

9) 変異原性に関する試験

9-1) 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 20)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 1998年

検体の純度:

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* 4株 (TA100, TA1535, TA98, TA1537) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA*株を用い、代謝活性化系 (S9 Mix) の存在下及び非存在下で Amesらの方法を用いてプレート法及びプレインキュベーション法で変異原性を検索した。

検体は水に不溶であったため、DMSOを溶媒として用いた。

1回目の実験はプレート法を用いて22, 110, 550, 2750及び5500 μg /プレートの5用量、2回目の実験はプレインキュベーション法を用いて20, 100, 500, 2500及び5000 μg /プレートの5用量で、各用量3枚のプレートを用いて、37°Cで48~72時間培養後、復帰変異コロニー数を計数した。

陽性対照試験及び溶媒対照試験も同時に実施した。

結果: 結果を次頁以降の表に示した。

検体の析出が、S9 Mixの有無に係らず500 μg /プレート以上の用量で認められた。また、抗菌性は大腸菌を除き、プレート法では5000 μg /プレートの用量で、プレインキュベーション法ではS-9 Mixの非存在下で2500 μg /プレート以上、S-9 Mixの存在下で5000 μg /プレートの用量で認められた。(申請者注: 抗菌性について報告書に誤記があり、表に基づいて記載した。)

検体処理群において、S9 Mixの有無にかかわらず、いずれの菌株、いずれの用量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、陽性対照群として用いたMNNG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン)、ENNG (N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン)、NOPD (4-ニトロ-o-フェニレンジアミン)、AAC (9-アミノアクリジン) 及び2-AA (2-アミノアントラセン) ではすべての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

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しないものと判断される。

表1. 復帰変異試験成績 (1回目の実験 ; プレート法)

薬 剤	濃 度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 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	WP2 uvrA	TA98	TA1537
対照 (DMSO)		—	113	20	28	28	9
検 体	22	—	114	18	30	29	9
	110	—	118	17	29	25	8
	550	—	124 P	12 P	30 P	18 P	8 P
	2750	—	118 P	11 P	22 P	8 P	4 P
	5500	—	98 BP	6 BP	26 P	4 BP	5 BP
陽性対照	MNNG 5.0	—	1104	973	NT	NT	NT
	ENNG 10	—	NT	NT	900	NT	NT
	NOPD 10	—	NT	NT	NT	961	NT
	AAC 100	—	NT	NT	NT	NT	777
対照 (DMSO)		+	128	20	40	39	10
検 体	22	+	129	17	36	39	10
	110	+	125	17	32	35	8
	550	+	116 P	15 P	33 P	22 P	8 P
	2750	+	95 P	12 P	28 P	11 P	6 P
	5500	+	79 BP	10 BP	29 P	9 BP	4 BP
陽性対照	2-AA 2.5	+	1303	170	NT	955	142
	2-AA 60	+	NT	NT	195	NT	NT

数値は3枚のプレートの平均値

B : 菌株に対する生育阻害を認める.

P : 検体の析出を認める.

NT : 試験を行っていない.

MNNG : N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

NOPD : 4-ニトロ-o-フェニレンジアミン

AAC : 9-アミノアクリジン

2-AA : 2-アミノアントラセン

陽性対照物質は全てDMSOに溶解して使用.

表2. 復帰変異試験成績 (2回目の実験 ; プレインキューベーション法)

薬 剤	濃 度 (μ g/ プレート)	S9 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	WP2 uvrA	TA98	TA1537
対照 (DMSO)		-	106	19	23	25	9
検 体	20	-	100	18	24	21	8
	100	-	102	18	23	21	8
	500	-	101 P	10 P	27 P	18 P	6 P
	2500	-	27 BP	2 BP	18 P	10 BP	3 BP
	5000	-	19 BP	0 BP	14 P	4 BP	1 BP
陽性対照	MNNG 5.0	-	1338	1177	NT	NT	NT
	ENNG 10	-	NT	NT	775	NT	NT
	NOPD 10	-	NT	NT	NT	725	NT
	AAC 100	-	NT	NT	NT	NT	682
対照 (DMSO)		+	113	20	30	35	11
検 体	20	+	107	21	32	34	12
	100	+	103	18	32	25	9
	500	+	114 P	12 P	29 P	26 P	5 P
	2500	+	88 P	6 P	22 P	10 P	4 P
	5000	+	26 BP	3 BP	13 P	8 BP	0 BP
陽性対照	2-AA 2.5	+	1139	285	NT	1328	114
	2-AA 60	+	NT	NT	187	NT	NT

数値は3枚のプレートの平均値

B : 菌株に対する生育阻害を認める.

P : 検体の析出を認める.

NT : 試験を行っていない.

MNNG : N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

NOPD : 4-ニトロ-o-フェニレンジアミン

AAC : 9-アミノアクリジン

2-AA : 2-アミノアントラセン

陽性対照物質は全てDMSOに溶解して使用.

9-2) 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21)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 1999年

検体の純度:

試験方法:

チャイニーズハムスターV79細胞を用いて、代謝活性化系(S9 mix)の存在下及び非存在下で染色体異常誘発性を検索した。検体はDMSOに溶解して用いた。試験は各濃度あたり2反復で、2回行った。

実験1では細胞播種約24~30時間後に血清を無添加の新培地と交換し、S9 mixの存在下及び非存在下で培地に検体を添加し、4時間処理した。4時間後に血清を添加した新培地と交換し、14時間培養後に染色体標本を作製した。

実験2ではS9 mixの非存在下で、血清添加培地中で18あるいは28時間連続検体処理し、検体処理後標本作製する方法及びS9 mixの非存在下で実験1と同様に血清無添加培地中で4時間検体処理後、血清添加培地と交換し、24時間培養後に染色体標本を作製した。

陽性対照として、S9 mixの非存在下ではエチルメタンスルホネート(EMS)を350 μ g/mlの濃度で、S9 mixの存在下ではシクロホスファミド(CPP)を0.5 μ 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。

観察は、検体処理群及び溶媒対照群では各反復あたり100個(各濃度あたり合計200個)、陽性対照群では各反復あたり50個(各濃度あたり100個)のよく広がった中期分裂像について行った。

用量設定根拠:

結 果：

結果を次頁の表に示した。

検体は代謝活性化の有無にかかわらず、すべての処理群で染色体異常を示す分裂中期細胞数の増加を示さなかった。

陽性対照物質であるEMS(エチルメタンスルホネート)及びCPP(シクロホスファミド)では、明らかな染色体異常を示す分裂中期細胞数の増加を示した。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本実験条件下において染色体異常誘発性を有しないものと判断される。

表一1. 染色体異常試験結果 (実験1)

薬剤	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	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	0.5		0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	4.0	2.0	
検体	20				0.0	0.0	-	0.0	0.5	0.0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.0	0.0	4.0	3.0	-
	100	4	18	-	0.0	0.0	-	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	2.0	0.0	0.0	5.0	4.0	-
	500				0.0	0.5	-	0.0	0.5	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	3.5	2.5	-
陽性対照 (EMS)	350	4	18	-	0.0	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	10.5**	-	12.5**	12.0**	-	+
溶媒対照 (DMSO)		4	18	+	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	4.0	0.5	
検体	20				0.0	0.0	-	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	1.0	-
	100	4	18	+	0.0	0.0	-	1.5	0.0	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	8.0	4.0	-
	500				0.0	2.4	-	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	1.5	0.0	0.0	8.0	3.5	-
陽性対照 (CPP)	0.5	4	18	+	0.0	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	17.0**	-	19.0**	19.0**	-	+

検体処理群及び溶媒対照群では各反復あたり合計200個、陽性対照群では各反復あたり50個(各濃度あたり100個)のよく広がった中期分裂像について観察。同時に、異数体細胞及び倍数体細胞を計数。

標本作製時間は検体処理時間を含む +Gap: ギャップを含む -Gap: ギャップを含まない
EMS: エチルメタンсульフォネート CPP: シクロフォスファミド

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

表-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	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)		18	18	-	0.0	0.0	/	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5 ^a	5.0	1.5	/		
検体	31.25				0.0	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	8.0	2.5	-		
	62.50	18	18	-	0.0	0.0	-	0.5	0.5	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.5	1.5	-		
	125.00				0.0	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.5	1.0	0.0	0.0	0.0	9.0	3.0	-		
陽性対照 (EMS)	350	18	18	-	0.0	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	16.0 ^{**}	20.0 ^{**}	20.0 ^{**}	+		
溶媒対照 (DMSO)		28	28	-	0.0	0.0	/	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.5	2.5	/		
検体	125.00	28	28	-	0.5	1.0	-	1.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	6.5	2.0	-		
溶媒対照 (DMSO)		4	28	+	0.5	0.0	/	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	5.0	1.0	-		
検体	125.00				0.5	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	0.0	1.5	3.5	2.0	-		
	250.00	4	28	+	0.5	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	4.0	0.5	-		
	500.00				1.0	0.0	-	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	0.0	1.5	4.5	2.0	-		

検体処理群及び溶媒対照群では各反復あたり100個(各濃度あたり合計200個)、陽性対照群では各反復あたり50個(各濃度あたり100個)のよく広がった中期分裂像について観察。同時に、異数体細胞及び倍数体細胞を計数。

標本作製時間は検体処理時間を含む
EMS: エチルメタンスルフォネート

+Gap: ギャップを含む, -Gap: ギャップを含まない

^a 細粉化が認められた

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 直接確率検定)

9-3) マウス骨髄における小核試験

(資料 22)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 1999年

検体純度:

試験動物: 雄のNMRI系マウス, 平均体重29.1g, 1群 雄5匹

試験方法: 検体を0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁して0, 500, 1000及び2000mg/kgの用量で、1群雄マウス5匹に24時間間隔で2回腹腔内投与した。なお、対照群には賦形剤のみを同様に投与した。陽性対照としてシクロホスファミド20mg/kg及びビンクリスチン(紡錘体毒作用物質として)0.15mg/kgの用量で単回腹腔内投与した。

最終投与24時間後に屠殺して各動物から大腿骨の骨髄を採取してスライドグラス上に固定後、エオジン及びメチレンブルー溶液で5分間染色後すすぎ、最後に7.5%ギムザ溶液で染色した。

各標本について2000個の多染性赤血球を観察し、小核の有無及び小核の大(小核の半径<細胞の半径の1/4)小(小核の半径 \geq 細胞の半径の1/4)を検査した。また同時に、小核を有するあるいは有しない正染性赤血球数についても検査した。この結果から、全赤血球に対する多染性赤血球の割合及び多染性赤血球に対する小核を有する多染性赤血球の割合を算出した。

用量設定根拠:

試験結果: 結果を次頁の表に示した。

小核の出現頻度

薬 剤	用 量 (mg/kg)	MNPCE/PCE (%)			PCE/(PCE+NCE) (%) 平均±SD	
		小 型 ^a 平均	大 型 ^b 平均	合 計 平均±SD		
陰性対照 (0.5%CMC)		0.11	0.01	0.12±0.06	80.5±4.3	
検 体	500	0.13	0.01	0.14±0.07	71.1±5.3	
	1000	0.13	0.00	0.13±0.08	64.1±8.9	
	2000	0.12	0.00	0.12±0.08	65.3±10.6	
陽性対照	CPP	20	1.50**	0.00	1.50±0.49**	73.5±5.5
	VCR	0.15	5.21**	0.87**	6.08±1.19**	47.5±7.7

Wilcoxon test (片側) : ** ; p ≤ 0.01

PCE : 多染性赤血球.

NCE : 正染性赤血球

MNPCE : 小核を有する多染性赤血球

小型^a : 小核の半径 < 細胞の半径/4, 大型^b : 小核の半径 ≥ 細胞の半径/4

CMC : カルボキシメチルセルロース

CPP : シクロホスファミド

VCR : ビンクリスチン

検体投与により、すべての投与群でうずくまり姿勢及び立毛が観察された。溶媒対照群及び陽性対照群の動物には毒性症状は認められなかった。

検体投与群では、陰性対照群に比し、いずれの用量においても小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な増加は認められなかった。

一方、陽性対照群であるシクロホスファミドあるいはビンクリスチンでは小核を有する多染性赤血球の出現頻度に明らかな増加が認められた。シクロホスファミドは小型の小核のみを誘発した。一方、ビンクリスチンは大型及び小型の両小核を誘発し、大型小核の占める割合は14%であった。

結論：以上の結果より、本試験条件下において、検体は骨髄多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性であると判断される。

9-4) ラット初代培養肝細胞を用いた *in vitro* 不定期DNA合成 (UDS) 試験

(資料 23)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 2000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合成誘発能をオートラジオグラフィにより検索した。検体はDMSOに溶解した。

細胞付着期間(約2時間)経過後、培養液を捨て、未付着細胞を除き、各濃度の検体溶液及び³H-チミジン加(最終濃度10 μ Ci/ml)血清無添加培地と交換し、18~20時間処理後、³H-チミジンの取り込みを測定した。実験は下記の濃度で2回行った。

各処理群から正常形態細胞25~50個/スライドを無作為に選択し、合計100個の細胞を観察し、核上銀粒子数(NG)及び細胞質銀粒子数(CG)を計数した。これらの値から平均核上銀粒子数(NG)、平均細胞質銀粒子数(CG)、平均正味核上銀粒子数(NNG; NG-CG)、修復細胞(正味核上銀粒子数が0個以上及び正味核上銀粒子数が5個以上)の割合を算出した。

陰性対照群(無処理対照及び溶媒対照)及び陽性対照群(2-アセチルアミノフルオレン)を設け、同様に試験した。

同時に、培養液中の乳酸脱水素酵素(LDH)活性、乳酸塩濃度を測定すると共に検体処理後の細胞の形態学的変化の有無を観察し、細胞毒性試験を検査した。この結果からUDSを評価する4濃度を選択した。

実験濃度及びUDS評価濃度

実験	実験濃度 (μ g/ml)	UDS評価濃度 (μ g/ml)
1(再試験)	0, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0, 100.0, 250.0, 500.0	0, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0
2	0, 1.563, 3.125, 6.250, 12.500, 25.000, 50.000	0, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0

用量設定根拠:

試験結果：結果を次頁以降の表に示した。

LDH 活性は25 $\mu\text{g/ml}$ 以上で増加し、乳酸塩濃度は25 $\mu\text{g/ml}$ 以上で減少した。また細胞形態は10 $\mu\text{g/ml}$ 以上で影響がみられた。これらの結果から、細胞毒性はおおよそ10 $\mu\text{g/ml}$ 以上の用量で認められると判断される。

検体はいずれの用量においても有意な平均核上銀粒子数の増加を誘発しなかった。

また、陰性対照群のUDS活性は予想される範囲内であり、陽性対照物質(2-アセチルアミノフルオレン)は平均核上銀粒子数及び正味の核上銀粒子数の明らかな増加を誘発した。

以上の結果より、本試験条件下で、本検体はラット初代培養肝細胞を用いた不定期DNA合成試験において陰性であると判断される。

表-1. UDS試験成績(実験1再試験)

試験群用量	NG数 平均 ¹⁾ ±SD	CG数 平均 ¹⁾ ±SD	NNG数 平均 ¹⁾ ±SD	修復細胞(%)		細胞毒性(%)	
				NNG≥0	NNG≥5	LDH活性	乳酸塩濃度
無処理対照	10.49±4.80	15.36±4.75	-4.87±4.27	10	0	-	-
溶媒対照(DMSO)	10.88±5.14	16.62±4.75	-5.74±4.44	8	0	100.0	100.0
検体(μg/mL)							
0.5	-	-	-	-	-	94.8	109.9
1.0	9.75±4.02	16.19±4.27	-6.44±3.83	4	0	102.8	107.9
5.0	14.14±4.73	20.41±6.64	-6.27±4.86	9	2	105.7	100.5
10.0	11.89±6.00	19.14±7.14	-7.25±5.55	2	1	105.3	96.3
50.0	14.26±6.75	19.46±6.76	-5.20±4.13	9	0	151.7	100.5
100.0 *	-	-	-	-	-	156.7	65.4
250.0 *	-	-	-	-	-	140.9	51.3
500.0 *	-	-	-	-	-	133.7	47.1
陽性対照(2-AAF) 1.0 μg/mL	54.92±21.26	25.91±11.38	29.01±15.00	96	89	-	-

NG = 核上銀粒子数,

CG = 細胞質銀粒子数,

NNG = 正味核上銀粒子数,

¹⁾ = 100個の細胞の平均,

SD = 標準偏差,

LDH = 乳酸脱水素酵素.

* = 細胞毒性のために評価できない(形態的变化が著しいため評価可能な細胞がない/あるいはほとんどない).

表-2. UDS試験成績(実験2)

試験群用量	NG数 平均 ¹⁾ ±SD	CG数 平均 ¹⁾ ±SD	NNG数 平均 ¹⁾ ±SD	修復細胞 (%)		細胞毒性 (%)	
				NNG≥0	NNG≥5	LDH活性	乳酸塩濃度
無処理対照	10.26± 4.49	15.02± 4.00	- 4.76± 4.30	11	0	-	-
溶媒対照(DMSO)	11.70± 3.69	16.10± 3.64	- 4.40± 3.62	9	0	100.0	100.0
検体(μg/mL)							
1.563	-	-	-	-	-	87.3	94.2
3.125	-	-	-	-	-	99.8	105.8
6.250	10.91± 4.88	15.50± 4.15	- 4.59± 4.30	11	1	108.2	105.8
12.500	10.84± 3.15	14.37± 3.00	- 3.53± 3.37	10	1	113.6	102.6
25.000	11.13± 4.22	14.45± 3.39	- 3.32± 3.14	9	1	149.2	74.3
50.000	10.77± 4.80	15.38± 4.49	- 4.61± 4.27	14	0	187.0	60.7
陽性対照 (2-AAF) 1.000 μg/mL	27.36±11.74	17.13± 4.81	10.24±10.45	84	69	-	-

NG = 核上銀粒子数,

CG = 細胞質銀粒子数,

NNG = 正味核上銀粒子数,

¹⁾ =100個の細胞の平均,

SD = 標準偏差,

LDH = 乳酸脱水素酵素,

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ジャパン株式会社にある。

9-5) チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO) を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験
(HPRT遺伝子突然変異試験) Boscalid
(資料 24)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 2000年

検体純度:

試験方法: チャイニーズハムスター卵巣由来の細胞 (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代謝活性化系 (S-9 mix) の存在下及び非存在下で, 2回行った。溶媒としてDMSOを用いた。

陽性対照として, S-9 mix非存在下ではエチルメタンサルホネート (EMS) を300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, S-9 mix存在下ではメチルコラントレン (MCA) を10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で用いた。また, 無処理対照及び溶媒対照 (DMSO) を設け, いずれも同様に試験した。

用量設定根拠:

試験結果: 結果を表1~4に示した。

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

Boscalid

本検体は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。

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の顕著な増加が認められた。

以上の結果より、本検体はチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO)を用いた*in vitro* HPRT遺伝子突然変異試験において、代謝活性化系の有無に係らず突然変異誘発性を有しないと判断される。

表1. 突然変異頻度 - 1回目の実験, S-9 mix非存在下

試験群用量	コロニー形成率1 (%) ^a		コロニー形成率2 (%) ^b		突然変異頻度 (／10 ⁶ 細胞)	
	生存率		細胞毒性		無補正	補正 ^c
	絶対	相対	絶対	相対		
無処理対照	99.8	-	86.3	-	3.89	4.45
溶媒対照 (DMSO)	95.5	100.0	95.1	100.0	2.22	2.65
15.625 μg/mL	107.0	112.0	99.1	104.2	1.39	1.38
31.250 μg/mL*	97.1	101.7	94.1	98.9	2.22	2.04
62.500 μg/mL*	76.3	79.8	89.8	94.3	0.56	0.63
125.000 μg/mL*	56.9	59.6	83.1	87.4	2.78	3.34
250.000 μg/mL*	58.1	60.9	88.8	93.3	1.11	1.15
500.000 μg/mL*	57.9	60.6	109.1	114.7	0.00	0.00
300.0 μg/mL EMS	72.3	75.7	85.9	90.3	279.45	325.65

^a = 検体処理終了後17-24時間培養後のコロニー形成率 (検体処理後17-24時間培養後, 各試験群につき約200個の細胞を2反復播種し, 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反復播種し, 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

* 培地中に検体の析出が認められた

EMS: エチルメタンサルホネート

表2. 突然変異頻度 - 1回目の実験, S-9 mix存在下¹⁾

試験群用量	コロニー形成率1 (%) ^a		コロニー形成率2 (%) ^b		突然変異頻度 (／10 ⁶ 細胞)	
	生存率		細胞毒性		無補正	補正 ^c
	絶対	相対	絶対	相対		
無処理対照	83.1	-	94.5	-	1.95	2.07
溶媒対照 (DMSO)	91.8	100.0	82.0	100.0	6.39	7.84
15.625 μg/mL*	80.6	87.9	76.4	93.1	5.56	7.25
31.250 μg/mL*	85.8	93.5	86.6	105.6	3.89	4.42
62.500 μg/mL*	82.9	90.3	86.3	105.2	1.12	1.50
125.000 μg/mL*	83.5	91.0	85.9	104.7	0.56	0.65
250.000 μg/mL*	89.3	97.3	91.1	111.1	5.00	5.64
500.000 μg/mL*	78.3	85.3	82.0	100.0	0.84	1.02
10.0 μg/mL MCA	81.1	88.4	94.1	114.8	267.50	287.80

¹⁾ = S-9分画: コファクター = 3:7, ^a = 同上, ^b = 同上, ^c = 同上

MCA: メチルコラントレン,

* : S-9 mix析出のため, 培地中の検体の析出については評価できなかった.

表3. 突然変異頻度 - 2回目の実験, S-9 mix非存在下

試験群用量	コロニー形成率1 (%) ^a		コロニー形成率2 (%) ^b		突然変異頻度 (✓10 ⁶ 細胞)	
	生存率		細胞毒性		無補正	補正 ^c
	絶対	相対	絶対	相対		
無処理対照	85.7	-	89.7	-	5.84	6.11
溶媒対照 (DMSO)	103.3	100.0	95.9	100.0	6.11	5.96
3.125 μg/mL	82.9	80.3	101.8	106.2	1.39	1.39
6.250 μg/mL	90.3	87.4	107.7	112.3	2.78	2.56
12.500 μg/mL	93.8	90.8	112.3	117.1	1.95	1.73
25.000 μg/mL	88.3	85.5	89.0	92.8	4.72	4.83
50.000 μg/mL*	94.4	91.4	92.2	96.1	2.50	2.71
100.000 μg/mL*	83.4	80.7	98.5	102.7	3.34	3.39
300.0 μg/mL EMS	73.8	71.4	80.5	83.9	346.95	431.97

^a = 検体処理終了後17-24時間培養後のコロニー形成率 (検体処理後17-24時間培養後に各試験群につき約200個の細胞を2反復播種し、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反復播種し、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

* 培地中に検体の析出が認められた

EMS: エチルメタンスルホネート

表4. 突然変異頻度 - 2回目の実験, S-9 mix存在下²⁾

試験群用量	コロニー形成率1 (%) ^a		コロニー形成率2 (%) ^b		突然変異頻度 (✓10 ⁶ 細胞)	
	生存率		細胞毒性		無補正	補正 ^c
	絶対	相対	絶対	相対		
無処理対照	88.8	-	98.2	-	3.34	3.18
溶媒対照 (DMSO)	84.2	100.0	96.3	100.0	1.11	1.27
10.24 μg/mL	92.3	109.6	93.7	97.3	2.50	2.77
25.60 μg/mL	93.7	111.3	87.2	90.6	5.56	6.61
64.00 μg/mL	76.9	91.3	92.7	96.3	3.33	3.54
160.00 μg/mL	63.4	75.3	89.9	93.4	5.83	6.52
400.00 μg/mL	57.7	68.5	95.7	99.4	5.84	6.19
1000.00 μg/mL	42.5	50.5	94.0	97.6	2.50	2.67
10.0 μg/mL MCA	77.8	92.4	100.3	104.2	83.61	84.06

²⁾ =S-9分画: コファクター = 1:9, ^a =同上, ^b =同上, ^c =同上

MCA: メチルコラントレン,

* : S-9 mix析出のため、培地中の検体の析出については評価できなかった。

10) 生体機能への影響に関する試験

生体機能影響試験

(資料 25)

試験機関:

[GLP対応]

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に対する作用

① 雌雄マウスの状態及び体重

供試動物: ICR系マウス, 6週齢, 体重; 雄29.1~34.3g, 雌22.0~27.5g, 一群雌雄各3匹

試験方法: 検体を溶媒(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の用量で腹腔内投与した。行動を投与直前, 投与後1及び6時間, 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, 投与後1, 2, 3及び7日目に測定した。

試験結果: 800mg/kg以上の用量で投与1時間目に極軽微な自発運動の低下がみられた以外に明確な異常状態は認められなかった。

体重には, 雌雄とも検体投与によると思われる明確な変化は認められなかった。

② 雄ラットの状態及び体重

供試動物: Sprague-Dawley系雄ラット, 6週齢, 体重; 232~248g, 一群5匹

試験方法: 検体を溶媒(1%ツィーン80水溶液)に懸濁し, 0(溶媒のみ), 2000及び5000mg/kgの用量で経口投与した。急性毒性状態の有無を投与1日前, 投与後1及び6時間, 1, 2, 3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, 投与後1, 2, 3及び7日目に測定した。

試験結果: 5000mg/kgの用量まで検体投与によると思われる異常状態及び体重変化は認められなかった。

③雄マウスのヘキソバルピ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；29.2～37.6g，一群8匹

試験方法：検体を溶媒(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の用量で腹腔内投与した。睡眠時間は，検体投与1時間後にヘキソバルピタール100mg/kgを皮下投与し，正向反射の消失から回復までの時間を測定した。

試験結果：320mg/kg以上で，用量に依存した睡眠時間の有意な延長が認められた($p \leq 0.05$ 又は 0.01 ，Steelの多重比較検定，最も延長した5000mg/kg群で対照群の約4倍)。128mg/kg群では検体投与によると思われる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；232～248g，一群5匹

試験方法：「②雄ラットの状態及び体重」の動物を用いて，投与1日前，投与後1及び6時間，1，2，3及び7日目の状態観察後に，肛門内約4cmの直腸温を測定した。

試験結果：5000mg/kgの用量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；206～238g，一群5匹

試験方法：検体を溶媒(1%ツィーン80水溶液)に懸濁し，0(溶媒のみ)，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，1，2，3及び7日目に動物を保定箱に収容し，約32°C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。

試験結果：5000mg/kgの用量まで検体投与によると思われる血圧及び心拍数の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；232～248g，一群5匹

試験方法：「②雄ラットの状態及び体重」の動物を用いて，投与1日前，投与後1及び6時間，1，2，3及び7日目の状態観察及び体重測定後，瞳孔径を測定した。

試験結果：5000mg/kgの用量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；26.0～32.3g，一群8匹

試験方法：検体を溶媒(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の用量で腹腔内投与した。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)を容量10mL/kgで経口投与した。動物は炭末懸濁液投与前に約16時間絶食させたが，水は自由に摂取させた。炭末投与30分後に動物を屠殺して小腸を摘出した。小腸基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。

試験結果：5000mg/kgの用量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。

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；232～248g，一群5匹

試験方法：「②雄ラットの状態及び体重」の動物を用いて，投与1日前，投与後1及び6時間，1，2，3及び7日目の状態観察，体温及び瞳孔径を測定後に，握力測定装置のグリッドに四肢を掴ませ，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。

試験結果：5000mg/kgの用量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；204～246g，一群5匹

試験方法：検体を溶媒(1%ツィーン80水溶液)に懸濁し，0(溶媒のみ)，2000及び5000mg/kgの用量で経口投与した。検体投与1日後に，生理食塩液を容量25mL/kg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時間尿を採取し，以下の項目について検査した。

尿量，尿中電解質排泄量(Na, K, Cl濃度)，浸透圧，pH，潜血，蛋白質，ケトン体，グルコース量

試験結果：5000mg/kgの用量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。2000mg/kg群の尿中K排泄量に統計学的に有意な低値がみられたが($p \leq 0.01$ ，Dunnettの多重比較検

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

Boscalid

定), 用量依存性がないことから偶発的なものと考えられた。

以上の結果から, 本剤をマウスに腹腔内投与すると, 320mg/kg以上の用量でヘキソバルビタール睡眠時間の延長がみられたが, 明確な異常状態, 体重及び小腸炭末輸送能の変化は認められなかった。また本剤をラットに経口投与しても, 5000mg/kgの用量まで状態, 体重, 体温, 血圧・心拍数, 瞳孔径, 握力及び腎機能に明確な変化は認められなかった。本剤の急性毒性試験の結果は, 経口, 経皮及び吸入経路による急性毒性が非常に弱いことを示しており, 本試験結果と合わせて考えると, 本剤が散布作業に伴なって摂取されたり, 誤って摂取された場合に急性中毒が発現する可能性は極めて低いと推測される。

生体機能影響試験の総括表

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 状 態 [Irwin法] (雌雄マウス)	腹腔内 (1%ツイーン80 水溶液)	0, 320, 800, 2000, 5000	3	800	320	極軽微な自発運動の低下が観察された。
状 態 (雄ラット)	経 口 (1%ツイーン80 水溶液)	0, 2000, 5000	5	-	5000	検体投与によると思われる異常は認められなかった。
ヘキパルビタル 睡眠時間 (雄マウス)	腹腔内 (1%ツイーン80 水溶液)	0, 128, 320, 800, 2000, 5000	8	320	128	睡眠時間の延長が観察された。
体 温 (雄ラット)	経 口 (1%ツイーン80 水溶液)	0, 2000, 5000	5	-	5000	検体投与によると思われる異常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%ツイーン80 水溶液)	0, 2000, 5000	5	-	5000	検体投与によると思われる異常は認められなかった。
自律神経系 瞳孔径 (雄ラット)	経 口 (1%ツイーン80 水溶液)	0, 2000, 5000	5	-	5000	検体投与によると思われる異常は認められなかった。
消化器 炭末輸送能 (雄マウス)	腹腔内 (1%ツイーン80 水溶液)	0, 128, 320, 800, 2000, 5000	5	-	5000	検体投与によると思われる異常は認められなかった。
骨 格 筋 握 力 (雄ラット)	経 口 (1%ツイーン80 水溶液)	0, 2000, 5000	5	-	5000	検体投与によると思われる異常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, ケン 体, グルコース量 (雄ラット)	経 口 (1%ツイーン80 水溶液)	0, 2000, 5000	5	-	5000	検体投与によると思われる異常は認められなかった。

11) その他

11-1) ラットにおける2週間混餌経口投与による肝酵素誘導試験

(資料 26)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 1999年

検体純度:

供試動物: Wistar系SPFラット[Chbb:THOM], 1群雌雄各8匹 (生化学的検査用5匹, 病理学的検査用3匹), 投与開始時42日齢, 体重: 雄180~199g, 雌134~168g)

投与期間: 14日間(1997年10月29日~1997年11月12日)

試験目的: 本試験は, ラットにおける24カ月間経口慢性毒性試験(資料 14) およびラットにおける発がん性試験(資料15)において2500ppmの用量で観察された肝臓の変化(肥大および好酸性小増殖巣)に関連した酵素誘導能について検査することを目的として実施した。

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

Boscalid

以上の結果から、本剤のラットに対する14日間飼料混入投与による肝薬物代謝酵素誘導試験における影響として、15000ppm投与群において小葉中心帯肝細胞の滑面小胞体の増加を伴う肝重量の増加およびエトキシリゾルフィン及びペントキシリゾルフィンを基質として認識しないチトクロームP450分子種の誘導が認められた。過酸化脂質の増加はGSH量に有意な影響を及ぼすには不十分なチトクロームP450の誘導に対し二次的に酸化ストレスがわずかに増加した結果と推測される。これらの変化は肝細胞の解毒反応を示すもので、検体投与に対する適応性反応と解釈された。

11-2) ラットにおける4週間混餌経口投与による甲状腺ホルモン及び肝薬物代謝酵素誘導試験

(資料 27)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 2001年

検体純度:

供試動物: Wistar系SPFラット [Chbb:THOM], 1群雌雄各5匹, 投与開始時3ヵ月齢,
体重範囲(雄: 394.6~452.2g, 雌: 237.7~257.5g)

投与期間: 28日間(2000年7月3日~2000年7月31日)

試験目的: 本試験は, ラットにおける発がん性試験(資料15)及び慢性毒性試験(資料14)において, 甲状腺濾胞細胞肥大及び過形成を伴う濾胞細胞腺腫の増加傾向が観察されたことから, 一連の生理学的, 毒性学的変化によって認められた甲状腺腫瘍の発現機序が非遺伝毒性的なものであることを確認するために実施した。

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

Boscalid

以上の結果から、本剤のラットに対する4週間飼料混入投与による甲状腺ホルモン及び肝薬物代謝酵素誘導試験における影響として、トリヨードサイロニン(T3)及びサイロキシン(T4)の減少及び甲状腺刺激ホルモン(TSH)の上昇が、投与開始2日後の早い段階から認められた。また、肝酵素抱合を經由したT4の代謝亢進が、TSHの増加やpNP-GT、MUF-GT、HOB1-GT活性の上昇をもたらした。TSHが増加し続けるような検体の用量に甲状腺が慢性的に暴露され、甲状腺腫瘍の発生に連なる一連の変化を生じると考えられた。

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

Boscalid

11-3) ラットにおける4週間混餌経口投与による甲状腺ホルモン及び肝薬物代謝酵素
誘導試験

(資料 27-2)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 2003年

検体純度:

供試動物: Wistar系ラット[CrI:GLX/BrIHan:Wi]、1群雌雄各10匹、投与開始時 56 ± 2 日齢、体重
範囲(雄: 288.4~359.8g、雌: 180.3~243.0g)

なお、各群を雌雄各5匹の2群に分けてA及びB群とし、投与開始時期を2日ずらし
て雌雄別に試験した。

投与期間: 28日間(2003年4月14日~2003年5月21日)

試験目的: 本試験は、ラットにおける発がん性試験(資料15)及び慢性毒性試験(資料14)
において、甲状腺濾胞細胞肥大及び過形成を伴う濾胞細胞腺腫の増加傾向が観察
されたことから、一連の生理学的、毒性学的変化によって認められた甲状腺腫
瘍の発現機序が非遺伝毒性的なものであることを確認するために実施した。

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

Boscalid

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ジャパン株式会社にある。

Boscalid

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ジャパン株式会社にある。

Boscalid

以上の結果から、本剤のラットに対する4週間混餌投与による甲状腺ホルモン及び肝薬物代謝酵素誘導試験における影響として、サイロキシン(T4)の減少及び甲状腺刺激ホルモン(TSH)の上昇がみられ、又肝臓の第I相及びII相酵素活性の亢進がみられ、肝臓及び甲状腺の肥大を伴っていた。

これらの結果から以下のように解釈される。

本剤はラット肝臓のミクロソーム酵素系を活性化し、肝臓重量の増加を伴い、第I相及びII相酵素活性を亢進する。グルクロン酸転移酵素の誘導により、グルクロン酸抱合T4を増加させ、次いで、T4グルクロン酸抱合体として胆汁経路で排泄する。T4の胆汁排泄率の増加は、一般的にT4の投与初期における循環血中T4濃度の低下を惹起する。

本試験において、T4濃度の軽度低下が2000及び5000ppm群雄で投与初期にのみみられた。T4濃度の低下はネガティブフィードバック機構を介して代償反応を誘導し、2000(試験7日)及び5000ppm(試験7及び14日)群雄におけるTSHの有意な増加をきたした。その後も、有意ではないが軽度TSHの増加がこれらの群でみられた。TSH刺激の増加に伴いホルモン分泌が亢進する結果、T4濃度は正常に回復する。これに対して、TSHは投与期間中、高値で保たれる。TSH濃度の変化はグルクロン酸転移酵素の誘導と量的及び質的に同調している。

結論として、ラット雌雄において、本剤の投与は肝ミクロソーム酵素系を活性化し、甲状腺ホルモンの恒常性を軽度に障害した。

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

Boscalid

11-4) ラットにおける4週間混餌投与免疫毒性試験

(資料 38)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年

検体純度 :

試験動物 : Wistar系(Crj:Wistar)ラット, 1群雄16匹

開始時 6週齢

開始時体重範囲 : 188~208 g

投与期間 : 4週間 (2003年4月29日~2003年5月27日)

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

Boscalid

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 ジャパン株式会社にある。

Boscalid

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ジャパン株式会社にある。

Boscalid

以上、本剤を0, 100, 1000及び10000 ppmの濃度で飼料に混入し、1群当たり各16匹の雄ラットに4週間にわたって混餌投与し、免疫毒性を検索した。

体重、摂餌量などの一般的影響では、いずれの投与群においても検体の影響は観察されなかった。胸腺・脾臓重量と細胞数、胸腺と脾臓のリンパ球サブセットの解析成績、抗ヒツジ赤血球免疫グロブリンM抗体価などの免疫系への影響を示す指標には、いずれの投与群においても検体投与の影響は観察されなかった。

一方、陽性対照物質のシクロフォスファミド投与群では免疫学的検査項目の各指標に、明瞭な免疫抑制反応が認められた。

したがって、本剤を0, 100, 1000及び10000 ppmの濃度でラットに4週間にわたって混餌投与し、免疫毒性を検討した結果、胸腺と脾臓のリンパ球サブセットの解析及び免疫グロブリンM抗体価の免疫毒性作用の指標に検体投与の影響は認められなかった。

11-5) ラットにおける発達神経毒性試験

(資料39)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 2001年

検体の純度:

試験動物: Wistar系妊娠ラット (CRL:WI (GLX/BRL/HAN) IGS BR)
妊娠0日 体重範囲154.6~206.9g、1群35匹

投与期間: 交尾後6日から出産後21日まで
[2000年4月23日~2000年6月1日]

投与方法: 検体を少量の飼料に混合してプレミックスを調製し、その後必要量の飼料と混入して100、1000及び10000ppmの濃度に調製し、自由摂取させた。対照群には飼料のみ与えた。

方法及び試験項目: 概要を表1にまとめた。

母動物: 一般状態及び死亡を毎日観察した。営巣、出産及び保育行動を調べた。オープンフィールド観察(OF0)として、1群あたり10匹を抽出して調べた。体重及び摂餌量を測定し、検体摂取量を算出した。

児動物: 生存及び死亡児数、性別の判定、体重測定及び外表異常の観察、OF0、性成熟、自発運動量、聴覚驚愕反応、遊泳/学習/記憶の検査を行った。また、神経病理学的検査を実施した。

児動物は、生後4日に対照群を除き、できるだけ同腹数が雌雄各4匹(計8匹)となるように調整し、各腹から雌雄各1匹を選定してサブセットに割り付けた。対照群を除く児動物が8匹未満の全ての腹の母及び児動物を屠殺・廃棄した。

表A. 児動物試験設計

サブセット	児動物数/群	検査日	試験手順
I	雌雄各10匹	生後11日	灌流固定、脳重量及び神経病理学的検査
II	雌雄各10匹	生後4、11、21、35、45及び60日	オープンフィールド観察
		生後13、17、21及び60 (±2)日	自発運動量
III	雌雄各10匹	生後24及び60日	聴覚性驚愕試験
		生後60 (±2)日	灌流固定、脳重量及び神経病理学的検査
IV	雌雄各10匹	生後21 (±2)日	学習及び記憶試験 (水迷路)
V	雌雄各10匹	生後60 (±2)日	学習及び記憶試験 (水迷路)

表1 観察/検査の概要

世代	期間	作業手順	観察/検査項目
P	交配	雄雌1:1-3で交配。妊娠は膣スミアに精子の有無で確認(妊娠0日)	交配状況の観察 一般状態・生死; 毎日観察
	妊娠		体重; 妊娠0、6、13、20日に測定 一般状態・生死; 毎日観察 OF0; 妊娠7、14日に観察 摂餌量; 妊娠0、6、13、20日に測定
F1	出産	(哺育0日、生後0日) 同腹8匹以上かつ連続3日以内に出生した児動物以外は屠殺廃棄。	出産状況の観察 新生児数、死産児数、外表検査、性別
	哺育期間		母動物: 一般状態・生死; 毎日観察 OF0; 出産後7、14日に観察
	生後4日	1腹の同腹児数を雄4匹、雌4匹に調整。残りはCO ₂ で屠殺・廃棄した。	体重; 出産後1、7、14、21日に測定 摂餌量; 出産後1、7、14日に測定 産児のない雌の子宮の着床痕を調べた。
	生後11日	1群雌雄各10匹を屠殺(SB I)	児動物: 一般状態・生死; 毎日観察 性別; 哺育0、21日に判定 体重; 哺育1、4(調整前)、11、17、21日、 離乳後毎週測定 性成熟; 膣開口、包皮分離 OF0; 生後4、11、21、35、45、60日に観察 (SB II) MA; 生後13、17、21日、60±2日に測定 (SB II)
	離乳	(哺育21日) 母動物を屠殺(頸椎脱臼)	聴覚性驚愕試験; 生後24、60日に実施(SB III) 学習/記憶試験; 生後21±2(SB IV)、60±2日 (SB V)に実施 灌流固定、脳重量、神経病理学的検査; 生後11日(SB I)、生後60±2日(SB III)
	生後60日	児動物の屠殺	SB I、IIIの神経病理学的検査に供した児動物以外は廃棄

OF0: オープンフィールド観察, SB: サブセット, MA: 自発運動量

繁殖、出産及び生存データ；

雌の受胎率(%) = 妊娠雌数^{a)} / 交尾した雌数^{b)} × 100

a) : 児動物を出産した雌数、又は子宮に児動物/胎児のいる雌数

b) : 膣に精子が認められた雌数、又は児動物を出産した雌数、又は子宮に着床根のある雌数

出産率(%) = 出産時に生存児動物のいる雌の数 / 妊娠雌数^{c)} × 100

c) : 児動物を出産した雌数、又は子宮に着床根のある雌数

出生率(%) = 出産日に生存した児動物の数 / 出産した児動物の総数 × 100

生存率(%) = 出産後4日の生存児数(調整前) / 出産日の生存児数 × 100

哺育率(%) = 出産21日の生存児数 / 出産後4日の生存児数(調整後) × 100

性別： 哺育0日目(出産日)に肛門と生殖結節間の距離より性別を判定した。哺育21日目には肛門性器部分の概観及び乳腺間線により性別を判定した。

性比 = 雄または雌の生存数 / 雄及び雌の生存数 × 100 (哺育0または21日)

性的成熟；

膣開口： 選抜した雌児動物について出産27日目から毎日検査し、膣開口の正確な日を記録し、体重を記録した。

包皮分離： 選抜した雄児動物について出産40日目から毎日検査し、包皮分離の正確な日を記録し、体重を測定した。

オープンフィールド観察： 取扱い時の行動、被毛、皮膚、姿勢、流涎、呼吸、活動性/覚醒のレベル、振戦、痙攣、異常動作、歩行異常、流涙、眼瞼閉鎖、眼球突出、糞(外見/堅さ)、尿、瞳孔サイズ

自発運動量(MA)： 自発運動量を測定した。ケージあたり4基の赤外線ビームを5分間継続する12間隔にわたってビームを遮断する回数を測定した。

聴覚性驚愕試験： 120dbの聴覚驚愕試験を5秒間の休止時間を伴う1ブロックあたり10試行を5ブロック実施した。

学習及び記憶試験(水迷路試験)： 水迷路試験を行った。水迷路は以下の3パートで構成した。学習に与えた遊泳の時間は各試行最長6分とした。

学習能力(学習1)： 水迷路のプールにラットを入れてプール右側の脱出路(梯子)を見つけさせ、その時間を計測した。この学習を1時間に6試行を行った。

記憶力： 1週間後に同じラットを再度水迷路の脱出路(右側)を見つけさせた。

再学習能力(学習2)： 記憶力の試験の1時間後に行った。水迷路の左側の脱出路(梯子)を見つけさせた。この学習を1時間に6試行を行った。

肉眼的病理検査： サブセット I 及び III の児動物はNarcorenの深麻酔下で4%中性ホルムアルデヒド溶液での灌流固定により屠殺し、神経病理学的な肉眼的病理検査を行った。

臓器重量測定： 脳(臭球を伴う)を摘出し重量測定を行った。

全脳の測定； 脳長(前頭葉の吻端から小脳の尾延髄に達する線上)
幅(下垂体部)

主要脳領域の測定； 以下組織の厚さを計測した。

新皮質(前頭皮質及び頭頂皮質)、尾状核/被殻、海馬、脳梁、小脳
(脳梁と小脳の除き左右)

神経病理学的検査； 以下の組織について検査した。

サブセット I (生後11日後)	サブセット III (生後60±2日後)
<p>A. パラプラスチック包埋、切片作製、H&E染色</p> <p>脳</p> <p>嗅球、前頭葉、間脳を伴う頭頂葉、 橋、小脳(2面の切片)、延髄</p> <p>脊髄(縦断面及び横断面)</p> <p>頸膨大 I (C1~C3:C1)</p> <p>頸膨大 II (C3~C5:C5)</p> <p>胸膨大 (T5~T8:T8)</p> <p>腰膨大 (L1~L4:L4)</p> <p>脳に付随する臓器/組織</p> <p>網膜及び視神経を伴う眼</p> <p>下垂体、嗅上皮(鼻腔、レベルⅢ)</p> <p>末梢神経系</p> <p>神経を伴うガッサー神経節</p> <p>腓腹筋(縦断面及び横断面)</p> <p>全ての肉眼的病変</p>	<p>A. パラプラスチック包埋、切片作製、H&E染色</p> <p>脳</p> <p>嗅球、前頭葉、間脳を伴う頭頂葉、 橋、小脳(2面の切片)、延髄</p> <p>脊髄(縦断面及び横断面)</p> <p>頸膨大 I (C1~C3:C1)</p> <p>頸膨大 II (C3~C5:C5)</p> <p>胸膨大 (T5~T8:T8)</p> <p>腰膨大 (L1~L4:L4)</p> <p>脳に付随する臓器/組織</p> <p>網膜及び視神経を伴う眼</p> <p>下垂体、嗅上皮(鼻腔、レベルⅢ)</p> <p>末梢神経系</p> <p>神経を伴うガッサー神経節</p> <p>腓腹筋(縦断面及び横断面)</p> <p>全ての肉眼的病変</p> <p>B. 5%グルタルアルデヒド溶液で二次固定、エポキシ樹脂包埋、半薄切片作製、AMB染色</p> <p>末梢神経系</p> <p>後根神経節(C3~C6, L1~L4), 3反復</p> <p>後根線維(C3~C6, L1~L4)</p> <p>前根線維(C3~C6, L1~L4)</p> <p>近位坐骨神経</p> <p>近位脛骨神経(膝)</p> <p>遠位脛骨神経(下肢)</p>

H&E染色； ヘマトキシリン・エオジン染色

AMB染色； アズールⅡ・メチレンブルー・塩基性フクシン染色

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ジャパン株式会社にある。

Boscalid

末梢神経の肉眼的病変部位以外は対照群と高用量群の全例について光学顕微鏡で検査し、評価した。

結果：

母動物：

表1. 母動物の成績

投与量 (ppm)			0	100	1000	10000
動物数/群			35	35	35	35
妊娠動物数(受胎率%) ^{Fi}			28 (80)	30 (86)	30 (86)	33 (94)
死亡雌数			0	0	0	0
一般状態 (匹数)				脱毛(1)	脱毛(2)	脱毛(1)
出産率(%) ^{Fi}			100	100	100	100
死亡胎児のある腹数 ^{Fi}			1	5	0	2
全胚死亡 ^{Fi}			0	0	0	0
児動物(腹当り) ^D			9.4	10.3	9.6	10.3
児動物(総数)			264	310	288	339
死亡児動物(総数) ^{Fi}			1	6	0	2
出生率(%) ^{Fi}			100	98	100	99
性比(雄/雌)			46/54	46.7/53.3	49/51	54/46
体重 ^D [g]	妊娠	0日	[171.6]			
		6日	[193.2]			
		13日	[214.7]			
		20日	[258.4]			
	哺育	1日	[209.0]			
		7日	[232.9]			
		14日	[243.6]			
		21日	[252.0]			
体重増加 ^D [g]	妊娠	0-6日	[21.6]			
		6-13日	[21.6]			
		13-20日	[43.7]			128 ↑
		6-20日	[65.2]			
	哺育	1-7日	[24.1]			
		7-14日	[10.7]			172 ↑
		14-21日	[8.4]			121
		1-21日	[43.2]			80 ↓ 109
摂餌量 [g/動物/日]	妊娠	0-6日 ^D	[17.3]			102
		6-13日 ^D	[19.1]		110 ↑	99
		13-20日 ^D	[19.7]		119 ↑	119 ↑
		6-20日	[19.4]	101	115	109
	哺育	1-7日 ^D	[34.1]			
		7-14日 ^D	[50.8]	94 ↓		94 ↓
		1-14日	[42.4]	95	98	96
		検体	妊娠	6-20日	0	9.6
摂取量 (mg/kg/日)	哺育	1-14日	0	18.3	186	1853.1
		平均	0	14	147	1442
妊娠期間(日) ^D			21.8	21.8	21.6	21.7

D: Dunnet検定(両側), Fi: Fischer正確検定(片側) 有意水準 ↓ ↓ : p ≤ 0.05, ↑ ↓ : p ≤ 0.01

表中の数値は対照群の値を100とした場合の割合(%), 体重、体重増加及び摂餌量の対照群の[]内数値は実数。空欄及び表中の矢印のない数値は有意差なし。

一般状態では投与群に偶発的な脱毛がみられたが、投与に関連した変化はみられなかった。

オープンフィールド観察では、全ての項目で対照群と投与群は同等または孤立発生であり、投与の影響はみられなかった。

体重増加量は中高用量群に有意な変動がみられたが、いずれも用量依存性や継続性はみられず、偶発的なものであった。

受胎率は対照群の80%に対し、投与群は86-94%であり投与による影響はみられなかった。出産率及び出生率はいずれも対照群と投与群で同等であり、投与の影響はみられなかった。

児動物：

表2. 児動物の成績

投与量 (ppm)		0	100	1000	10000	
妊娠・出産雌数 ^{Fi}		28	30	30	33	
児動物(総数)		264	310	288	339	
死亡児動物(総数) ^{Fi}		1	6	0	2	
一般状態		投与に関連した変化なし。				
性比(雄/雌)	0日	46/54	46.7/53.3	49/51	54/46	
	哺育21日	46.9/53.1	48.9/51.1	50/50	52.2/47.8	
死亡児数	哺育 1-4日	4	0	0	2	
	5-21日	0	2	0	2	
生存率児数 (腹当り)	0日	9.4	10.1	9.6	10.2	
	4日(調整前)	7.6	9.1	8.7	10.2	
	4日(調整後)	7.6	7.2	7.1	7.9	
	21日(離乳時)	6.9	6.2	5.7	6.8	
哺育期間 体重 ^D [g]	雄	1日	6.4	6.2	6.3	6.1
		4日 ^a	9.8	9.3	9.0↓	8.4↓
		4日 ^b	9.8	9.3	9.0↓	8.4↓
		11日	21.5	22.6	21.1	19.6↓
		17日	34.4	37.0↑	35.6	32.3↓
		21日	47.1	49.3	48.0	43.6↓
	雌	1日	6.2	5.9	6.0	5.8↓
		4日 ^a	9.6	9.1	8.7↓	8.1↓
		4日 ^b	9.6	9.1	8.7↓	8.1↓
		11日	21.2	22.1	20.5	19.1↓
		17日	33.7	36.0↑	34.4	31.5↓
		21日	45.6	47.6	46.1	42.5↓
哺育期間 体重増加 ^D [g]	雄	1-4日	3.4	3.1	2.7↓	2.3↓
		4-11日	11.8	13.2↑	12.1	11.2
		11-17日	12.9	14.4↑	14.6↑	12.7
		17-21日	12.7	12.3	12.3	11.3↓
		4-21日	37.3	40.0↑	39.0	35.3
	雌	1-4日	3.4	3.1	2.7↓	2.3↓
		4-11日	11.6	13.1↑	11.9	11.0
		11-17日	12.5	13.9↑	13.8↑	12.4
		17-21日	11.9	11.6	11.7	11.0↓
		4-21日	36.0	38.6↑	37.5	34.4
性成熟	雄	包皮分離(日) ^D	43.4	43.0	44.2	43.3
		体重(g) ^D	175.4	177.0	181.0	172.0
	雌	膣開口(日) ^D	32.5	32.2	32.8	32.8
		体重(g) ^D	97.7	96.7	99.3	92.7

^a: 調整前, ^b: 調整後

D: Dunnet検定(両側), Fi: Fischer正確検定(片側), 有意水準 ↓: p≤0.05, ↑↓: p≤0.01

表中の値は実数を示す。矢印のない数値は有意差なし。

腹当りの児動物の出産数、生産児及び死産児数、児動物の死亡ならびに一般状態に投与による影響はみられなかった。

児動物の性比は腹数が少ないこと及び通常の変動範囲を考慮すると、対照群と投与群との間に差はないと考えられた。

臍開口及び包皮分離には対照群と投与群との間に差はみられなかった。

児動物の哺育時の体重において、高用量群に継続的に有意な低下が認められた。体重増加量も有意な低下及び低下傾向がみられた。中用量群においても生後4日目における体重及び生後1-4日の増加量に一過性だが有意な低下が認められた。低用量群にみられた散発的な有意な変化は対照群と比して増加方向であり偶発的なものと考えられた。

離乳後の児動物(サブセットⅡ、Ⅲ、Ⅳ及びⅤ)については、下表のようにサブセットⅡ及びⅤにのみ体重の有意な増加が認められたが、用量関連性もなく偶発的な変動であった。

サブセットⅡ			
性		雄	
投与群 (ppm)		100	1000
体重 (g)	0週	111 ↑	
			10000
サブセットⅤ			
性		雄	
投与群 (ppm)		100	1000
体重 (g)	0週	114 ↑	
	1週	111 ↑	
			10000

統計: Dunnett検定(両側) ↑ ; $p \leq 0.05$

表中の値は対照群を100とした場合の割合 (%)

技術的理由より離乳後の第1週を0週としている。

オープンフィールド検査(サブセットⅡ); いずれの時期及び項目に、対照群と検体投与群との間に差は認められなかった。

自発運動量(サブセットⅡ); 有意差のみられた試験時期を以下の表に示した。用量関連性がなく、単独のインターバルの影響は偶発的と判断した。

性		雄	雌
検査時期		生後13日	生後60日
インターバル		10	11
群 (ppm)	100		
	1000	478 ↑	149 ↑
	10000		

表中の数値は対照群の値を100とした場合の割合 (%)

統計: Kruskal-Wallis+Wilcoxon検定(両側). ↑ ; $p \leq 0.05$, $\uparrow \leq 0.01$

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ジャパン株式会社にある。

Boscalid

聴覚性驚愕試験(サブセットⅢ)： 有意差のみられた試験時期を次表に示した。用量関連性がなく、影響は偶発的と判断した。

性		雄		雌
検査時期		生後24日		生後60日
ブロック		1	1-5	2
群 (ppm)	100	68 ↓	77 ↓	62 ↓
	1000	74 ↓		76 ↓
	10000		80 ↓	

表中の数値は対照群の値を100とした場合の割合(%)

統計： Kruskal-Wallis+Wilcoxon検定(両側)， ↓ ; $p \leq 0.05$ ， ↓ ↓ ; $p \leq 0.01$

学習及び記憶試験(水迷路；サブセットⅣ及びⅤ)： 生後21日の雌のみにみられた有意な低下は用量関連性がないことから偶発的と判断した。

性		雌		
検査時期		生後21日(サブセットⅣ)		
項目		学習1 ^{Wi}	記憶 ^{Fi}	学習2 ^{Wi}
群(ppm)	動物数			
0	10	3.2	7	2.3
100	10	3.6	6	2.3
1000	10	3.5	8	1.2 ↓
10000	10	3.1	8	2.3

学習：1時間内に6回試行。制限時間は各6分。脱出口を見つけられた回数の群平均値。

記憶：1回試行。学習1と同じ脱出口を見つけられた例数。

学習2では学習1と逆に脱出口を設置した。

統計検定： W_i = Wilcoxon検定(片側) ↓ ; $p \leq 0.05$

F_i = Fisher's正確検定(片側)

神経病理学的検査(サブセットⅠ及びⅢ)：

脳重量： 有意な変動は生後11日後のみにみられ60日後ではみられなかった。

検査時期		生後11日							
性		雄				雌			
群(ppm)		0	100	1000	10000	0	100	1000	10000
体重		21.77g			91 ↓	20.92g	108 ↑		91 ↓
脳重量	絶対	1.299g			94 ↓	1.267g			93 ↓
	対体重	5.997%				6.07%	90 ↓	94 ↓	

表中の対照群の数値は実数。投与群の数値は対照群の値を100とした場合の割合(%)

統計検定： Kruskal-wallis + Wilcoxon検定(両側) ↓ ; $p \leq 0.05$ ， ↓ ↓ ; $p \leq 0.01$

肉眼的病理所見： 11及び60日後ともに検体投与に関連した肉眼的病変はみられなかった。

病理組織学的検査： 生後11日の検査では所見はみられなかった。60日後の検査において、以下の神経病理学的所見が認められたが、軽微または対照群と同等の発生頻度よ

り投与による影響ではないと判断した。

検査時期		生後60日							
性		雄				雌			
群 (ppm)		0	100	1000	10000	0	100	1000	10000
所見	検査動物数	10	0	0	10	10	0	0	10
腰部前根	軸策変性								1
近位坐骨神経	軸策変性	3			3	4			2
近位脛骨神経	軸作変性	1			1	2			1
遠位脛骨神経	軸策変性	1				2			

形態学的パラメーター： 脳長、脳幅、海馬の厚さに以下の表に示す統計学的有意な変化が認められた。新皮質(前頭皮質及び頭頂皮質)、尾状核/被殻、脳梁、小脳に投与による変化は認められなかった。

生後11日									
性		雄				雌			
群 (ppm)		0	100	1000	10000	0	100	1000	10000
	検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10
	脳長 (cm)	1.711			97 ↓				
	海馬の厚さ (μm)					1207			92 ↓

生後60日									
性		雄				雌			
群 (ppm)		0	100	1000	10000	0	100	1000	10000
	検査動物数	10	10	10	10	10	110	10	10
	脳幅 (cm)					1.522			99 ↓

表中の対照群の数値は実数。投与群の数値は対照群の値を100とした場合の割合(%)

統計検定： Wilcoxon検定(片側) ↓ ; p ≤ 0.05

脳重量及び形態学的変化については、生後11日の検査において体重とともに脳絶対重量の有意な低下が高用量群に認められた。生後60日後でも低下傾向がみられ、投与の影響と考えられた。脳長の有意な低下は重量低下に関連するものと考えられる。海馬の厚さの変化は脳の片側で雌のみであり、病理組織学的変化がみられないこと、主要脳領域の発達に選択的な影響がみられないことから、生物学的関連性は低いと考えられた。生後60日における検査で雌の高用量群にわずかに有意な脳幅の低下がみられたが、病理学的所見はなく、生物学的関連性はないと思われた。

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

Boscalid

以上、本試験の結果、母動物には検体投与による毒性影響及び繁殖への影響は認められなかった。

児動物に対しては、検体の影響として、高用量群(10000ppm)において、雌雄の平均体重及び体重増加量の低下(哺育時)、神経病理学的検査における生後11日の体重低下、絶対脳重量の低下及び脳長低値が認められた。中用量群(1000ppm)では哺育時に生後4日目の雌雄の平均体重及び生後1-4日目の体重増加量の一過性の低下が認められた。低用量群へは影響はみられなかった。

本試験における無毒性量(NOEL)は母動物で10000ppm(1442mg/kg/日)、児動物で100ppm(14mg/kg/日)であった。なお、児動物には最高用量においても発達神経毒性の徴候はみられなかった。発達神経毒性に関するNOELは10000ppm(1442mg/kg/日)であった。

2. 原体混在物及び代謝物を用いた毒性試験

() のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 35)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 : 2001 年

検体の純度 :

供試動物 : Wistar ラット Cri: WI (GLX/BRL/HAN) IGS BR,
若齢成獣 (雄 8-12 週齢, 雌 14-18 週齢)
体重 : 雌 197~203 g, 雄 205~218 g, 一群 3 匹

観察期間 : 14 日間観察

投与方法 : 検体をオリーブ油に懸濁して経口投与した。投与前に 16 時間絶食した。

観察・検査項目 : 中毒症状及び生死を 14 日間観察した。投与日, 投与後 7 日および 13 日に体重を測定した。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った。

結 果 :

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雌雄 : 2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌雄とも 2000 以上
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現時間及び消失時間	なし
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	2000

死亡は認められなかった。

観察期間中, 毒性を示すような臨床症状も認められなかった。

剖検では, 雌雄いずれの動物にも異常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 BASF ジャパン株式会社にある。

Boscalid

()の細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料 36)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 : 2000 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* 4 株 (TA100, TA1535, TA98, TA1537) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2uvrA 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, Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体は水に難溶であるため DMSO に溶解した。実験 1 はプレート法を用いて 20 ~ 5000 μg /プレートの範囲の 5 濃度で, 実験 2 はプレインキュベーション法を用いて 4 ~ 2000 μg /プレートの範囲の 5 濃度で, 各用量 3 枚のプレートで試験した。

陽性対照試験及び溶媒対照試験も同時に実施した。37°C で 48 ~ 72 時間培養後, 復帰変異コロニーを計数した。

用量設定根拠 :

結果 : 結果を次頁以降の表に示した。

検体は S9 mix の有無にかかわらず, いずれの菌株, いずれの試験法においても溶媒対照に比べて復帰変異コロニー数の増加を起さなかった。

なお, 500 μg /プレート以上の用量で検体の析出が認められた。2000 または 2500 μg /プレート以上の用量で復帰変異コロニー数に軽度の減少が認められたものもあった。

一方, 陽性対照群として用いた MNNG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン)、4-NQO (4-ニトロキノリン-N-オキシド)、NOPD (4-ニトロ-o-フェニレンジアミン)、AAC (9-アミノアクリジン) 及び 2-AA (2-アミノアントラセン) では S9 mix 非存在下及び存在下ともすべての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より, 本試験条件下における本検体の細菌に対する突然変異誘発性は陰性であると結論された。

表-1 復帰突然変異試験成績 (実験 1, プレート法)

薬 剤	濃 度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9 mix の有 無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2uvrA	TA100	TA1535	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	0	-	31	109	17	33	11
検 体	20	-	35	105	16	32	10
	100	-	33	99	16	30	8
	500	-	31 ^P	99 ^P	17 ^P	28 ^P	7 ^P
	2500	-	26 ^P	96 ^P	13 ^P	21 ^P	5 ^P
	5000	-	28 ^P	90 ^P	11 ^P	18 ^P	5 ^P
陽性対照物質							
MNNG	5.0	-	NT	675	838	NT	NT
AAC	100	-	NT	NT	NT	NT	522
NOPD	10	-	NT	NT	NT	513	NT
4-NQO	5.0	-	546	NT	NT	NT	NT
溶媒対照 (DMSO)	0	+	41	111	18	47	10
検 体	20	+	36	106	15	46	13
	100	+	31	120	15	37	10
	500	+	39 ^P	95 ^P	15 ^P	41 ^P	6 ^P
	2500	+	37 ^P	93 ^P	10 ^P	27 ^P	6 ^P
	5000	+	32 ^P	96 ^P	11 ^P	23 ^P	4 ^P
陽性対照物質							
2-AA	2.5	+	NT	571	164	860	88
	60	+	234	NT	NT	NT	NT

数値は 3 枚のプレートの平均値。^P: 被験物質の析出を認める

NT: 試験を行っていない

MNNG: N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

4-NQO: 4-ニトロキノリン-N-オキシド

NOPD: 4-ニトロ-o-フェニレンジアミン

AAC: 9-アミノアクリジン

2-AA: 2-アミノアントラセン

表-2 復帰突然変異試験成績 (実験 2, プレインキューベーション法)

薬 剤	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9 mix の有 無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2uvrA	TA100	TA1535	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	0	-	36	104	18	32	10
検 体	4	-	36	106	17	33	9
	20	-	36	105	16	26	9
	100	-	36	102	14	23	8
	500	-	35 ^P	96 ^P	13 ^P	26 ^P	7 ^P
	2000	-	33 ^P	91 ^P	11 ^P	17 ^P	5 ^P
陽性対照物質							
MNNG	5.0	-	NT	836	701	NT	NT
AAC	100	-	NT	NT	NT	NT	365
NOPD	10	-	NT	NT	NT	793	NT
4-NQO	5.0	-	579	NT	NT	NT	NT
溶媒対照 (DMSO)	0	+	27	105	18	35	9
検 体	4	+	23	108	18	34	10
	20	+	21	105	14	32	9
	100	+	20	107	13	24	11
	500	+	21 ^P	101 ^P	14 ^P	25 ^P	6 ^P
	2000	+	21 ^P	88 ^P	11 ^P	23 ^P	6 ^P
陽性対照物質							
2-AA	2.5	+	NT	530	150	541	97
	60	+	229	NT	NT	NT	NT

数値は 3 枚のプレートの平均値, ^P: 被験物質の析出を認める

NT: 試験を行っていない

MNNG: N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

4-NQO: 4-ニトロキノリン-N-オキシド

NOPD: 4-ニトロ-o-フェニレンジアミン

AAC: 9-アミノアクリジン

2-AA: 2-アミノアントラセン

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

Boscalid

() の細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料 37)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 : 2001 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* 4 株 (TA100, TA1535, TA98, TA1537) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2uvrA 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, Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。
検体は水に難溶であるため DMSO に溶解した。実験 1 はプレート法を用いて 20 ~ 5000 μ g/プレートの範囲の 5 濃度で, 実験 2 はプレインキュベーション法を用いて 4 ~ 2500 μ g/プレートの範囲の 5 濃度で, 各用量 3 枚のプレートで試験した。

陽性対照試験及び溶媒対照試験も同時に実施した。37°C で 48 ~ 72 時間培養後, 復帰変異コロニーを計数した。

用量設定根拠 :

結果 : 結果を次頁以降の表に示した。

検体は S9 mix の有無にかかわらず, いずれの菌株, いずれの試験法においても溶媒対照に比べて復帰変異コロニー数の増加を起さなかった。

なお, 100 μ g/プレート以上の用量で検体の析出が認められた。いくつかの菌株においてプレート法では 2500 μ g/プレート以上の用量で, プレインキュベーション法では 500 μ g/プレート以上の用量で軽度の抗菌性が観察された。

一方, 陽性対照群として用いた MNNG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン)、4-NQO (4-ニトロキノリン-N-オキシド)、NOPD (4-ニトロ-o-フェニレンジアミン)、AAG (9-アミノアクリジン) 及び 2-AA (2-アミノアントラセン) では S9 mix 非存在下及び存在下ともすべての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より, 本試験条件下における本検体の細菌に対する突然変異誘発性は陰性であると結論された。

表-1 復帰突然変異試験成績 (実験 1, プレート法)

薬 剤	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9 mix の 有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2uvrA	TA100	TA1535	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	0	-	27	104	16	24	10
検 体	20	-	28	99	16	18	9
	100	-	24 ^P	102 ^P	15 ^P	27 ^P	9 ^P
	500	-	20 ^P	95 ^P	17 ^P	22 ^P	8 ^P
	2500	-	19 ^P	82 ^P	12 ^P	20 ^P	7 ^P
	5000	-	15 ^P	56 ^P	9 ^P	18 ^P	5 ^P
陽性対照物 質	5.0	-	NT	613	551	NT	NT
MNNG	100	-	NT	NT	NT	NT	449
AAC	10	-	NT	NT	NT	856	NT
NOPD	5.0	-	512	NT	NT	NT	NT
4-NQO							
溶媒対照 (DMSO)	0	+	33	106	18	34	11
検 体	20	+	34	106	16	27	11
	100	+	30 ^P	109 ^P	15 ^P	20 ^P	8 ^P
	500	+	31 ^P	96 ^P	12 ^P	19 ^P	7 ^P
	2500	+	26 ^P	78 ^P	12 ^P	19 ^P	6 ^P
	5000	+	26 ^P	57 ^P	9 ^P	15 ^P	5 ^P
陽性対照物 質	2.5	+	NT	883	153	602	124
2-AA	60	+	212	NT	NT	NT	NT

数値は 3 枚のプレートの平均値, ^P: 被験物質の析出を認める

NT: 試験を行っていない

MNNG: N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

4-NQO: 4-ニトロキノリン-N-オキシド

NOPD: 4-ニトロ-o-フェニレンジアミン

AAC: 9-アミノアクリジン

2-AA: 2-アミノアントラセン

表-2 復帰突然変異試験成績 (実験 2, プレインキューベーション法)

薬 剤	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9 mix の有 無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2uvrA	TA100	TA153 5	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	0	-	28	106	19	26	11
検 体	4	-	29	101	16	25	8
	20	-	27	92	15	24	10
	100	-	24 ^P	96 ^P	11 ^P	23 ^P	5 ^P
	500	-	23 ^P	100 ^P	12 ^P	19 ^P	6 ^P
	2500	-	17 ^P	88 ^P	7 ^P	18 ^P	6 ^P
陽性対照物質							
MNNG	5.0	-	NT	1029	1019	NT	NT
AAC	100	-	NT	NT	NT	NT	506
NOPD	10	-	NT	NT	NT	690	NT
4-NQO	5.0	-	567	NT	NT	NT	NT
溶媒対照 (DMSO)	0	+	30	105	17	33	12
検 体	4	+	26	101	17	29	9
	20	+	21	96	14	32	9
	100	+	26 ^P	95 ^P	14 ^P	25 ^P	7 ^P
	500	+	22 ^P	90 ^P	9 ^P	27 ^P	6 ^P
	2500	+	20 ^P	77 ^P	8 ^P	22 ^P	5 ^P
陽性対照物質							
2-AA	2.5	+	NT	526	112	618	118
	60	+	280	NT	NT	NT	NT

数値は 3 枚のプレートの平均値, ^P: 被験物質の析出を認める

NT: 試験を行っていない

MNNG: N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

4-NQO: 4-ニトロキノリン-N-オキシド

NOPD: 4-ニトロ-o-フェニレンジアミン

AAC: 9-アミノアクリジン

2-AA: 2-アミノアントラセン

3. 製剤を用いた毒性試験

1) 急性毒性試験

1-1) 水和剤のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 28)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：2001年

検体純度：50.0%ドライフロアブル〔組成〕有効成分；
分散剤等；

試験動物：ウイスター系ラット，雄 8～12 週齢/雌 14～18 週齢，体重：雄 176～186g/雌
159～163g，1 群雌雄各 3 匹

試験期間：14 日間観察

試験方法：検体を蒸留水に懸濁して単回強制経口投与した。投与前に 16 時間絶食させた。

試験項目：中毒症状及び生死を 14 日間観察した。体重は投与直前(0 日)，その後は 7 及び
10 日後(雄)及び 13 日後(雌)に測定した。全動物について、肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ (mg/kg)	>2000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び消失時間	雌雄とも投与直後から発現 雌は投与後 5 時間，雄は 1 日までに消失
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2000

中毒症状として、一般状態の悪化，呼吸困難，鎮静，よろめき歩行，立毛及び過敏反応(雄)又は攣縮(雌)が認められた。

体重及び剖検所見に特記すべき変化は認められなかった。

1-2) 水和剤のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料 29)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 2000年

検体純度: 50.0%ドライフロアブル〔組成〕有効成分;
分散剤等;

試験動物: ICR系マウス, 5週齢, 体重: 雄 25~30g, 雌 20~25g, 1群雌雄各5匹

試験期間: 14日間観察

試験方法: 検体を脱イオン水に懸濁して単回強制経口投与した。投与前2~3時間及び投与後3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。体重は投与直前(0日), その後は7及び14日後に測定した。全動物について, 肉眼的病理検査を行った。

試験結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	5000
LD ₅₀ (mg/kg)	>5000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び消失時間	雌雄とも投与後6時間に発現 雌雄とも投与後1日に消失
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5000

肛門周囲部被毛の汚染が雌雄とも観察されたが, 投与1日後には消失した。

体重及び剖検所見に特記すべき変化は認められなかった。

1-3) 水和剤のラットにおける急性経皮毒性試験

(資料 30)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：2001年

検体純度：50.0%ドライフロアブル〔組成〕有効成分；
分散剤等；

試験動物：ウイスター系ラット，雄 8~12 週齢/雌 14~18 週齢，体重：雄 244~250g/雌 211~220g，1 群雌雄各 5 匹

試験期間：14 日間観察

試験方法：検体を蒸留水に懸濁し，刈毛した背部/背側部に 24 時間半閉塞貼付した。被覆除去後，適用部位を温水で洗浄した。

試験項目：中毒症状，適用部位の異常及び生死を 14 日間観察した。体重は試験開始時，投与 7 及び 13 日後に測定した。全動物について，肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ (mg/kg)	>2000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び消失時間	雄：症状を認めず
	雌：適用 7 日後
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	2000

中毒症状は，雌雄全例とも認められなかった。

局所所見は雄では観察されなかったが，雌ではごく軽度又は明瞭な紅斑が各 1 例，湿疹が 1 例に観察された。

体重及び剖検所見に特記すべき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 BASF ジャパン株式会社にある。

Boscalid

1-4) 水和剤のラットにおける粉塵ダストによる急性吸入毒性試験

(資料 31)

試験期間:

[GLP対応]

報告書作成年: 2000年

検体純度: 50%ドライフロアブル [組成] 有効成分;
分散剤等;

試験動物: Wistar系ラット, 1雌雄各5匹, 試験開始時 雄8~16週齢/雌9~16週齢,
雄体重 204.6~213.8g/雌体重 156.7~173.3g

試験期間: 15日間観察

試験方法: 検体をそのままミキサーで粉砕し, 検体のダストを発生させ, 4時間鼻部暴露させた。

暴露空気をガラス繊維捕集板を用いて捕集し, 重量測定法により実測濃度を求めた。

暴露条件:

	測定1	測定2
実測濃度 (mg/L)	5.2	5.2
名目濃度 (mg/L)	68.1	
粒子径分布 (%) : 29.5 (μm)*	16.9	18.5
18.2	5.0	5.6
8.5	7.8	6.1
5.5	8.0	5.4
2.8	24.5	24.0
1.2	20.0	23.3
<1.2	17.8	17.0
空気力学的質量粒子径 (μm)	4.5	4.5
呼吸可能な粒子 (<3 μm) の割合 (%)	41	41
チャンパー容積 (L)	55	
チャンパー内通気量 ($\text{m}^3/\text{時}$)	1.5	
暴露条件	ダスト4時間鼻部暴露	

*空気力学的有効切断等価径 (EACD, μm)

試験項目: 暴露直前, 暴露後7日及び15日に, 臨床症状及び生死について観察し, 体重測定を行った。全動物について肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	吸 入
暴露濃度 (mg/L)	5.2
LC ₅₀ (mg/L) (99%信頼限界)	雌雄 > 5.2
死亡開始及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び消失時間	症状発現：暴露終了後 症状消失：暴露後1日
死亡の認められなかった 最高暴露濃度 (mg/L)	雌雄とも 5.2

臨床症状として、呼吸亢進、立毛、被毛の汚染が雌雄の全例に観察されたが、体重増加量に影響は認められなかった。

肉眼的病理検査において、雌雄何れにも特記すべき異常所見は認められなかった。

2) 皮膚及び眼に対する刺激性試験

2-1) 水和剤のウサギを用いた皮膚刺激性試験

(資料 32)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 2001年

検体純度: 50.0%ドライフロアブル〔組成〕 有効成分;
分散剤等;

試験動物: ニュージーランドホワイト種ウサギ, 約 6 ヶ月齢, 体重: 雌 3.55~4.00kg,
雌 3 匹

試験期間: 72 時間観察

試験方法: 検体 0.5g を刈毛した動物の背部の上部 3 分の 1 の皮膚(約 2.5cm 四方)に 4 時間, 半閉鎖貼付した。貼付終了後, 皮膚に残った検体は Lutrol 及び Lutrol/水(1:1) で洗浄した。

試験項目: 試験パッチ除去 1, 24, 48, 72 時間後に貼付部位の刺激性変化(紅斑, 痂皮形成及び浮腫)の有無等を観察し, OECD ガイドライン 404, 農林水産省のガイドライン等に従って採点した。なお, 刺激性変化の採点基準は以下のとおりである。

紅斑及び痂皮形成:

- 0: 紅斑なし
- 1: 非常に軽度の紅斑(かろうじて識別できる)
- 2: はっきりした紅斑
- 3: 中等度~重度の紅斑
- 4: 重度の紅斑(ビート赤色)~紅斑の採点不能になる痂皮形成まで

浮腫形成:

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

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 ジャパン株式会社にある。

Boscalid

試験結果：観察した刺激性変化の採点は以下のとおりであった。

なお、3匹の平均値の計算は1993年4月27日の93/21/EECの基準に従い、平均値は24、48、72時間の採点に基づき算出した。

変 化	最高 評点	貼付開始後時間					採点の最高値
		1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	総平均	
紅 斑	4	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1 (1 時間後)
浮 腫	4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
合 計	8	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
症 状		認めず					

24～72 時間における紅斑及び浮腫の平均値は 0.0 であった。全動物に症状は観察されなかった。

以上の結果から、検体はウサギの皮膚に対し刺激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 BASF ジャパン株式会社にある。

Boscalid

2-2) 水和剤のウサギを用いた眼刺激性試験

(資料 33)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 2001年

検体純度: 50.0%ドライフロアブル〔組成〕 有効成分;
分散剤等;

試験動物: ニュージーランドホワイト種ウサギ, 約4ヵ月齢, 体重: 3.10kg, 雌 2.67~3.48kg,
雄 1匹, 雌 2匹

試験期間: 72時間観察

試験方法: 検体約37mgを右眼瞼の結膜嚢に1回適用し, 左眼を無処理対照とした。適用した検体は適用24時間後(評点前)に水で洗い落とした。

試験項目: 投与1, 24, 48, 72時間後に角膜, 結膜及び虹彩の刺激性変化を観察し, OECDガイドライン405及び農林水産省のガイドライン等に従って採点した。なお, 採点基準は以下のとおりである。

角 膜

混濁—混濁の程度(最も濃い部分で判定する)

- 0; 潰瘍又は混濁を認めない
- 1; 散在性又は瀰漫性の混濁(通常の光沢をもった軽度の曇りとは異なる), 虹彩の細部は明瞭に透視可能
- 2; 透明な部分は残っているが, 虹彩の全体がやや不明瞭
- 3; 真珠様光沢部位あり, 虹彩の細部不明で瞳孔の大きさがかろうじて識別できる
- 4; 角膜不透明, 混濁部を通して虹彩が透視できない

角膜損傷域

- 1; $>0 \sim \leq 1/4$
- 2; $>1/4 \sim <1/2$
- 3; $>1/2 \sim <3/4$
- 4; $>3/4$

虹 彩

- 0; 正常
- 1; 明瞭な深いひだ, 充血, 腫張, 中等度角膜周囲の充血(これらのいずれか, 又は組み合わせ), 虹彩は光にまだ反応する(反応は遅く鈍い)
- 2; 対光反射消失, 出血, 著しい組織崩壊(これらのいずれか, 又は全て)

結 膜

発 赤 (眼瞼及び眼球結膜, 角膜及び虹彩)

- 0; 血管正常
- 1; 一部の血管が明らかに充血
- 2; 瀰漫性の深紅色, 個々の血管は見分けられない
- 3; 瀰漫性の牛肉容赤色

結膜浮腫 (眼瞼及び瞬膜)

- 0; 腫脹なし
- 1; 正常を超える腫脹 (瞬膜を含む)
- 2; 眼瞼の外反を伴う明らかな腫張
- 3; 眼瞼の 1/2 未満の閉鎖を伴う腫脹
- 4; 眼瞼の 1/2 以上の閉鎖を伴う腫脹

分 泌 物

- 0; 分泌物認めず
- 1; 常量以上 (正常動物の内眦に見られる少量は含まない)
- 2; 眼瞼及び眼瞼に接する被毛を湿潤
- 3; 眼瞼及び眼瞼周囲の相当範囲を湿潤

試験結果: 観察した刺激性変化の採点は以下のとおりであった。なお, 6 匹の平均値の計算は 1993 年 4 月 27 日の EEC の基準 93/21 に従い, 平均値は 24, 48, 72 時間の採点に基づき算出した。

項 目	最高 評点	適用後経過時間				総平均
		1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	
角膜混濁	程 度	4	0.0	0.0	0.0	0.0
	面 積	4	0.0	0.0	0.0	0.0
虹 彩	2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
結 膜	発 赤	3	1.3	1.3	0.7	0.7
	浮 腫	4	1.3	0.3	0.0	0.1
	分泌物	3	1.0	0.0	0.0	0.0
合 計*	110	7.3	4.7	1.3	0.0	
症 状		認めず				

*合計評点は「レイズ」法に基づき申請者が計算した。

24~72 時間における角膜及び虹彩についての平均はいずれも 0.0 で, 結膜の発赤については 0.7, 同浮腫については 0.1, 同分泌物では 0.0 あった。全動物に症状は観察されなかった。

以上の結果から, EEC の基準 93/21 に従い, 検体はウサギの眼粘膜に対して刺激性はないと判断された。

3) 皮膚感作性試験

水和剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験

(資料 34)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：2001年

検体純度：50.0%ドライフロアブル〔組成〕有効成分；
分散剤等；

試験動物：Hartley系モルモット雌，約7週齢，体重341~409g，対照群10匹，
試験群20匹

試験期間：48時間観察

試験方法：[Buehler 改変法；9回感作]

用量設定：

経皮感作；検体の50%蒸留水懸濁液0.5mLを腹側部皮膚に6時間閉鎖貼付して経皮感作を実施した。1週間に3回(同じ部位に0~2日，7~9日，14~16日)，合計9回の感作を行った。担体に使用した蒸留水は試験の結果に影響しないと考えたことから，対照群の動物には処理しなかった。

惹起；9回目の感作後13日に検体の25%蒸留水懸濁液0.5mLを試験群及び対照群の動物の刈毛した右腹側部皮膚に6時間閉鎖貼付した。

陽性対照；同時に並行して陽性対照群は設けなかった。感作性既知の陽性対照物質 alpha-hexylcinnamaldehyde 85%原体を用い，本試験の約11ヶ月前に実施した結果を示した。

観察：

惹起のためのパッチ除去後24及び48時間に，適用部位の皮膚反応を肉眼的に観察し，Magnusson及びKligmanの基準*に従って以下のように判定した。

- 0；反応を認めず
- 1；散在性あるいは斑状の紅斑
- 2；中等度瀰漫性紅斑
- 3；強い紅斑及び浮腫

この基準に合わない「腫張(E)」及び「鱗屑(S)」についても確認した。

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

Boscalid

試験結果：9回の経皮感作で試験群の動物に観察された皮膚反応は以下のとおりであった。

感 作	20例中の皮膚反応
1回目	2例に散在性あるいは斑状の紅斑
2回目	10例に散在性あるいは斑状の紅斑
3回目	3例に散在性あるいは斑状の紅斑
4回目	7例に散在性あるいは斑状の紅斑
5, 6回目	12例に散在性あるいは斑状の紅斑
7回目	5例に散在性あるいは斑状の紅斑, 1例に鱗屑
8回目	8例に散在性あるいは斑状の紅斑
9回目	8例に散在性あるいは斑状の紅斑, 2例に中等度瀰漫性紅斑, 及び1例に腫張

惹起反応を次表に示した。

表 1. 検体の試験結果

	感作	惹起	供試動物数	感作反応動物数						陽性動物数
				24時間			48時間			
				皮膚反応		計	皮膚反応		計	
				なし	あり		なし	あり		
試験群	検体 50%	検体 25%	20	20	0	20	20	0	20	0/20
対照群	—*	検体 25%	10	10	0	10	10	0	10	0/10

注. * 溶媒として蒸留水を使用したため、対照群動物の感作では何も処理しなかった。

表 2. 陽性対照の試験結果

	群	供試動物数	感作反応動物数						陽性動物数
			24時間			48時間			
			皮膚反応		計	皮膚反応		計	
			なし	あり		なし	あり		
惹起	陽性対照	20	15	5	5/20	19	1	1/20	5/20
	溶媒対照	10	10		0/10	10		0/10	0/10
再惹起	陽性対照	20	4	16	16/20	6	14	14/20	16/20
	溶媒対照	10	10		0/10	10		0/10	0/10

注. 陽性対照：alpha-hexylcinnamaldehyde 85%原体の感作は25%、惹起及び再惹起はそれぞれ10%及び15% Lutrol E400 溶液 溶媒対照：Lutrol E400 溶液

惹起においては対照群及び試験群の動物とも皮膚反応は認められなかった。

従って、検体は9回感作による Buehler 改変法において、皮膚感作性は陰性と判断された。

Ⅹ. 動植物及び土壌等における代謝分解

<代謝分解試験一覧表>

資料 No.	試験の種類	供試動物・植物・土壌等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁
代謝・分解 1 (GLP)	動物体内における動態試験	ラット 雌雄	<p>及び を標識体をラット雌雄に50mg/kg, 500mg/kgの用量で以下のように単回または反復 (非標識体14回+標識体単回) 経口投与し、最長168時間で屠殺し、液体シフレーションにより分析した。</p> <p>：高・低用量；排泄・分布 (168h) (複数時点屠殺：～24h又は35h) ：高用量；排泄・分布 (168h) 高用量反復；排泄・分布 (120h) ：高・低用量；血漿・血中濃度 (～120h) ：高・低用量；胆汁排泄 (～48h)</p>	<p>排泄： 単回投与；呼気中への排泄はみられなかった。性、用量に係わりなく、排泄は急速で、48時間後に90%以上、168時間では94%以上が排泄された。主要排泄経路は糞であった。体組織からは0.02～0.04%が回収された。 反復投与；雌雄とも120時間までに98%以上が排泄され、糞中へは95%以上であった。 血漿・血中濃度： 血漿中では、高・低用量、雌雄ともに2峰性を示し、最初のピークは投与後0.5～1時間、第2ピークは8時間後であり、その後は2相性の消失を示した。血中も同様な推移を示したが24時間までは血漿中の方が高濃度であった。 体内分布： 組織中濃度は経時的に血漿中濃度と似た速度で低下し蓄積はみられなかった。消化管内容物・屍体を除けば高用量で肝、脂肪組織、甲状腺、腎、卵巣中で高濃度で、168時間後では甲状腺、骨髄、肝中で高濃度であった。低用量もほぼ同等であった。反復投与による差はみられなかった。 胆汁排泄： 48時間で、高用量で11～12%が、低用量で39～40%が胆汁中に排泄され、検体の吸収率は高用量で14～16%、低用量で約55%と推定された。</p>	(2000年)	代16
代謝・分解 2 (GLP)	動物体内における代謝試験	ラット 雌雄	<p>上記代謝・分解1の試験で得た尿、糞、胆汁中、また新たに50、mg/kgを経口投与して血漿、肝、腎中の代謝物を液体シフレーション、HPLC、LC-MS、LC-MS/MSで同定、定量した。</p>	<p>投与量の0.01%以上の代謝物がすべて同定され、その合計は未変化体を含めて82%以上であった。 糞中代謝物：親化合物が主成分であり、30～85%を占めていた。数種の代謝物が同定されたが、主成分は であり、それぞれ最大で約 であった。 尿中代謝物：数種の代謝物が同定されたが、主成分は であり、それぞれ最大で であった。 胆汁中代謝物：数種の代謝物が同定されたが、主成分は であり、それぞれ最大で であった。 肝中代謝物：親化合物含めて数種の代謝物が同定されたが、主成分は であり、それぞれ最大で であった。 腎中代謝物：親化合物含めて数種の代謝物が同定されたが、主成分は雄で 、雌で であり、それぞれ最大で であった。 血漿中代謝物：親化合物を含めて数種の代謝物が同定されたが、いずれも %未満であった。 腎中代謝物：親化合物含めて数種の代謝物が同定されたが、主成分は雄で 、雌で であり、それぞれ最大で であった。 主要代謝経路は、 であり、 尿や胆汁を介しての糞中排泄であった。</p>	(2001年)	代25

資料 No.	試験の種類	供試動物・植物・土壌等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁
代謝・分解 14 (GLP)	動物体内における動態試験	ラット 雌雄	標識体をラット雌雄に 500mg/kg の用量で単回 (賦形剤 14回+標識体単回) または反復 (非標識体 14回又は 28回+標識体単回) 強制経口投与し、48 時間後に屠殺するまでの尿及び糞を採取し、液シフレーションカウンターで放射能を測定し、HPLC、LC-MS 及び LC-MS/MS で代謝物を分析同定した。	尿中代謝物：投与放射能に対し、雄で 7.81-9.23%、雌で 13.12- 16.39% が同定された。主代謝物は (雄： %、雌： %) 及び (雄： %、雌： %) であり、この他に (雄： %、雌： %) が同定された。 糞中代謝物：投与放射能に対し、雄で %、雌で % が同定された。主なものは親化合物 (雄： 29.35-37.98%、雌 29.71-34.02%) であり、この他に (雄 %、雌： %) 及び (雄 %、雌： %) が同定された。 代謝物のパターン：非標識体の投与期間の長短に係らず、代謝物のパターンは類似していた。() は尿中にもみ検出され、雄の反復投与でわずかに増加しただけであり、顕著な性差は認められなかった。	(2003年)	代 34
代謝・分解 3 (GLP)	植物における代謝試験	レタス	及び を標識した化合物 700g ai/ha 相当を 3 回茎葉散布し最終散布 18 日後に茎葉部を採取して、液体シフレーション、HPLC 分離後の液体シフレーション、コロマトグラフィ、LC-MS/MS で同定、定量した。	総放射能は 17.5~17.6mg/kg と高かったが、これは処理濃度が多かったこと及び最終散布後短時間で採取したによる。主要残留物は親化合物のみであったが、結合型残留物へ緩やかに代謝されることが示唆された。	(1999年)	代 44
代謝・分解 4 (GLP)	植物における代謝試験	ぶどう	及び 標識体を 800g ai/ha 相当を 3 回茎葉散布し最終散布 15 日後に茎葉部を、45 日後に茎葉部・果房を採取し果房は果実と果柄に分けて、液体シフレーション、HPLC で同定、定量した。	、 標識体によるそれぞれの総放射能は、果実で 1.18mg/kg、2.07mg/kg、果柄で 12.4mg/kg、19.6mg/kg、茎葉部で 43.7mg/kg、63.4mg/kg であった。各試料の残留物は親化合物のみであり、代謝は極めて緩やかであった。	(2001年)	代 47
代謝・分解 5 (GLP)	植物における代謝試験	豆 Bush bean (インゲンと同一属)	及び 標識体を 500g ai/ha 相当を 3 回茎葉散布し最終散布直後に植物体を、約 2 週間後に茎葉部・青まめを、約 52 日後にまめ乾燥茎葉部、乾燥莢、乾燥子実を採取した。青まめは、莢と子実に分けた。その後、液体シフレーション、HPLC で同定、定量した。	、 標識体によるそれぞれの総放射能は、可食部では青まめで 1.03mg/kg、0.09mg/kg、乾燥子実で 0.21mg/kg、0.13mg/kg であった。放射能の多くは植物体、茎葉部、乾燥茎葉部中で検出され最大 127.3 mg/kg であり、茎葉部・莢から子実への移行は極めて少ないと考えられた。主要残留物は親化合物であった。微量代謝物としては が最大で mg/kg、 が最大で mg/kg 等が検出された。	(2001年)	代 54
代謝・分解 6 (GLP)	好気的条件土壌における代謝試験	畑地土壌 (砂質壤土)	及び 標識体をそれぞれ約 1mg/kg を 100g の土壌に処理し、暗条件下 1 年間インキュベートし、経時的に採取して定量、同定した。	物質収支は、 では 100%、 では 93% であり、CO ₂ 無機化率はそれぞれ 16%、26%、また % 以下の極微量の分解物 (等) がみられた。DT50、DT90 はそれぞれ 108 日、360 日であった。	(1999年)	代 69

資料 No.	試験の種類	供試動物・植物・土壌等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁
代謝・分解 7-1 (GLP)	嫌気的条件土壌における代謝試験 (標識)	畑地土壌 (砂質壤土)	標識体約1mg/kgを100gの土壌に処理し、暗条件下120日間インキュベートし、経時的に採取して定量、同定した。	物質収支は95%であり、CO ₂ 無機化率はごく僅かであった。また1%以下の極微量の分解物 (数種) がみられた。DT50は261日であった。	(2000年)	代74
代謝・分解 7-2 (GLP)	嫌気的条件土壌における代謝試験 (標識)	畑地土壌 (砂質壤土)	標識体約1mg/kgを100gの土壌に処理し、暗条件下120日間インキュベートし、経時的に採取して定量、同定した。	物質収支は99.8%であり、CO ₂ 無機化率はごく僅かであった。また最大6.7%の分解物F47がみられた。DT50は345日であった。	(2000年)	代77
代謝・分解 8 (GLP)	土壌表層における光分解	砂質壤土	標識体を30gの土壌薄層に約140μg処理し、光照射下15日間放置し、経時的に採取して定量、同定した。	回収率は102%であり、CO ₂ 無機化率はごく僅かであった。親化合物は約91%残留し、また%前後の微量の未同定分解物が2個みられた。DT50は135日であった。	(2000年)	代81
代謝・分解 9 (GLP)	土壌吸着試験	壤土 軽植土 軽植土 砂質土	4土壌/7ピトリム含有CaCl ₂ 溶液を1/25の比率で調製後、検体溶液を0.005~0.2mg/Lとなるように添加し25°C、暗所24時間振とうして平衡とした後、水中及び土壌中濃度を測定して吸着係数を求めた。	有機炭素含有量に基づく吸着係数(K _{oc} , ml/g)は以下のとおり算出された。 壤土 (十勝): 6.72 x 10 ² 軽植土 (和歌山): 1.71 x 10 ³ 軽植土 (高知): 1.76 x 10 ³ 砂質土 (宮崎): 1.62 x 10 ³	(2002年)	代84
代謝・分解 10-1 (GLP)	水中光分解運命試験	pH5緩衝液	標識体を緩衝液に約3μg/mL処理し、光照射下15日間インキュベートし、経時的に採取して定量、同定した。	物質収支は97.4%であり、CO ₂ 無機化率はごく僅かであった。また溶液中の放射能はすべて親化合物であり94%を超えていた。分解物はみられなかった。DT50は算出できなかった。	(1999年)	代87
代謝・分解 10-2 (GLP)	水中光分解運命試験	自然水 (池水)	標識体を自然水に約4.6μg/mL処理し、光照射下8日間インキュベートし、経時的に採取して定量、同定した。	物質収支は95.7~100%であった。また溶液中の放射能はすべて親化合物であり94%を超えていた。分解物はみられなかった。DT50は算出できなかった。	(2002年)	代89
代謝・分解 11 (GLP)	水中光分解試験	精製水 自然水 (河川水)	非標識純品を精製水及び自然水に約1mg/Lを処理し、光照射下120時間インキュベートし、経時的に採取し、定量した。	試験終了時の検体濃度は、精製水で0.997mg/L、自然水で0.944mg/Lであり、安定であった。DT50は算出しなかった。	(2001年)	代91

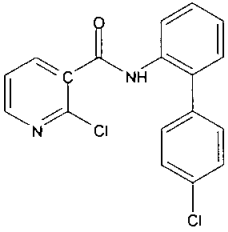
資料 No.	試験の種類	供試動物・植物・土壌等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁
代謝・分解 12 (GLP)	水/底質系における光分解運命試験	自然の水/底質系	天然の池より採取した水/底質系試料に 標識化合物をほぼ実使用量添加して自然光下120日間インキュベートした。経時的に試料採取し、定量・同定した。	水相中の放射能は120日後に22%まで減少し、底質中の放射能は103日後に最大の48.3%を示し、その後は減少した。 物質収支は73.3%まで減少したが、CO ₂ 無機化によると考えられる。主たる分解物として が確認され、30日後で最大の %を示し、終了時点では %まで減少した。 主たる分解経路は、 及び未知分解物への分解、無機化並びに底質相での非抽出性残留物となると推論される。	(2001年)	代93
代謝・分解 13 (GLP)	加水分解運命試験	pH 4, 5, 7, 9 緩衝液	標識体を各緩衝液に3mg/Lとなるように添加してpH 4, 7, 9 (25°C) 5日間、pH 5, 7, 9 (50°C) 30日間暗条件でインキュベートした。経時的に試料を採取し、定量・同定を行った。	物質収支は99.4~101.1%であった。50°C、25°Cのいずれの条件下でも検体の分解はみられず、安定であり、DT50は算出できなかった。	(1999年)	代97

「 」標識： 標識化合物
「 」標識： 標識化合物

1. 「 」標識化合物の合成経路

2. 「 」標識化合物の合成経路

<代謝物一覧表>

記号	由来	名称(略称)	化学名	構造式
ボスカリド	親化合物	ボスカリド	2-chloro-N-(4'-chlorobiphenyl-2-yl)nicotinamide	

(つづく)

(つづき)

記号	由来	名称(略称)	化学名	構造式

(つづく)

注：結合「基」の部位が特定できなかった代謝物については、その部位を化学名の中に「-?-」で示した。

(つづき)

記号	由来	名称(略称)	化学名	構造式

(つづく)

注：結合「基」の部位が特定できなかった代謝物については、その部位を化学名の中に「-?-」で示した。

(つづき)

記号	由来	名称(略称)	化学名	構造式

(つづく)

注：結合「基」の部位が特定できなかった代謝物については、その部位を化学名の中に「-?-」で示した。

(つづき)

記号	由来	名称(略称)	化学名	構造式

(つづく)

注：結合「基」の部位が特定できなかった代謝物については、その部位を化学名の中に「-?-」で示した。

(つづき)

記号	由来	名称(略称)	化学名	構造式

(つづく)

注：結合「基」の部位が特定できなかった代謝物については、その部位を化学名の中に「-?-」で示した。

(つづき)

記号	由来	名称(略称)	化学名	構造式

(つづく)

注：結合「基」の部位が特定できなかった代謝物については、その部位を化学名の中に「-?-」で示した。

(つづき)

記号	由来	名称(略称)	化学名	構造式

注：結合「基」の部位が特定できなかった代謝物については、その部位を化学名の中に「-?-」で示した。