法：ラット初代培養肝細胞を用いて、不定期 DNA 修復合成(不定期 DNA 合成；UDS)誘発能を同一の方法で 2 回の独立した試験を行い検索した。

検体は DMSO に溶解して用い、検体濃度は下記のように設定した。

1 回目の試験の濃度；用量設定試験

最高用量を $1.0 \mu\text{g/mL}$ として「0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, $1.0 \mu\text{g/mL}$ 」とした。

2 回目の試験の濃度；1 回目の試験の結果に基づき、最高用量を $0.5 \mu\text{g/mL}$ とし「0, 0.004, 0.02, 0.1, $0.5 \mu\text{g/mL}$ 」とした。

試験群当り 2 ないし 3 スライドを顕微鏡で観察し、UDS の定量を行った。各スライド当り 25~50 個の正常な形態を示す細胞を観察し、試験群につき合計 100 個の細胞を観察した。それぞれの細胞について「核グレイン数」及び「細胞質グレイン数」の計数を行い、「各細胞当りの正味の核グレイン数」、「平均核グレイン数」、「平均細胞質グレイン数」、「平均正味の核グレイン数」及び「修復を行っている細胞(正味の核グレイン数が ≥ 5 個の細胞)の百分率」を計算した。また、LDH 及び乳酸濃度を測定し、細胞毒性を検討した。

試験結果：陰性対照(無処理群及び溶媒対照群)の UDS 活性は、ラット初代培養肝細胞の予期された範囲内であった。

陽性対照群(2-アセチルアミノフルオレン：2-AAF)は、平均核数及び正味のグレイン数の明らかな増加を示した。

検体は $0.3 \mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞毒性(LDH の増加)を示したが(表 1 及び表 2)、2 回の試験いずれにおいても UDS(不定期 DNA 合成)活性の上昇は認められなかった(表 3 及び 4)。

以上の結果より、検体は本試験条件において、DNA 損傷誘発性を有しないものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ株式会社にある。

表 1. 細胞毒性：第 1 回目の試験結果

濃 度 (μ g/mL)	LDH 活性			乳酸濃度		
	平均* ¹	SD* ²	指数* ³	平均* ¹	SD* ²	指数* ³
0	85.0	8.2	—	4.4	0.6	—
DMSO (溶媒対照)	98.3	3.8	100.0	4.0	0.3	100.0
0.001	112.3	4.6	114.2	4.2	0.2	106.3
0.003	115.8	7.7	117.8	4.4	0.2	110.1
0.01	103.8	6.4	105.6	4.1	0.2	102.5* ⁴
0.03	103.5	7.6	105.3	4.3	0.1	107.5
0.1	111.5	15.0	113.5	4.1	0.2	103.1* ⁴
0.3	197.0	10.7	200.5	3.9	0.7	96.9
1.0	339.8	15.3	345.8	2.3	0.2	58.5

表 2. 細胞毒性：第 2 回目の試験結果

濃 度 (μ g/mL)	LDH 活性			乳酸濃度		
	平均* ¹	SD* ²	指数* ³	平均* ¹	SD* ²	指数* ³
0	197.0	11.7	—	6.0	0.5	—
DMSO (溶媒対照)	233.0	13.0	100.0	5.1	0.1	100.0* ⁴
0.0008	225.3	8.8	96.7	5.2	0.1	102.0* ⁴
0.004	228.5	25.0	98.1	5.2	0.2	102.5* ⁴
0.02	184.8	20.7	79.3	5.2	0.1	102.0* ⁴
0.1	197.7	10.3	84.8	5.4	0.2	105.9
0.5	355.3	22.8	152.5	5.1	0.4	99.0* ⁴

注) *¹ 4 回測定 of 平均 (単位/L ; LDH 活性, mg/dL ; 乳酸濃度)

*² 標準偏差

*³ 溶媒対照の測定値に対する指数

*⁴ 指数の違いは数値を測定値の少数第 1 位で丸めたことによる

表 3. DNA 修復活性 : 1 回目の試験結果

濃 度 (μ g/mL)	平均* ¹ 核グレイン数 ^A ($\pm$ SD)	平均* ¹ 細胞質 グレイン数 ^B ($\pm$ SD)	平均* ¹ 正味の 核グレイン数 ^C ($\pm$ SD)	修復細胞% ^D (正味の 核グレイン数 $\geq$ 5)
0	8.81 $\pm$ 3.94	14.16 $\pm$ 4.34	-5.35 $\pm$ 3.71	0
DMSO (溶媒対照)	11.89 $\pm$ 4.65	17.32 $\pm$ 4.52	-5.43 $\pm$ 4.10	0
0.01	12.87 $\pm$ 4.50	17.94 $\pm$ 4.69	-5.07 $\pm$ 3.46	0
0.03	11.60 $\pm$ 4.62	17.35 $\pm$ 4.41	-5.75 $\pm$ 4.57	1
0.1	10.84 $\pm$ 4.55	16.09 $\pm$ 4.57	-5.25 $\pm$ 4.11	0
0.3	12.41 $\pm$ 5.36	17.01 $\pm$ 5.10	-4.60 $\pm$ 3.67	2
1.0* ²	-	-	-	-
4.0 2-AAF* ³ (陽性対照)	34.52 $\pm$ 18.81	20.20 $\pm$ 9.54	14.33 $\pm$ 12.45	83

表 4. DNA 修復活性 : 2 回目の試験結果

濃 度 (μ g/mL)	平均* ¹ 核グレイン数 ^A ($\pm$ SD)	平均* ¹ 細胞質 グレイン数 ^B ($\pm$ SD)	平均* ¹ 正味の 核グレイン数 ^C ($\pm$ SD)	修復細胞% ^D (正味の 核グレイン数 $\geq$ 5)
0	10.41 $\pm$ 4.59	15.43 $\pm$ 4.21	-5.02 $\pm$ 4.04	0
DMSO (溶媒対照)	14.52 $\pm$ 5.30	20.56 $\pm$ 4.90	-6.04 $\pm$ 4.29	0
0.004	12.87 $\pm$ 4.89	18.86 $\pm$ 4.98	-5.99 $\pm$ 4.08	0
0.02	11.64 $\pm$ 4.12	18.89 $\pm$ 4.67	-7.25 $\pm$ 4.70	0
0.1	13.47 $\pm$ 5.26	19.15 $\pm$ 5.19	-5.68 $\pm$ 4.57	0
0.5	14.22 $\pm$ 4.65	19.76 $\pm$ 4.75	-5.54 $\pm$ 3.91	0
4.5 2-AAF* ³ (陽性対照)	32.31 $\pm$ 18.35	19.62 $\pm$ 7.49	12.69 $\pm$ 13.82	65

注) SD ; 標準偏差

*1 100 個の細胞の平均

*2 細胞毒性が明らか(明瞭な形態異常細胞)であったので測定しなかった

*3 2-アセチルアミノフルオレン

A ; 核当りのグレイン(粒子)数

B ; 核に近接した部分で、核の広さに相当する範囲の細胞質に認められるグレイン数

C ; 核グレイン数から細胞質グレイン数を引いた値

D ; 修復を行っている細胞(正味の核グレイン数が 5 個以上)の割合

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ株式会社にある。

9-5) ピラクロストロビンのチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)を用いた (資料 31)
in vitro 遺伝子突然変異試験 (HPRT 遺伝子突然変異試験)

試験機関：BASF 毒性研究所(ドイツ)

[GLP 対応]

報告書作成年：1998 年

被験物質の純度：

方法：チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)のヒポキサンチン-グアニン ホスホリボシル トランスフェラーゼ(HPRT)遺伝子座における *in vitro* 突然変異誘発性試験を実施した。試験は Aroclor で誘導したラット肝臓の S-9 Mix の存在下及び非存在下で行い、3 回の独立した試験を実施した。

突然変異試験における用量を設定するために、予備試験を実施した。

1 回目の試験における処理濃度を S-9 Mix の有無にかかわらず、20 μ g/mL (= 0.05mM) を最高用量として 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 及び 20.0 μ g/mL の 6 用量に設定した。また、2 回目の試験は S-9 Mix 非存在下のみで 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 及び 8.0 μ g/mL の 6 用量で、3 回目の試験は S-9 Mix の有無にかかわらず 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 及び 20.0 μ g/mL の 5 用量で実施した。

陽性対照として、S-9 Mix 非存在下ではエチルメタンスルフォネート(EMS)を 300 μ g/mL、S-9 Mix 存在下ではメチルコラントレン(MCA)10 μ g/mL の濃度で用いた。また、無処理

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ株式会社にある。

対照及び溶媒対照 (DMSO) を設け、いずれも同様に試験した。

陽性であるとする判定基準は以下のとおりとした。

- ・ 補正突然変異頻度が同時に実施した陰性対照の値あるいは 10^6 個細胞あたり 15 を越えている、突然変異頻度の上昇に用量—反応関係があるのいずれかまたは両方を満たしている
- ・ 突然変異頻度の上昇に再現性がある
- ・ 突然変異頻度が統計学的に有意に上昇し (ただし、明らかに陰性の場合には統計学的解析は行わない)、用量—反応関係がある

結 果：結果を表 1～5 に示した。

本被験物質は独立した 3 回の試験において、S-9 Mix の有無にかかわらず、突然変異コロニーの増加を誘発しなかった。1 回目の試験において (表 1)、S-9 Mix 非存在下で陰性対照の背景値の範囲をわずかに越える 17.89 が認められたが、用量—反応関係は認められず、他の 2 回の試験においては突然変異頻度の上昇は認められなかったことから、偶発的な上昇と考えられた。

一方、陽性対照として用いた EMS 及び MCA 処理群では突然変異頻度が上昇し、本試験方法の感受性ならびに使用した S-9 Mix の代謝活性について確認できた。また、陰性対照群における絶対コロニー形成率は 50% 以上であり、無処理対照群の突然変異頻度は 10^6 個細胞あたり 0～15 の範囲であった。したがって、本試験の有効性が確認された。

以上の結果より、本被験物質は薬物代謝酵素系の有無にかかわらず突然変異コロニーの増加を誘発しなかった。したがって、本実験条件下において、本被験物質は CHO 細胞を用いた *in vitro* HPRT 遺伝子突然変異試験において突然変異誘発性を持たないと結論された。

表 1 突然変異頻度 - 1 回目の試験, S-9 Mix 非存在下

試験群用量	細胞毒性 1 ^a		細胞毒性 2 ^b		突然変異頻度 (/10 ⁶ 細胞)	
	コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		無補正	補正 ^c
	絶対	相対	絶対	相対		
無処理対照	93.38	—	95.38	—	0.00	0.00
溶媒対照 (DMSO)	97.63	100.00	91.75	100.00	1.11	1.22
0.625 µg/mL	84.00	86.04	83.38	90.88	0.00	0.00
1.25 µg/mL	96.38	98.72	105.25	114.71	2.78	2.66
2.5 µg/mL	78.63	80.54	82.63	90.06	1.95	2.28
5.0 µg/mL	68.38	70.04	85.13	92.78	15.28	17.89
10.0 µg/mL	43.38	44.43	83.50	91.01	1.95	2.48
20.0 µg/mL	30.38	31.12	81.38	88.70	2.50	3.18
陽性対照 (EMS) 300.0 µg/mL	56.25	57.62	74.50	81.20	265.28	359.35

^a = 被験物質処理終了後 17-24 時間培養後のコロニー形成率 (被験物質処理後 17-24 時間培養後に各試験群につき約 200 個の細胞を 2 系列播種し, 1 週間培養してコロニーを形成させた)

^b = 突然変異発現時間終了時のコロニー形成率 (突然変異体の選択と平行して, 各試験群につき約 200 個の細胞を 2 系列播種し, 1 週間培養してコロニーを形成させた)

^c = 突然変異発現時間終了時の絶対コロニー形成率 (細胞毒性 2) を基に補正

表 2 突然変異頻度 - 1 回目の試験, S-9 Mix 存在下

試験群用量	細胞毒性 1 ^a		細胞毒性 2 ^b		突然変異頻度 (/10 ⁶ 細胞)	
	コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		無補正	補正 ^c
	絶対	相対	絶対	相対		
無処理対照	71.50	—	82.50	—	0.00	0.00
溶媒対照 (DMSO)	78.00	100.00	86.75	100.00	2.23	2.54
0.625 µg/mL	67.50	86.54	91.88	105.91	2.78	2.99
1.25 µg/mL	79.63	102.09	87.75	101.15	3.06	3.40
2.5 µg/mL	72.25	92.63	90.38	104.18	1.67	1.68
5.0 µg/mL	73.00	93.59	81.38	93.81	3.61	4.48
10.0 µg/mL	65.38	83.82	78.13	90.06	2.78	3.50
20.0 µg/mL	70.25	90.06	87.00	100.29	0.56	0.62
陽性対照 (MCA) 10.0 µg/mL	47.38	60.74	74.00	85.30	366.39	501.89

^a = 被験物質処理終了後 17-24 時間培養後のコロニー形成率 (被験物質処理後 17-24 時間培養後に各試験群につき約 200 個の細胞を 2 系列播種し, 1 週間培養してコロニーを形成させた)

^b = 突然変異発現時間終了時のコロニー形成率 (突然変異体の選択と平行して, 各試験群につき約 200 個の細胞を 2 系列播種し, 1 週間培養してコロニーを形成させた)

^c = 突然変異発現時間終了時の絶対コロニー形成率 (細胞毒性 2) を基に補正

表 3 突然変異頻度 - 2 回目の試験, S-9 Mix 非存在下

試験群用量	細胞毒性 1 ^a		細胞毒性 2 ^b		突然変異頻度 (/10 ⁶ 細胞)	
	コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		無補正	補正 ^c
	絶対	相対	絶対	相対		
無処理対照	106.50	—	99.13	—	0.00	0.00
溶媒対照 (DMSO)	96.63	100.00	89.25	100.00	0.00	0.00
3.0 µg/mL	86.25	89.26	91.88	102.95	0.00	0.00
4.0 µg/mL	72.50	75.03	120.63	135.16	0.56	0.45
5.0 µg/mL	72.25	74.77	97.50	109.24	4.17	4.27
6.0 µg/mL	68.38	70.76	96.88	108.55	5.28	5.30
7.0 µg/mL	70.75	73.22	91.38	102.39	7.50	8.37
8.0 µg/mL	58.38	60.42	97.25	108.96	5.00	5.13
陽性対照 (EMS) 300.0 µg/mL	62.00	64.16	84.75	94.96	262.50	309.45

^a = 同上

^b = 同上

^c = 同上

表 4 突然変異頻度 - 3 回目の試験, S-9 Mix 非存在下

試験群用量	細胞毒性 1 ^a		細胞毒性 2 ^b		突然変異頻度 (/10 ⁶ 細胞)	
	コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		無補正	補正 ^c
	絶対	相対	絶対	相対		
無処理対照	92.38	—	93.38	—	0.56	0.72
溶媒対照 (DMSO)	75.13	100.00	91.38	100.00	1.11	1.22
1.25 µg/mL	74.75	99.49	88.38	96.72	4.72	5.15
2.5 µg/mL	65.38	87.02	91.50	100.13	1.67	1.88
5.0 µg/mL	77.88	103.66	98.13	107.39	1.11	1.52
10.0 µg/mL	69.38	92.35	96.38	105.47	1.39	1.43
20.0 µg/mL	66.13	88.02	100.50	109.98	2.22	2.72
陽性対照 (EMS) 300.0 µg/mL	72.00	95.83	90.63	99.18	182.50	201.73

^a = 被験物質処理終了後 17-24 時間培養後のコロニー形成率 (被験物質処理後 17-24 時間培養後に各試験群につき約 200 個の細胞を 2 系列播種し, 1 週間培養してコロニーを形成させた)

^b = 突然変異発現時間終了時のコロニー形成率 (突然変異体の選択と平行して, 各試験群につき約 200 個の細胞を 2 系列播種し, 1 週間培養してコロニーを形成させた)

^c = 突然変異発現時間終了時の絶対コロニー形成率 (細胞毒性 2) を基に補正

表 5 突然変異頻度 - 3 回目の試験, S-9 Mix 存在下

試験群 用量	細胞毒性 1 ^a		細胞毒性 2 ^b		突然変異頻度 (/10 ⁶ 細胞)	
	コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		無補正	補正 ^c
	絶対	相対	絶対	相対		
無処理対照	89.88	—	98.00	—	1.95	1.92
溶媒対照 (DMSO)	78.50	100.00	91.50	100.00	3.89	3.98
1.25 µg/mL	84.63	107.81	98.50	107.65	0.00	0.00
2.5 µg/mL	76.50	97.45	89.75	98.09	1.67	1.85
5.0 µg/mL	79.88	101.76	95.75	104.64	0.56	0.48
10.0 µg/mL	76.50	97.45	82.38	90.03	7.50	8.93
20.0 µg/mL	73.25	93.31	88.13	96.32	0.84	0.87
陽性対照 (MCA) 10.0 µg/mL	59.00	75.16	65.88	72.00	417.78	645.37

^a = 同上

^b = 同上

^c = 同上

10) 生体機能影響試験

ピラクロストロビンの生体機能影響試験

(資料 32)

試験機関：財団法人 残留農薬研究所

報告書作成年：2000年

検体の純度：

1) マウス及びラットの中樞神経系に対する作用

① 雌雄マウスの症状及び体重

供試動物：ICR 系マウス，6 週齢，体重；雄 29.9～36.2g，雌 22.3～25.6g，
一群雌雄各 3 匹

方 法：検体を溶媒の 1% ツィーン 80 水溶液に懸濁し，0 (溶媒のみ)，320，800，2000
及び 5000mg/kg の用量で経口投与した。行動を投与直前，投与後 1 及び 6 時
間と 1，2，3 及び 7 日目に Irwin の方法に従って多元観察した。体重は，投
与直前と投与後 1，2，3 及び 7 日目に測定した。

結 果：5000mg/kg まで明確な異常症状は認められなかったが，5000mg/kg 投与群の雄
で投与 1 時間に自発運動の低下，握力の低下，下痢の発現が，雌では投与 1
日から 3 日にかけて躯体筋緊張の低下が疑われた。5000mg/kg 投与群の雌 1
例が投与 1 日に死亡した。

体重には雌雄とも検体投与によると思われる変化は認められなかった。

② 雄ラットの症状及び体重

供試動物：Sprague-Dawley 系雄ラット，6 週齢，体重；230～258g，一群 5 匹

方 法：検体を溶媒の 1% ツィーン 80 水溶液に懸濁し，0 (溶媒のみ)，320，800，2000
及び 5000mg/kg の用量で経口投与した。急性毒性症状の有無を投与 1 日前，
投与後 1 及び 6 時間と 1，2，3，5 及び 7 日目にケージサイドから観察した。
体重は，投与直前と投与後 1，2，3，5 及び 7 日目に測定した。

結 果：5000mg/kg で流涎，下痢，よろめき歩行を発現した個体がみられた。流涎は
投与 1 時間，下痢及びよろめき歩行は投与 3 日から 5 日にかけて認められた。
これらの症状は投与 7 日には消失した。2000mg/kg 以下では検体投与による
と思われる異常症状は認められなかった。

体重は 2000mg/kg 以上で有意に減少した。この減少は投与 1 日以降に認められ，

投与 7 日には回復の傾向を示した。800mg/kg 以下では検体投与によると思われる体重の変化は認められなかった。

③ 雄マウスのヘキソバルビタール睡眠に対する作用

供試動物：ICR 系雄マウス，6 週齢，体重；28.2～38.5g，一群 8 匹

方 法：検体を溶媒の 1% ツィーン 80 水溶液に懸濁し，0 (溶媒のみ)，128，320，800，2000 及び 5000mg/kg の用量で経口投与した。睡眠時間は，検体投与 1 時間後にヘキソバルビタールを 100mg/kg の用量で皮下投与し，正向反射の消失から回復までの時間を測定した。

結 果：2000mg/kg 以上で，軽度であるが有意な睡眠時間の延長が認められた ($p \leq 0.05$, Dunnett の多重比較検定，5000mg/kg 群で対照群の約 1.4 倍)。800mg/kg 以下では検体投与によると思われる有意な変化は認められなかった。

④ 雄ラットの体温に対する作用

供試動物：Sprague-Dawley 系雄ラット，6 週齢，体重；230～258g，一群 5 匹

方 法：「② 雄ラットの症状及び体重」の動物を用いて，投与 1 日前，投与後 1 及び 6 時間と 1，2，3，5 及び 7 日目に症状を調べた後，Digital laboratory thermometer を用いて肛門内約 4cm の直腸温を測定した。

結 果：5000mg/kg まで検体投与によると思われる変化は認められなかった。

2) ラットの循環器に対する作用

供試動物：Sprague-Dawley 系雄ラット，6 週齢，体重；242～284g，一群 5 匹

方 法：検体を溶媒の 1% ツィーン 80 水溶液に懸濁し，0 (溶媒のみ)，800，2000 及び 5000mg/kg の用量で経口投与した。投与 1 日前，投与後 1 及び 6 時間と 1，2，3 及び 7 日目に動物を保定箱に收容し，約 32℃ で約 15 分間保温した後，尾部に加圧カフを装着し，非観血式血圧測定装置を用いて安静時の最高血圧と心拍数を測定した。

結 果：2000mg/kg で 1 例と 5000mg/kg で 2 例が投与 3 日から 7 日にかけて死亡した。しかし，最高血圧及び心拍数に検体投与によると思われる変化は認められなかった。

3) ラットの自律神経系に対する作用

供試動物：Sprague-Dawley 系雄ラット，6 週齢，体重；230～258g，一群 5 匹

方 法：「② 雄ラットの症状及び体重」の動物を用いて，投与 1 日前，投与後 1 及び 6 時間と 1，2，3，5 及び 7 日目に症状と体温を調べた後，ルーペを用いて瞳孔径を測定した。

結 果：5000mg/kg まで検体投与によると思われる変化は認められなかった。

4) マウスの消化器に対する作用

供試動物：ICR 系雄マウス，6 週齢，体重；25.9～36.0g，一群 8 匹

方 法：検体を溶媒の 1% ツィーン 80 水溶液に懸濁し，0 (溶媒のみ)，20.5，51.2，128，320，800，2000 及び 5000mg/kg [試験 I] または 0 (溶媒のみ)，51.2，128，320，800，2000 及び 5000mg/kg [試験 II] の用量で経口投与した。検体投与 1 時間後に炭末懸濁液 (10% アラビアゴム水溶液中 10% の濃度) を 10ml/kg の容量で経口投与した。検体投与前に一晚 (約 16～18 時間) [試験 I] または約 2 時間 [試験 II] 動物を絶食させたが，水は自由に摂取させた。炭末投与 30 分後に動物をエーテルで屠殺して小腸を摘出した。小腸開始部から炭末先端までの長さを測り，全小腸の長さに対する炭末移動距離の比率 (%) を求めた。

結 果：試験 I (一晚絶食群) では，320mg/kg 投与群の 3 例，800mg/kg 投与群の 7 例，2000mg/kg 投与群の 5 例，5000mg/kg 投与群の 4 例が炭末投与前に死亡した。炭末輸送能は 128 及び 320mg/kg で統計学的に有意な促進を示したが，より低用量 (20.5 及び 51.2mg/kg) ならびに高用量 (2000 及び 5000mg/kg) の群の生存例に明確な変化はみられなかった。

試験 II (約 2 時間絶食群) では，800mg/kg 投与群の 1 例，2000mg/kg 投与群の 2 例，5000mg/kg 投与群の 1 例が炭末投与前に死亡した。炭末輸送能は 5000mg/kg まで明確な変化を示さなかった。

これらの結果から，絶食時間が長くなると検体による急性致死作用が増強されること，試験 I の 128 及び 320mg/kg でみられた促進は検体投与による変化ではなく，偶発的な結果であると考えられた。

5) ラットの骨格筋に対する作用

供試動物：Sprague-Dawley 系雄ラット，6 週齢，体重；230～258g，一群 5 匹

方 法：「② 雄ラットの症状及び体重」の動物を用いて、投与 1 日前、投与後 1 及び 6 時間と 1, 2, 3, 5 及び 7 日目に症状、体温及び瞳孔径を調べた後、握力測定装置のグリッドに四肢を掴まらせ、保定した尾を後方に引き、グリッドから四肢が離れた時(最大)の握力を測定した。

結 果：5000mg/kg まで検体投与によると思われる変化は認められなかった。

6) ラットの腎機能に対する作用

供試動物：Sprague-Dawley 系雄ラット、 6 週齢、体重；186～208g、一群 5 匹
7 週齢、体重；286～354g、一群 5 匹

方 法：検体を溶媒の 1% ツィーン 80 水溶液に懸濁し、0 (溶媒のみ)、51.2, 128, 320, 800, 2000 及び 5000mg/kg の用量で経口投与した。投与 3 日後に、生理食塩液を 25ml/kg の容量で 30 分おきに 2 回経口投与し、2 回目の生理食塩液投与後直ちに動物を採尿ケージに入れて 3 時間の尿を採取した。

検査項目	検査機器及び試薬
尿 量	メスシリンダー
Na, K, Cl 濃度及び排泄量	全自動電解質分析装置 (EA06T)
浸 透 圧	浸透圧計 (Micro osmometer)
pH, 潜血, 蛋白質, ケトン体, グルコース量	試験紙 (ウロラプスティック)

結 果：5000mg/kg で 3 例が採尿時 (投与 3 日目) までに死亡した。800mg/kg 以上で尿量、尿中 Na, K, Cl 排泄量が用量に依存して減少した。尿中 Na, K, Cl 濃度には 5000mg/kg まで明確な変化はみられなかった。このことは、電解質排泄量の減少は尿量減少に起因することを示唆していた。320mg/kg 以下では尿量、尿中 Na, K, Cl 排泄量の明確な変化は認められなかった。浸透圧、pH、潜血、蛋白質、ケトン体、グルコース量には 5000mg/kg まで検体投与によると思われる変化は認められなかった。

以上のことより、本剤をマウスに経口投与すると、5000mg/kg の用量まで症状、体重及び小腸炭末輸送能に明確な異常は認められなかった。ヘキソバルビタール睡眠時間は 2000mg/kg 以上で軽度延長された。ラットに経口投与すると、2000mg/kg 以上で体重減少、5000mg/kg で流涎、下痢、よろめき歩行などの症状が認められた。800mg/kg 以上で尿量及び尿中電解質排泄量の減少がみられたが、5000mg/kg まで体温、血圧・心拍数、瞳孔径、握力に明確な変化は認められなかった。マウス及びラットとも 2000mg/kg 以上で死亡がみられたが、マウスでは絶食時間を長くすることによってより低用量から死亡した (約 2 時間絶食では 800mg/kg 以上、一晚絶食では 320mg/kg 以上)。本試験ならびに急性毒性試験の結果から、原体は経口及び経皮経路で低毒性を示すのに対して比較的強い吸入毒性を示すが、本剤を含む製剤 (20% ドライフロアブル) は経口、経皮経路とともに吸入経路でも低毒性を示すことが示唆された。20% ドライフロアブル製剤が散布作業に伴って摂取されたり、誤って摂取された場合に急性中毒を生ずる可能性は低いと予想される。

BAS 500 F の「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 (溶 媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
中枢神経系						
症 状 [Irwin 法] (雌雄マウス)	経 口 (1% Tween 80 水溶液)	0, 320, 800, 2000, 5000	雌雄各 3	5000	2000	自発運動、握力、躯体 筋緊張の低下、下痢が 観察された。 死 亡： 1 例(雌, 5000mg/kg)
症 状 (雄ラット)	経 口 (1% Tween 80 水溶液)	0, 320, 800, 2000, 5000	5	2000	800	流涎、下痢、よるめき 歩行、体重減少が観察 された。
ヘキソバルビタール 睡眠 (雄マウス)	経 口 (1% Tween 80 水溶液)	0, 128, 320, 800, 2000, 5000	8	2000	800	睡眠時間の延長が観察 された。
体 温 (雄ラット)	経 口 (1% Tween 80 水溶液)	0, 320, 800, 2000, 5000	5	—	5000	検体投与によると思わ れる変化は認められな かった。
循環器系						
血圧、心拍数 (雄ラット)	経 口 (1% Tween 80 水溶液)	0, 800, 2000, 5000	5	—	5000	検体投与によると思わ れる変化は認められな かった。 死 亡： 1 例(2000mg/kg), 1 例(5000mg/kg)
自律神経系						
瞳 孔 径 (雄ラット)	経 口 (1% Tween 80 水溶液)	0, 320, 800, 2000, 5000	5	—	5000	検体投与によると思わ れる変化は認められな かった。
消 化 器						
炭末輸送 (雄マウス)	経 口 (1% Tween 80 水溶液)	0, 20.5, 51.2, 128, 320, 800, 2000, 5000	8	—	5000	検体投与によると思わ れる変化は認められな かった。 死 亡*： 320mg/kg: 3 例 800mg/kg: 7 例(1 例) 2000mg/kg: 5 例(2 例) 5000mg/kg: 4 例(1 例)
骨 格 筋						
握 力 (雄ラット)	経 口 (1% Tween 80 水溶液)	0, 320, 800, 2000, 5000	5	—	5000	検体投与によると思わ れる変化は認められな かった。
腎 機 能						
尿量、尿中電 解質 (Na, K, Cl) 濃度及び 排泄量、浸透 圧、pH、潜血、 蛋白質、ケトン 体、グルコース量 (雄ラット)	経 口 (1% Tween 80 水溶液)	0, 51.2, 128, 320, 800, 2000, 5000	5	800	320	尿量と尿中電解質排泄 量の減少が認められ た。 死 亡： 3 例(5000mg/kg)

* 一晚絶食群(約 2 時間絶食群)

11) その他

11-1) ラットにおけるメカニズム試験（血清及び尿中铁分析）

（資料 38）

試験機関：BASF 毒性研究所（ドイツ）

報告書作成年：2003 年

検体純度：

供試動物：Wistar CrIGlxBrIHan:WI ラット，1 群雌雄各 10 匹，開始 9 週齢

試験開始時体重範囲（雄；220.6-249.6g，雌；157.2-179.9g）

試験目的：ラットの 90 日間反復経口投与毒性試験（資料 16）において，高用量投与の雌雄で十二指腸粘膜の壁肥厚が観察された。鉄は主として十二指腸から吸収されるが，検体投与により血中から鉄が失われることで十二指腸における鉄吸収要求が高まり，その結果十二指腸に前記変化が生じたものと推察した。本試験はその推察を検証する目的で，検体投与後の血清及び尿中铁濃度と，血清におけるトランスフェリン濃度を測定したものである。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ株式会社にある。

以上の成績より、血清中铁濃度の減少に関する無影響量は 50ppm（雄：3.8 mg/kg/day，雌：4.1 mg/kg/day）であった。

11-2) ラットにおけるメカニズム試験 (酸化ストレス的影響)

(資料 39)

試験機関 : BASF 毒性研究所 (ドイツ)

報告書作成年 : 2003 年

検体純度 :

供試動物 : Wistar CrIGlxBrIHan:WI ラット, 1 群雄各 10 匹, 開始 10 週齢

試験開始時体重範囲 (雄 ; 241.4-263.5g)

試験目的 : ラットの 24 カ月間経口発がん性試験 (資料 22) において, 高用量投与の雄で肝細胞の壊死および腺腫が観察された。本試験はそれら所見の関連性の有無および頻度増加について肝臓に酸化ストレス的影響があるかどうかを検証する目的で, 実施したものである。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ株式会社にある。

以上より、検体投与により過酸化脂質は減少しており、肝臓に対して酸化ストレス的影響は及ぼさないと考えられる。

11-3) *in vitro* 溶血試験 (スクリーニング試験)

(資料 40)

試験機関 : BASF 毒性研究所 (ドイツ)

報告書作成年 : 2003 年

検体純度 :

試験の目的 : ラットを用いた 90 日間反復経口投与毒性試験 (資料 16) でみられた貧血は、その臨床所見より当初溶血性貧血と診断した。その後の検討で溶血性貧血ではなく、低血色素性貧血と判断されたことより、本薬に直接的溶血作用がないことを確認するため、*in vitro* での試験を実施した。

結 論 : BAS 500F は *in vitro* の溶血試験において, 比較的高い濃度 (0.1% w/v) と赤血球懸濁液を 2 時間攪拌した後でも溶血を起こさなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ株式会社にある。

表 1. 結 果

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ株式会社にある。

11-4) ラットに対する BAS 500 F の混餌投与及びビタミン B₁₂ 同時皮下投与試験 (資料 41)

試 験 機 関 : BASF 毒性研究所 (ドイツ)

報告書作成年 : 2003 年

検体純度 : BAS 500 F 原体 ;

ビタミン B₁₂ : シアノコバラミン 100 μ g 溶液

供試動物 : Wistar 系ラット [CrI Glx Br I Han:WI], 1 群雄各 12 匹, 投与開始時約 8-10 週齢, 体重範囲 273.2~301.6 g

投与期間 : 雄 28 日間 (2003 年 6 月 6 日~2003 年 7 月 3 日)

試験目的 : 本試験の目的は, 検体の経口投与により誘発された影響 (貧血, 血清鉄濃度の低下及び十二指腸肥厚) がビタミン B₁₂ の同時投与で抑制されるか検討する.

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ株式会社にある。

ビタミン B₁₂ 投与の有無
に係らず検体投与群で体重及び摂餌量の低下、鉄欠乏性貧血(貧血及び血清鉄濃度の低下)並びに十二指腸重量の増加が認められ、検体に起因する貧血、血清鉄濃度低下及び十二指腸重量増加は、ビタミン B₁₂ を同時投与しても抑制できなかった。また、前胃及び腺胃の pH に検体投与の影響はなかった。

以上の結果から、検体の投与による血清鉄濃度の低下が貧血及び十二指腸肥厚の原因であることが明らかになった。