

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。

Fluxapyroxad

11. 1年間反復経口投与毒性及び発がん性

11-1. ビーグル犬を用いた12ヵ月間反復経口投与慢性毒性試験 (資料12)

試験機関:

(GLP 対応)

報告書作成年:

検体純度:

試験動物: 純系ビーグル犬 1群 雌雄各5匹

試験開始時月齢: 雌雄 5-8ヵ月齢

試験開始時体重: 雄 9.7-14.6 kg 雌 7.8-12.8 kg

投与期間: 12ヵ月間 ()

投与方法: 濃度別に検体を直接飼料に混合して、プレミックスを調製した。これに飼料を混合して、それぞれ0、300、1500 および 12000 (雄) または 9000 (雌) ppm の濃度の混餌を約2週間隔で調製した。混餌約400gに水約400gを添加してペースト状の餌として12ヵ月間にわたって毎日給餌した。

用量設定根拠:

試験項目および結果:

一般状態および死亡率; 一般状態および生死について、毎日観察した。詳細な一般状態の観察は全動物を対象として投与前期間およびその後、毎週、以下の項目について検査した。

取り扱い時の異常行動、被毛、皮膚、姿勢、粘膜、流涎、呼吸、活動/覚醒レベル、振戦、痙攣、異常行動、歩行異常、流涙、肉眼的腫脹/腫瘤、糞(外観/硬さ)、尿(量/色調)、瞳孔径

認められた主要な所見の発生頻度を表1に示す。

本試験では、死亡例は認められなかった。

12000/9000 ppm群の雌雄で嘔吐(動物あたり1-19回)が認められた。

1500 ppm以下の投与群の雌雄における嘔吐の発生頻度は低頻度であり投与関連性はないと考えられた。

軟便および下痢が表1のように認められたが、用量依存性がないので、投与関連性はないと考えられた。

表 1. 一般状態異常所見

所見		性別・投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		0	300	1500	12000	0	300	1500	9000
観察動物数		5	5	5	5	5	5	5	5
嘔吐	発生動物数			2	5	1	2	1	5
	観察数			4	37	1	3	1	19
	平均発現日			47	1	74	169	75	0
軟便	発生動物数	1	3	2	1	2	1		2
	観察数	1	6	2	1	9	2		3
	平均発現日	156	263	173	268	87	208		37
下痢	発生動物数					1		1	
	観察数					1		1	
	平均発現日					158		168	

注：空欄は発生なし。

体重変化；投与開始前は7日前、投与開始0日、以降毎週全動物を対象として測定した。

表2に投与終了時の体重および体重増加の対照群に対する比率を示す。

表 2. 体重および体重増加量

性別	雄			雌		
	300	1500	12000	300	1500	9000
投与量 (ppm)	300	1500	12000	300	1500	9000
投与終了時体重	98	104	91	109	109	90
総体重増加	93	107	66	137	129	58 ↓

対照群を100%とした際の値

統計学的方法：Dunnett 検定（両側）↑ ↓： $p \leq 0.05$

矢印のない数値は有意差なし。

<体重> 9000 ppm 群雌の体重が投与 217 日に有意に抑制 ($p \leq 0.05$) されていたことを除いて、いずれの投与群の雌雄とも統計学的に有意な変化は認められなかった。

<体重増加> 12000 ppm 群の雄で平均体重増加は全投与期間を通し軽度な抑制がみられたが、有意差は認められなかった。これは主に1例の体重増加の抑制によるものであった。

9000 ppm 群の雌で平均体重増加は全投与期間を通し有意に抑制された ($p \leq 0.05-0.01$)。これは主に体重増加の抑制あるいは体重の減少を示した3例によるもので、3例とも摂餌量の減少および食餌効率の低下を伴っていた。

したがって、12000 ppm 群の雄の1例および9000 ppm 群の雌の3例の体重増加の抑制は検体の投与に関連があると考えられた。

300 および 1500 ppm 群の雌雄とも体重増加に有意な変化はなく、投与関連性の影響は認められなかった。

摂餌量および食餌効率；投与開始 7 日前から、毎日、混餌約 400g に水約 400 g を添加してペースト状の餌として給餌し、遅くとも 2 時間後に残餌を測定して各動物の摂餌量および食餌効率を算出した。

<摂餌量>表 3 に全投与期間の平均摂餌率（給餌量に対する摂取率%）を示す。

表 3. 平均摂餌率

性別	雄				雌			
	0	300	1500	12000	0	300	1500	9000
投与量 (ppm)								
平均摂餌率	100	100	100	99	96	96	97	82

雄において、12000 ppm群では投与16日まで摂餌量が少なく、投与1、2および9日に有意 (Dunnett両側検定 $p \leq 0.05$) に少なかった。また、投与57、60-67、211-218、262-280 日にも摂餌量は少なかったが、有意差は認められなかった。これらの差は主として、1例に起因するもので、この動物は馴化期間中の給餌量のほとんどを摂取していたが、投与期間中は約半分しか摂取しない日が散見され、投与期間中の平均摂餌率は96%で、この動物では投与の影響と考えられた。

雌において、9000 ppm群では全ての動物で摂餌量は少なく、ほとんどの投与期間中平均摂餌量は有意 (Dunnett両側検定 $p \leq 0.05-0.01$) に少なかった。3例の雌では投与関連性のある中程度の摂餌量の減少が認められ、投与期間中の平均摂餌率は72-83%で、体重の抑制を伴っていた。他の2例の摂餌量も軽度の減少がみられ（摂餌率約90%）、投与の影響と考えられた。300および1500 ppm群の雌雄とも摂餌量に投与の影響は認められなかった。

摂餌量および体重増加に及ぼす投与関連性の影響から、12000 ppm群の雄1例および9000 ppm群の雌4例の食餌効率の低下は投与の影響があったものと考えられる。

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は表 4 のとおりであった。

表 4. 平均検体摂取量

性別	雄			雌		
	300	1500	12000	300	1500	9000
投与量 (ppm)						
平均検体摂取量 mg/kg/day	8	39	335	9	43	257

血液学的検査；投与 14/13(雄/雌) 日前、投与 3 ヶ月 (92/93 日)、6 ヶ月 (185/186 日) および 12 ヶ月 (360/361 日) 後に、絶食後の全生存動物を対象として、前腕機側皮静脈から血液を採取し、以下の項目の測定を行った。

白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (Hb)、ヘマトクリット値 (HCT)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球色素量 (MCH)、平均赤血球色素濃度 (MCHC)、

血小板数 (PLT)、白血球百分比 (WBC-Dif)、網状赤血球数 (RET)、部分トロンボプラスチン時間 (PTPT)、プロトロンビン時間 (PTT)

統計学的有意差の認められた項目を表 5 に示す。

表 5. 血液学的検査値

検査項目	検査時期	性別・投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		300	1500	12000	300	1500	9000
WBC	12 ヶ月	122 ↑	86 ↓	99			
PLT	6 ヶ月						145 ↑
	12 ヶ月			150 ↑	85 ↓	127 ↑	129 ↑
大型非染色細胞	3 ヶ月				50 ↓		

対照群を 100%とした際の値

統計学的方法: Kruskal-Wallis+Wilcoxon 検定 (両側) ↑ ↓ : $p \leq 0.05$, ↑↓ : $p \leq 0.01$

矢印のない数値は有意差なし。

PLT の有意な増加が 12000 ppm 群の雄の 12 ヶ月時、9000 ppm 群の雌の 6 および 12 ヶ月時、1500 ppm 群の雌の 12 ヶ月時に認められた。

また、PLT の有意な減少が 300 ppm 群の雌で認められたが、これは雌雄同一性のない用量非依存的なもので、投与関連性はないものと考えられた。

雄で 12 ヶ月時に WBC の有意な増加および減少がそれぞれ 300 および 1500 ppm 群で認められたが、用量依存性もなく、雌では変化が認められないので、検体の投与関連性はないと考えられた。さらに、大型非染色細胞の相対数の有意な減少が 300 ppm 群の雌で認められたが、用量依存性もなく、他の白血球像にも変化が認められないので、検体の投与関連性はないと考えられた。

血液生化学的検査: 血液学的検査用の採血と同時に採血した血液から得た血清を用いて、以下の項目の測定を行った。

アラニントランスアミナーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、γグルトミルトランスアミナーゼ (GGT)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、クロール (Cl)、無機リン酸 (INP)、カルシウム (Ca)、尿素 (Urea)、クレアチニン (Crea)、グルコース (Gluc)、総ビリルビン (T. Bil)、総タンパク (T. Pro)、アルブミン (Alb)、グロブリン (Glob)、トリグリセリド (TG)、コレステロール (Chol)、マグネシウム (Mg)

統計学的有意差の認められた項目を表 6 に示す。

ALP 活性は 12000 ppm 群の雄および 9000 ppm 群の雌で投与 3 ヶ月の時点から投与終了まで有意に亢進した。1500 ppm 群において、ALP 活性の平均値に有意な亢進は認められなかったが、雄の 2/5 例および雌の 4/5 例は投与 6 ヶ月から亢進がみられた。

GGT 活性も 12000 ppm 群の雄は投与終了時には有意ではなかったが、投与 6 ヶ月の時点から、9000 ppm 群の雌は投与 3 ヶ月の時点から投与終了まで有意に亢進した。

ALT 活性は 12000 ppm 群の雄で投与終了時の平均値は有意に亢進が認められ、同群の 2/5 例は投与期間中 ALT 活性の亢進が認められた。

T. Pro および Alb は 1500 ppm 群の雄および雌、12000 ppm 群の雄および 9000 ppm 群の雌で投与 3 カ月の時点 (T. Pro : 12000 ppm 群の雄および 1500 ppm 群の雌投与 3 カ月時点を除き) から投与終了まで減少が認められた。300ppm 群の雄の Alb (33.74 g/L) は投与終了時に有意な減少がみられたが、投与動物の値は背景データの範囲 (30.58-34.86 g/L) 内にあり、投与関連性はないと考えられた。この群の雄では Alb の減少と一致した Ca の有意な減少がみられた。Ca の多くは Alb と結合しており、用いた Ca の測定法は血清中の総濃度として測定したので、Ca 濃度は Alb 濃度と相互に関連がある。この群の Ca (2.62 mmol/L) は有意に減少していたが、背景データ (2.62-2.82 mmol/L) の下限にあることから、投与関連とは考えられない。1500 および 12000 ppm 群雄の Ca は試験期間中減少していた (1500 ppm 群の投与 6 カ月は有意ではなかった)。9000 ppm 群雌の Ca は投与終了時に減少していた。

1500 および 12000 ppm 群雄において、T. Pro の変動に関連した Urea の減少が投与 6 カ月の時点からみられ、同時に Crea の減少が 12000 ppm 群雄で投与終了時にみられた。9000 ppm 群雌の Urea は試験期間中減少していた (投与 12 カ月は有意ではない)。

T. Bil は 1500 および 12000 ppm 群雄で投与 6 カ月時点から減少していた (投与 12 カ月は有意ではない)。9000 ppm 群の雌では試験期間中、1500 ppm 群の雌では投与終了時に減少していた。

Chol は 1500 ppm 群の雄では投与 3 カ月時のみ、12000 ppm 群の雄では試験終了時まで減少していた。雌では 9000 ppm 群で試験期間中減少していた。300 ppm 群では 6 カ月時のみ減少 (3.35 mmol/L) していたが、減少に用量依存性がなく、また背景データ (3.43-5.8 mmol/L) よりわずかに低いのみであったことから検体投与に関連するとは考えられない。

TG は 12000 ppm 群の雄で投与 6 カ月時点から増加していた。

表 6. 血液生化学的検査

検査項目	検査時期	性別・投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		300	1500	12000	300	1500	9000
ALT	3 ヶ月						
	6 ヶ月						
	12 ヶ月			325 ↑			
ALP	3 ヶ月			1215 ↑			521 ↑
	6 ヶ月			1702 ↑			510 ↑
	12 ヶ月			2140 ↑			714 ↑
GGT	3 ヶ月						268 ↑
	6 ヶ月			198 ↑			172 ↑
	12 ヶ月						231 ↑
Ca	3 ヶ月		96 ↓	93 ↓			
	6 ヶ月			92 ↓			
	12 ヶ月	97 ↓	97 ↓	93 ↓			94 ↓
Urea	3 ヶ月						76 ↓
	6 ヶ月		77 ↓	76 ↓			69 ↓
	12 ヶ月		81 ↓	70 ↓			
CREA	12 ヶ月			84 ↓			
T. Bil	3 ヶ月						65 ↓
	6 ヶ月		62 ↓	68 ↓			49 ↓
	12 ヶ月					66 ↓	37 ↓
T. Pro	3 ヶ月		92 ↓				89 ↓
	6 ヶ月		92 ↓	82 ↓		91 ↓	87 ↓
	12 ヶ月		91 ↓	81 ↓		93 ↓	84 ↓
アルブミン	3 ヶ月		88 ↓	76 ↓		90 ↓	83 ↓
	6 ヶ月		88 ↓	72 ↓		86 ↓	81 ↓
	12 ヶ月	93 ↓	88 ↓	70 ↓		88 ↓	77 ↓
TRIG	6 ヶ月			176 ↑			
	12 ヶ月			157 ↑			
T. Chol	3 ヶ月		81 ↓	56 ↓			69 ↓
	6 ヶ月			62 ↓	75 ↓		63 ↓
	12 ヶ月			62 ↓			58 ↓

対照群を 100%とした際の値

統計学的方法 : Kruskal-Wallis+Wilcoxon 検定 (両側) ↑ ↓ : $p \leq 0.05$, ↑↓ : $p \leq 0.01$

尿検査 ; 投与 11/10 日前(雄/雌)、投与 3 ヶ月 (94/95 日)、6 ヶ月 (183/184 日) および 12 ヶ月 (358/359 日) 後に、全生存動物を対象として、各動物を代謝ケージに移し、

絶食および給水 (500mL) 下で一晩蓄尿を採取し、以下の項目について検査した。

pH、蛋白、Glu、ケトン体、Urob、Bil、潜血、比重、沈渣、尿量、色調、混濁度

統計学的有意差の認められた項目を表 7 に示す。

表 7. 尿検査異常所見

検査項目/程度	検査時期	性別・投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		0	300	1500	12000	0	300	1500	9000
移行 ≤1	6 ヵ月					4	4	2	0
上皮細胞 ≥2						1	1	3	5↑

統計学的方法 : Fisher 直接確率検定 (片側) ↑ ↓ : $p \leq 0.05$

≤1 : 少数、 ≥2 : 多数

9000 ppm 群の雌で投与 6 ヵ月時点でのみ移行上皮細胞数の増加が認められたが、投与終了時に異常は認められなかったため、この変化に投与関連性はないと考えられた。

眼科学的検査 ; 投与開始および投与終了時に、全群の全動物を対象として検査した。

検体投与に関連のある所見は認められなかった。

臓器重量 ; 試験終了時の全生存動物 (各群雌雄各 5 例) を対象として、麻酔下で瀉血層殺し、以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、脾臓、脳、心臓、下垂体、前立腺、甲状腺 (上皮小体を含む)

表 8 に統計学的有意差の認められた項目を示す。

12000 ppm 群雄および 9000 ppm 群雌の肝臓重量および対体重比は有意に増加していたが、病理組織学的変化を伴っていなかった。12000 ppm 群雄の前立腺および脾臓の重量および対体重比は減少していた。

1500 ppm 群の雄の心臓および雌の腎臓の対体重比の減少は用量依存性がなく投与に関連しないと考えられた。さらに、12000 ppm 群の雄および 9000 ppm 群の雌の腎臓の対体重比は増加または増加傾向にあった。また、12000 ppm 群の雄の下垂体の対体重比は増加していた。これらの臓器には関連する病理組織学的変化を伴わず、最終体重の減少による影響と考えられた。

表8. 臓器重量

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		300	1500	12000	300	1500	9000
最終体重		98	105	91	109	110	93
心臓	対体重比	100	87 ↓	99			
腎臓	対体重比	106	107	130 ↑	100	90 ↓	110
肝臓	重量	94	102	124 ↑	87	105	115 ↑
	対体重比	95	98	135 ↑	81	96	123 ↑
前立腺	重量	67	102	36 ↓			
	対体重比	67	96	39 ↓			
脾臓	重量	86	89	70 ↓			
	対体重比	87	85	76 ↓			
下垂体	対体重比	112	95	115 ↑			

対照群を 100%とした際の値

Kruskal-Wallis H 検定および Wilcoxon 検定 (両側) : ↑ ↓ : $p \leq 0.05$, ↑↓ : $p \leq 0.01$

矢印のない数値は有意差なし。

肉眼的病理検査 ; 試験終了時の全生存動物 (各群雌雄各 5 例) について剖検を行った。

投与関連性の所見を表9に示す。

表9. 肉眼的病理検査異常所見

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		0	300	1500	12000	0	300	1500	9000
検査動物数		5	5	5	5	5	5	5	5
肝臓	変色 (褐色)				5				5
	退縮				1				
脾臓	沈着			1	5				5

肝臓の変色 (褐色) が 12000 ppm 群雄および 9000 ppm 群雌の全例、12000 ppm 群雄の 1/5 例に肝臓の縁の軽度ないし中等度の多巣性退縮が認められた。

12000 ppm 群雄および 9000 ppm 群雌の全例ならびに 1500 ppm 群雄の 1/5 例の脾臓は表面にむらがあり、滑らかで、光沢のある被膜の軽度ないし高度な灰白色性沈着が瀰漫性に認められた。

その他の所見は、用量非依存性であり、投与関連性はないと考えられた。

病理組織学的検査 ; 肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、以下の組織についてヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色して病理標本を作製し、鏡検した。肝臓および脾臓についてはパールプルシアンブルー染色も行った。さらに、パールプルシアンブルー染色を 12000 ppm 群雄の腎臓 (動物番号 17)、心臓および脾臓 (動物番号 18) および大腿骨 (動物番号 17、18)、対照群雄の大腿骨 (動物番号 1) についても行った。

改良コッサ染色（炭酸カルシウムおよびリン酸カルシウム検出）および自己蛍光検査（リポフスチンの検出）を12000 ppm群雄（動物番号17）の肝臓、脾臓および腎臓について、ハート-/改良マッソン-ゴールドナー複合染色（弾性およびコラーゲン繊維の検出）を対照群（動物番号1、2）および12000 ppm群（動物番号16、17）の雄の脾臓について、さらにジチオオキサミドを用いた銅染色を対照群（動物番号1、2）および12000 ppm群（動物番号17、18）の雄の肝臓および脾臓について行った。

脳、下垂体、甲状腺、上皮小体、胸腺、気管、肺、鼻腔、咽頭、喉頭、心臓、大動脈、唾液腺（下顎腺、耳下腺）、肝臓、胆嚢、腎臓、脾臓、副腎、膵臓、精巣、卵巣、子宮、卵管、陰、精巣上体、前立腺、皮膚、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、リンパ節（腸間膜および腋窩）、雌の乳腺、膝関節および骨髄を含む大腿骨、胸骨（骨髄を含む）、骨格筋、坐骨神経、脊髄（頸髄、胸髄および腰髄）、眼（視神経を含む）、肉眼的異常病変

表 10 に主要な所見を示す。

肝臓において、12000 ppm 群雄および 9000 ppm 群雌の全例、1500 ppm 群の雄 4/5 例および雌 2/5 例には肝細胞内に軽微ないし高度の細胞質内微細顆粒状鉄沈着が瀰漫性にみられた。この鉄陽性肝細胞の分布パターンは主に門脈周囲、さらに明瞭な染色パターンは被膜下領域にみられた。さらに、軽微ないし中等度の多葉性門脈周囲線維症が12000 ppm 群の雄 4/5 例、および 9000 ppm 群の雌 3/5 例、1500 ppm 群の雌 2/5 例にみられた。数動物ではこの線維症は被膜下領域に顕著であった。この線維症は結合組織、胆管過形成、軽微な炎症性細胞浸潤の増加、肝細胞およびクッパー細胞内鉄沈着の増加を特徴としていた。さらに、12000 ppm 群の雄の 1/5 例では肉眼的にみられた退縮と関連のある肝臓の縁に軽度肝硬変を伴う顕著な架橋線維症がみられた。肉眼的にみられた褐変は肝細胞鉄沈着によるものである可能性が考えられる。

胆嚢において、軽微ないし軽度の細胞質内、かつ由来未知の上皮細胞内微細顆粒状褐色色素沈着が12000 および 1500 ppm 群の雄で各 2/5 例、9000 および 1500 ppm 群雌の各 4/5 例に認められた。

脾臓において、12000 ppm 群雄および 9000 ppm 群雌の全例、1500 ppm 群の雄 4/5 例および雌 3/5 例に微細顆粒状紺青色ないし黒色物質の軽微ないし重度の沈着が HE 染色で認められた。この物質は主に被膜および脾柱の結合組織内の細胞質内、また赤脾にもみられた。これはパールプルシアンブルー染色で微細顆粒状鉄沈着と確認された。微細顆粒状鉄沈着はヘモジデリン沈着とは明らかに異なっていた。脾臓被膜の肉眼的肥厚は少なくとも一部は脾臓の収縮、ついで脾臓被膜のひだを伴う赤脾の萎縮のためと考えられる。ハート-/改良マッソン-ゴールドナー複合染色は陰性で、脾臓の肥厚は脾臓被膜内の結合組織の増加のためではなかった。

前立腺において、12000 ppm 群雄の全例で軽微ないし中等度の萎縮がみられた。検体投与に起因する可能性があるが、発症要因は不明であった。

精巣において、片側性精細管変性の極小病巣（グレード1）が1500 ppm 群の雄3/5 例および12000 ppm 群の1/5 例に、さらに小病巣（グレード2）が12000 ppm 群の1/5 例に認められた。しかし、これらの所見は用量反応依存性がなく、病変は片側性で、極小さい病巣であることから投与関連性はないと考えられた。

その他の所見は用量非依存性、対照群と類似の発生頻度・程度であり、投与関連性はないと考えられた。

表 10. 病理組織学的異常所見

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		0	300	1500	12000	0	300	1500	9000
検査動物数		5	5	5	5	5	5	5	5
肝臓	肝細胞鉄沈着 合計			4	5			2	5
	軽微			4	1			2	2
	軽度								2
	中等度				2				1
	高度				2				
	多巣性線維症 合計				4			2	3
軽微				1			1	3	
軽度				2			1		
中等度				1					
	肝硬変、軽度				1				
	クッパ ^o -細胞鉄沈着	3	3	4	3	4	3	5	1
胆嚢	色素沈着			2	2			4	4
脾臓	結合組織鉄沈着 合計	1		4	5			3	5
	軽微	1		3	1			3	
	軽度			1					1
	中等度				1				3
	高度				2				1
	重篤				1				
	赤脾瀰慢性萎縮 合計				4				3
	軽微								2
	軽度				1				
	中等度				3				1
前立腺	ヘミン ^o リン鉄染色 合計	5	5	5	5	5	5	5	5
	軽微	1	2	2	3	1	2	2	5
	軽度	4	3	3	2	1	2	2	
	中等度					3	1	1	
	瀰慢性萎縮				5				
精巣	精細管変性			3	2				

本試験では、12000 ppm群の雄および9000 ppm群の雌では投与関連性の摂餌量の減少（雄1/5例および雌全例）、食餌効率の低下（雄1/5例、雌4/5例）が認められ、体重増加の抑制（雄1/5例、雌3/5例）を伴っていた。さらに、嘔吐が雌雄の全例で高頻度に認められた。1500 ppm以上の群の雌雄の血液生化学的検査で種々の変化が認められた。標的臓器は肝臓および脾臓で、1500 ppm以上では肝臓の肝細胞鉄沈着/多巣性線維症、脾臓の結合組織鉄沈着/赤脾萎縮等が認められた。さらに胆嚢上皮色素沈着、前立腺の萎縮が認められた。

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

Fluxapyroxad

したがって、無毒性量は雌雄とも300 ppm（雄：8 mg/kg/day；雌：9 mg/kg/day）であると判断される。

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

Fluxapyroxad

11-2. ラットを用いた12ヵ月間および24ヵ月間反復経口投与慢性毒性・発がん性併合試験

(資料 13)

試験機関：

(GLP 対応)

報告書作成年：

検体純度：

試験動物： CrI:WI (Han)Wistar 系ラット

発がん性群：1 群 雌雄各 50 匹

中間屠殺群：1 群 雌雄各 10 匹

試験開始時週齢：雌雄 6-7 週齢

試験開始時体重：雄 154.1-199.3 g 雌 109.6-154.5 g

投与期間：発がん性群；24 ヶ月間 ()

中間屠殺群；12 ヶ月間 ()

投与方法：濃度別に検体を直接飼料に混合して、プレミックスを調製した。これに飼料を混合して、それぞれ 0、50、250、1500 および 3000 ppm の濃度とし、24 ヶ月間にわたって随時摂食させた。検体を混入した飼料は安定性が確認された間隔(32 日間安定)で調製した。

用量設定根拠：

試験項目および結果：

一般状態および死亡率；一般状態および生死について、毎日観察した。詳細な一般状態の観察は全動物を対象として、投与前期間およびその後、毎週行った。また、動物を標準観察台に移し、以下の項目について検査した。

取り扱い時の異常行動、被毛、皮膚、姿勢、流涎、呼吸、活動/覚醒レベル、振戦、痙攣、異常行動、歩行異常、流涙、眼瞼閉鎖、眼球突出、糞(外観/硬さ)、尿、瞳孔径

認められた主要な所見および死亡の発生頻度を表 1 に示す。

歯の白変が 1500 および 3000 ppm 群の雌雄で認められたが、用量依存性はなかった。その他に投与関連性の影響は認められなかった。

3000 ppm 群の雄 1 例が投与 134 日に死亡した。

発がん性群の死亡率に投与の影響は認められなかった。

表 1. 一般状態異常所見および死亡率

所見		性別・投与量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	50	250	1500	3000	0	50	250	1500	3000
歯の白変 (%)	下顎	0	0	0	28	15	0	0	0	40	5
	上顎	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
死亡率 (%)	中間層殺群 ^a	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
	発がん性群 ^a	10	16	12	10	18	26	18	18	26	20

^a: 中間層殺群は投与 364 日、発がん性群は投与 728 日の死亡率 統計検定未実施

体重変化：投与開始日（試験 0 日）に測定し、試験 13 週までは週 1 回、その後は 4 週間に 1 回全ての生存動物の体重を測定した。

本試験中、有意差の認められた測定時期の結果を表 2 に示す。

表 2. 体重および体重増加

項目	測定時期	性別・投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		50	250	1500	3000	50	250	1500	3000
体重	13 週				95↓			95↓	94↓
	25 週				95↓			95↓	93↓
	53 週				94 ↓ (89 ↓)		94↓	93↓	89 ↓ (89 ↓)
	77 週				92↓		92↓	89↓	83↓
	104 週				90↓		88↓	84↓	77↓
体重増加	13 週				92↓			91↓	87↓
	25 週				92 ↓		94 ↓	91↓	86↓
	53 週				92 ↓ (85 ↓)		90↓	88↓	81↓ (80 ↓)
	77 週				89↓		87↓	83↓	72↓
	104 週				87↓		81↓	75↓	65↓

対照群を 100%とした際の値

() 内の数値は中間層殺群のみの 52 週の値。

Dunnett 検定 (両側) : ↑ ↓ : $p \leq 0.05$, ↑↓ : $p \leq 0.01$

<体重> 3000 ppm 群の雄で投与 14 日以降投与終了まで有意な抑制が認められた。

雌では 250 ppm 群で投与 343 日以降投与終了まで、1500 および 3000 ppm 群では投与開始以降ほぼ一貫して有意な抑制が認められた。

50 ppm 群の雌雄、250 および 1500 ppm 群の雄では投与関連性の変化は認められなかった。

<体重増加> 3000 ppm 群の雄で多くの測定時点で有意な減少が認められたが、1500 および 250 ppm 群の雄では投与 7 日に増加がみられたのみであった。

250ppm 群の雌では投与 147 日以降多くの時点で、1500 および 3000 ppm 群の雌では投与開始以降ほぼ一貫して有意な抑制が認められた。

50 ppm 群の雌雄では投与関連性の変化は認められなかった。

摂餌量および食餌効率；投与開始後 13 週間までは毎週 1 回、その後は 4 週間に 1 回摂餌量を全動物について測定し、食餌効率も算出した。

摂餌量は雄では、すべての投与群で有意な増加 (Dunnet 両側検定 $p \leq 0.05$ または 0.01) が主に投与期間の前半で散見された。雌では 1500 ppm 群で投与 119 日、3000 ppm 群で投与 63 日に摂餌量の有意な減少 (Dunnet 両側検定 $p \leq 0.05$) が認められたのみであった。用量非依存性であり、雌雄同一性も認められないことから、投与関連性はないと考えられた。

食餌効率に投与関連性の影響は認められなかった。

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は表 3 の通りであった。

表 3. 平均検体摂取量

投与量 (ppm)		50	250	1500	3000
平均検体摂取量 mg/kg/day	雄	2.1	11	68	145
	雌	2.7	14	82	182

飲水量；飲水量の明らかな変化について、給水瓶を目視で毎日観察した。

投与に関連のある明らかな変化は認められなかった。

血液学的検査；少なくとも 16 時間絶食させた生存動物 (各群雌雄各 10 例) を対象として、投与 3、6 および 12 ヶ月 (雄: 92、183 および 365 日、雌: 96、185 および 367 日) に麻酔下で後眼窩静脈叢から血液を採取し、以下の項目の測定を行った。

白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (Hb)、ヘマトクリット値 (HCT)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球色素量 (MCH)、平均赤血球色素濃度 (MCHC)、血小板数 (PLT)、白血球百分比 (WBC-Dif)、網状赤血球数 (RET)、プロトロンビン時間 (PTT)

統計学的有意差の認められた項目を表 4 に示す。

雄において、表 4 のような変動が認められたが、経時的に一定の傾向も、用量依存性もなく、変化の程度が小さいことから、投与関連性はないと考えられた。

雌において、12 ヶ月の検査時に Hb、MCV および MCH の減少が認められたが、変化の程度が極めて小さく、投与に関連する可能性は否定出来ないが、用量依存性も雌雄同一性も認められないことから毒性学的意義はないと考えられた。

PTT の短縮が 1500 および 3000 ppm 群の雌雄で認められ、雌では投与期間中短縮していた。また、250 ppm 群の雌では 6 ヶ月の検査時のみ短縮がみられた。

表 4. 血液学的検査

検査項目	検査時期 (投与月数)	性別・投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		50	250	1500	3000	50	250	1500	3000
RBC	6 ヶ月							105 ↑	
Hb	12 ヶ月								95 ↓
Hct	12 ヶ月			95 ↓	96 ↓				
MCV	12 ヶ月							97 ↓	97 ↓
MCH	12 ヶ月							96 ↓	95 ↓
MCHC	3 ヶ月		102 ↑						98 ↓
好酸球 (%)	3 ヶ月					69 ↓			
	12 ヶ月	122 ↑							
好中球数	3 ヶ月	122 ↑	127 ↑						
PTT	3 ヶ月				92 ↓			88 ↓	84 ↓
	6 ヶ月						95 ↓	89 ↓	84 ↓
	12 ヶ月			95 ↓	92 ↓			90 ↓	87 ↓

対照群を 100%とした際の値

統計学的方法：Kruskal-Wallis+Wilcoxon 検定（両側）↑ ↓： $p \leq 0.05$ 、↑↓： $p \leq 0.01$

注：空欄は有意差なし。

血液生化学的検査；血液学的検査用の採血と同時に採血した血液から得た血清を用いて、以下の項目の測定を行った。

アラニントランスアミナーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、γグルトミルトランスアミナーゼ (GGT)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、クロール (Cl)、無機リン酸 (INP)、カルシウム (Ca)、尿素 (Urea)、クレアチニン (Crea)、グルコース (Gluc)、総ビリルビン (T. Bil)、総タンパク (T. Pro)、アルブミン (Alb)、グロブリン (Glob)、トリグリセリド (TG)、コレステロール (Chol)、マグネシウム (Mg)

統計学的有意差の認められた項目を表 5 に示す。

雄において、1500および3000 ppm群でGGT活性の亢進、Chol、Globの増加を伴うT. Pro、Ca (3000 ppm群で3および6ヵ月時、1500 ppm群で6ヵ月時) の増加、T. BilおよびGlucの減少ないし減少傾向、Clの減少 (3および6ヵ月時) が認められ、さらに、3000 ppm群ではINPの増加 (3000 ppm群で3および6ヵ月時) もみられた。250 ppm群ではCholの増加、Gluc (6ヵ月時) およびT. Bilの減少あるいは減少傾向が認められた。50 ppm群のClの3ヵ月時の減少は極軽微であり、用量依存性がなく、投与関連性がないと考えられた。

表 5. 血液生化学的検査

検査項目	検査時期	性別・投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		50	250	1500	3000	50	250	1500	3000
AST	3 カ月							78↓	75↓
	6 カ月							77↓	80↓
	12 カ月								
GGT*	3 カ月			180 ↑	345↑				
	6 カ月			2200 ↑	7100↑				550↑
	12 カ月			829↑	1914↑				
K	6 カ月					91↓	94 ↓		
Cl	3 カ月	99 ↓		98↓	99↓				
	6 カ月			99 ↓	99↓			99 ↓	98↓
	12 カ月							98↓	98↓
INP	3 カ月				112↑				
	6 カ月				119↑				
Ca	3 カ月				105↑			104↑	107↑
	6 カ月			103 ↑	104↑			103	104↑
	12 カ月			102	103			104↑	105↑
Gluc	3 カ月			87 ↓	79↓	112 ↑	110 ↑	104	96
	6 カ月		91↓	92 ↓	87 ↓				
	12 カ月		97	93	82↓		111 ↑		
T. Bil	3 カ月		80 ↓	75↓	73↓		90	74↓	79 ↓
	6 カ月		82	81	78	83↓	75↓	65↓	69↓
	12 カ月		87	76	88		91	82	64↓
T. Pro	3 カ月			106↑	109↑			106↑	113↑
	6 カ月			105↑	107↑			108↑	113↑
	12 カ月			105↑	106↑			109↑	113↑
Alb	6 カ月								105↑
Glob	3 カ月			113↑	115↑		105 ↑	113↑	124↑
	6 カ月			110↑	111↑			115↑	124↑
	12 カ月			110↑	112↑		106 ↑	118↑	125↑
TG	3 カ月								173↑
Chol	3 カ月		130 ↑	147↑	179↑			163↑	204↑
	6 カ月		129 ↑	156↑	176↑			144↑	175↑
	12 カ月		126 ↑	154↑	171↑			164↑	186↑

対照群を 100%とした際の値

統計学的方法 : Kruskal-Wallis+Wilcoxon 検定 (両側) ↑ ↓ : $p \leq 0.05$, ↑↓ : $p \leq 0.01$

*対照群 : 雄 20nkat/L (3 カ月)、1nkat/L (6 カ月)、7nkat/L (12 カ月)

雌 2nkat/L (6 カ月)

矢印のない数値は有意差なし

雌において、1500および3000 ppm群でAST活性の低下 (3および6カ月時)、Chol、Globの増加を伴うT. Pro、Caの増加、T. Bilの減少ないし減少傾向、Clの減少 (6および12

ヵ月時) が認められ、さらに、3000 ppm群ではGGT活性の亢進(6ヵ月時)、Alb(6ヵ月時) およびTG(3ヵ月時) の増加もみられた。250 ppm群ではGlobの増加(3および12ヵ月時)、T. Bilの減少(6ヵ月時) がみられた。50および250 ppm群のKの減少、Glucの増加は用量依存性がなく、投与関連性がないと考えられた。また、T. Bilが50 ppm群で減少したが、この試験群では他に投与関連性の変化がないことから毒性学的意義はないと考えられた。

GGT活性の亢進およびAST活性の低下、T. Cholの増加およびTGの増加など血液生化学的検査における多くの変化は、ミクロソーム酵素誘導に関連していると考えられる。

T. Proの増加は主にグロブリンの増加を伴い、雌では時にアルブミンの増加もみられた。グロブリンの増加はT. CholおよびTGのための輸送蛋白の合成のためと思われる。T. Bilの減少ないし減少傾向は酵素誘導によりBilの排泄能が増加したためと考えられる。Pro-Tの短縮も酵素誘導に一致している。

Caの多くは蛋白と結合しており、用いたCaの測定法は血清中の総濃度として測定したので、Ca濃度は蛋白濃度と相互に関連がある。この遊離のCaのみが生体中で制御されており、蛋白の高濃度下で遊離のCaの恒常性を維持するためにCaが増加したと考えられる。この変化はINPの増加にも関連している。

尿検査：投与3、6および12ヵ月[それぞれ88/88、180/179および362/362日(雄/雌)]に、各10動物を代謝ケージに移して(絶食、絶水下で)一夜尿を採取し、以下の項目について検査した。

pH、蛋白、Glu、ケトン体、Urob、Bil、潜血、比重、沈渣、尿量、色調、混濁度
統計学的有意差の認められた項目を表6に示す。

表6. 尿検査

検査項目	検査時期	性別・投与量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	50	250	1500	3000	0	50	250	1500	3000
尿量(mL)	12ヵ月	5.6	4.1↓	3.5↓	4.5	5.8					
比重(g/L)	12ヵ月	1035	1049↑	1061↑	1052↑	1046					

統計学的方法：Kruskal-Wallis+Wilcoxon検定(両側) ↑↓：p≤0.05、↑↓：p≤0.01
矢印のない数値は有意差なし

中間用量群で表のような変化が認められたが、尿量の減少に伴う比重の高値であり、投与関連性の変化は認められなかった。

眼科学的検査：中間屠殺群の動物を対象として、投与開始前に全群の全動物を、投与終了時に3000 ppm群と対照群の全ての生存動物を検査した。

本試験では、検体投与に関連する所見は認められなかった。

臓器重量：中間屠殺群および発がん性群の試験終了時の全生存動物を対象として、麻酔下で瀉血屠殺後、以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、脾臓、脳、心臓、甲状腺(中間屠殺群のみ)

統計学的有意差の認められた項目を表 7 に示す。

<中間層殺群> 肝臓の重量および対体重比が 1500 および 3000 ppm 群の雌雄、ならびに 250 ppm 群の雌で認められた。250 ppm 群雌の増加は肝細胞の軽微な肥大のみを伴っていたことから生体異物に対する適応反応であり、毒性学的意義は無いと考えられた。

甲状腺の対体重比の増加が 3000 ppm 群の雄で認められた。雌では重量あるいは対体重比の増加が 250 ppm 群を除いて認められたが、病理組織学的に関連する変化がみられず、用量依存性もないことから、投与関連性はないと考えられた。

その他の表のような変化は、病理組織学的に関連する変化がみられず、また対体重比の増加は最終体重の低下に基づいていると考えられることから、投与関連性はないと考えられた。

<発がん性試験群> 肝臓の重量および対体重比の増加が 250 ppm 以上の群の雌雄（250 ppm 群雌の重量を除く）で認められた。250 ppm 群雌の増加は主として肝細胞の軽微な肥大を伴っていたことから生体異物に対する適応反応であり、毒性学的意義は無いと考えられた。

その他の表のような変化は、病理組織学的に関連する変化がみられず、ほとんどの場合、対体重比の増加は最終体重の低下に基づいていると考えられることから投与関連性はないと考えられた。

表 7. 臓器重量

中間層殺群									
性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		50	250	1500	3000	50	250	1500	3000
検査動物数		10	10	10	9	10	10	10	10
最終体重		106	99	100	88↓	105	99	91↓	89↓
副腎	対体重比	97	94	106	122↑				
脳	対体重比			99	112 ↑			109 ↑	108 ↑
心臓	対体重比			99	107 ↑	99	105	106 ↑	109 ↑
腎臓	対体重比		103	109	120 ↑				
肝臓	重量		104	135↑	137↑	106	109 ↑	120↑	131↑
	対体重比		104	134↑	155↑	102	109↑	131↑	148↑
脾臓	対体重比			101	114↑				
甲状腺	重量					129↑	113	107	121 ↑
	対体重比		106	110	125↑	126↑	114	118↑	136↑
子宮	重量					107	143↑	113	128 ↑
	対体重比					102	144↑	122	143↑
精巣	対体重比			96	116 ↑				
発がん性試験群									
検査動物数		42	44	45	41	40	41	35	39
最終体重		105	102	97	90↓	95	88↓	83↓	77↓
副腎	重量					107	98	89↓	91↓
	対体重比		94	112↑	146↑	114	112	107	119↑
脳	対体重比		100	105	112↑	107	114↑	119↑	128↑
心臓	重量					97	94 ↓	94 ↓	91 ↓
	対体重比		100	110↑	112↑	102	107↑	113↑	119↑
腎臓	重量	105	107 ↑	111↑	104				
	対体重比		104	116↑	115↑	110 ↑	115↑	120↑	124↑
肝臓	重量	105	111↑	133↑	145↑		98	113↑	118↑
	対体重比	100	108↑	138↑	161↑	106	112↑	136↑	155↑
脾臓	重量	118	107	104	91↓	94	85↓	91↓	74↓
精巣上体	対体重比		96	105 ↑	108↑				
精巣	対体重比		104	107	123↑				
子宮	対体重比					143 ↑	140↑	176↑	167↑

対照群を 100%とした際の値

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

肉眼的病理検査；途中死亡、切迫屠殺、中間屠殺および試験終了時の全生存動物（中間屠殺群は各群雌雄各 10 例）について剖検を行った。

表 8 に主要な肉眼的所見について示す。

表 8. 肉眼的病理検査異常所見

臓器/ 組織	所見	性別・投与量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	50	250	1500	3000	0	50	250	1500	3000
中間屠殺群											
検査動物数		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
下顎	左右切歯白変				1	1					5
肝臓	嚢胞										1
	変色(暗褐色)				1	7				1	5
発がん性試験群											
検査動物数		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
肝臓	嚢胞	1	1		7	12	2	5	3	4	3
	変色(暗褐色)	1			2	6		1		4	16
	腫大		1		1	7				1	4
	巣状	32	30	40	44	41	20	17	27	25	29
	腫瘤			3	8	16	1	2		6	5
	顕著な腺房パターン		1	1	8	17	1		1	8	18
下顎	左右切歯白変			2	32	39			1	36	39
上顎	左右切歯白変				23	38				12	37
骨 (頭部)	前頭骨変色					38					34
	鼓室変色					31					31
	背側頭蓋骨変色					16					21
甲状腺	腫大	1		2	2	10	1	1			
	腫瘤	2		1	3	4	1	1	1	2	1

統計検定実施せず。

＜中間屠殺群＞ 肝臓の変色が 1500 ppm 以上の群の雌雄、切歯の白変が 1500 ppm 群の雌雄および 3000 ppm 群の雄で認められた。切歯の白変には病理組織学的検査で対照群との差が認められなかった。

＜発がん性試験群＞ 1500 および 3000 ppm 群で肝臓の嚢胞（雄）、暗褐色変色（雌雄）、巣状（雄）、腫瘤および顕著な腺房パターン（雌雄）、切歯の白変（雌雄）が認められ、さらに 3000 ppm 群では肝臓の腫大（雌雄）、甲状腺の腫大および腫瘤（雄）、頭蓋骨の変色（雌雄）が認められた。250 ppm 群でも肝臓の巣状（雄）および少数例（1-2/50 例）であるが切歯の白変（雌雄）が認められた。

病理組織学的検査；肉眼的病理検査を行った動物から、下記の臓器/組織を摘出し、対照群、3000 ppm 群については、全組織を、中間用量群 [50、250 および 1500 ppm] については肝臓、甲状腺、上皮小体および全ての肉眼的異常病変のみをヘマトキシリン・エオジンで染色して病理標本を作製し、鏡検した。なお、上顎および下顎切歯については中間屠殺群の全動物を対象として鏡検し、さらに対照群 (No. 355)

および 1500 ppm 群 (No. 533) の雌各 1 例の下顎切歯をパールプルシアンブルー (PPB) 染色し、鉄イオンの検出を行った。発がん性群の全動物の下顎切歯の縦断切片を保存したが、中間層殺群で、病理組織学的所見がみられなかったため、病理標本は作製しなかった。

さらに、肝臓については発がん性群の対照群および 3000 ppm 群の全動物ならびに中間用量群の雌動物の切片を PPB 染色し、鉄イオンの検出を行った。中間層殺群の 3000 ppm 群の雌 (No. 593 および 594) 雄 (No. 295 および 298) 各 2 匹の切片も同様に鉄イオンの検出を行ない、さらに自己蛍光検査を行いリポフスチンの検出を行った。

大腿骨 (膝関節を含む) については全試験群の全動物を、脾臓については対照群および 3000 ppm 群の全動物を PPB 染色し、さらに、中間用量群の全動物についてパラプラスト包埋して病理標本を作製し、鏡検した。

発がん性群の対照群の雄 (No. 1) および 3000 ppm 群の雌 (No. 544, 545, 555, 560, 562)、雄 (No. 243, 244, 247, 251, 252) 各 5 例の鼓室および/または頭頂骨についても病理標本を作製し、鏡検した。また、対照群 (No. 1) および 3000 ppm 群 (No. 243) の雄各 1 例の前頭骨、鼓室および/または頭頂骨を PPB 染色し、鉄イオンの検出も行った。さらに、3000 ppm 群雌 (No. 560 および 565) の前頭骨を PPB および改良コッサ染色 (炭酸カルシウムおよびリン酸カルシウム検出) を行った。また、これらの組織は Kardasewitsch 液で処理してホルマリン色素を除去し、HE 染色を行った。

発がん性群の対照群 (雄 No. 13 および 19, 雌 No. 307) および 3000 ppm 群 (雄 No. 247, 257 および 273, 雌 No. 541) の鼻腔についても PPB 染色を行った。対照群 (No. 1) および 3000 ppm 群 (No. 273) の雄の大腿骨のターンブルー染色を行い、二価および三価鉄の検出を行った。

免疫組織化学的検査を以下の組織 [1) -3) は発がん性群、4) は中間層殺群の動物から採取; No. は動物番号] について行った。

- 1) 下垂体: ACTH (副腎皮質刺激ホルモン) 特異的抗体 (対照群雄 No. 45, 50 ppm 群雄 No. 89, 250 ppm 群雄 No. 140 および 166, 1500 ppm 群雄 No. 199, 3000 ppm 群雄 No. 257 および 285, 50 ppm 群雌 No. 373) pan-Cytokeratin, ビメンチン, S-100, NSE (ニューロン特異的エノラーゼ) および GFAP (グリア細胞繊維性酸性タンパク質抗体 (250 ppm 群雄 No. 140))
- 2) 胸腺: ビメンチン および pan-Cytokeratin (対照群 No. 28)
- 3) 精巣上体: ビメンチン/ pan-Cytokeratin および Factor 8 (対照群 No. 32)
- 4) 脳: pan-Cytokeratin, ビメンチン, 神経フィラメント, S-100 および GFAP (3000 ppm 群雄 No. 297)

発がん性群の大脳および小脳 (3000 ppm 群雄 No. 259) ならびに大腿骨 (対照群雄 No. 39 および 3000 ppm 群雄 No. 273) の肉眼的異常部位について PAS 染色を行い、大腿骨については Grocott 染色も行った。

脳、下垂体、甲状腺、上皮小体、胸腺、気管、肺、鼻腔、咽頭、喉頭、心臓、大動脈、唾液腺 (下顎腺、舌下腺)、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、膵臓、精巣、卵巣、子宮、卵管、腔、精巣上体、前立腺、貯精囊 (凝固腺を含む)、皮膚、食道、胃 (前胃、腺胃)、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、リンパ節 (腸間膜および腋窩)、雌の乳腺、骨格筋、坐骨神経、骨髓 (大腿骨)、大腿骨 (膝関節を含む)、胸骨および骨髓、脊髓 (頸髓、胸髓および腰髓)、眼 (視神経を含む)、外涙腺、ハーダー腺、上顎切歯、下顎切歯、前頭骨、肉眼的異常病変

中間（投与 12 ヶ月）屠殺群；

<非腫瘍性病変> 主要な非腫瘍性病変について表 9 に示す。

表 9. 12 ヶ月中間屠殺における主要な非腫瘍性病変

性別		雄					雌				
投与量 (ppm)		0	50	250	1500	3000	0	50	250	1500	3000
検査動物数		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
肝臓	小葉中心性肝細胞肥大 合計	2		1	10	9			5	10	10
	軽微	2		1	5	3			5		
	軽度				5	6				7	
	中等度									3	8
	高度										2
	彌漫性色素沈着				3	6	1			8	9
大腿骨 ^a	PPB 染色陽性 合計				10	10				10	10
	軽微	2			1						
	軽度				9	1				1	
	中等度					8				9	9
	高度					1					1
甲状腺	変性コロイド	6	7	8	10	9	1	1	3	8	9
	濾胞肥大/過形成	3	5	5	10	7				1	

^a: パールプルシアンブルー染色 統計検定未実施

肝臓： 250 ppm 群の雌、1500 および 3000 ppm 群の雌雄で肝臓重量の増加を伴う軽微-高度の小葉中心性肝細胞肥大が認められ、病変の程度には用量依存性があり、さらに雌ではより増悪していた。これらは、肝臓における解毒反応としての肝ミクロソーム酵素誘導をによると考えられる。しかし、250 ppm 群の雌の肝臓重量の増加は軽度であり、肝細胞肥大は軽微であることから、250 ppm 群の雌の肝細胞肥大は毒性影響ではないと考えられた。さらに、1500 および 3000 ppm 群の雌雄で肝細胞内に軽微-中等度の微細顆粒状褐色色素が認められ、肉眼的所見の暗褐色変色に一致していた。この色素は PPB 染色陰性で、自己蛍光検査陽性でリポフスチンと考えられる。

切歯： 白変が 1500 および 3000 ppm 群の雌雄で用量依存的に増加していたが、病理組織学的に異常は認められなかった。したがって、検体投与に関連する所見ではあるが、毒性学的な意義はないと考えられた。

大腿骨： 異なる所見が主に骨皮質緻密骨、表面および骨幹の網状骨にみられた。前者は楕円形の好塩基性顆粒が骨細胞核に近接する骨基質に密集しており、後者は縁様弧線状好塩基性辺縁のある円形ないし卵形構造（直径 15 μm 程度）をしていた。1500 および 3000 ppm 群の雌雄で両者とも PPB 染色陽性で、顆粒は均一に染色していたが、後者の構造は弧線状辺縁のみ染色していた。所見の程度には用量依存性があり、雌がより増悪していた。しかし、骨構造の構造変化を示唆する病理組織学的変化がないことから、毒性学的意義はないと考えられた。

甲状腺： 1500 および 3000 ppm 群の雄の軽微ないし軽度の濾胞細胞肥大/過形成の増加は甲状腺重量の増加を伴い投与関連性がある。間接的な肝細胞肥大および肝臓酵素誘導による T4 の分解促進への関与は無視できないが、濾胞細胞肥大/過形成と重量の

変化は必ずしも一致してはいないため、これらの所見に投与関連性はないと考えられた。好酸性染色性の弱い顆粒状物質の特徴がある変性コロイドが対照群に比し 1500 および 3000 ppm 群の雌に高頻度で認められ、これに対して雄では対照群と同頻度であった。

その他の病変は用量非依存性あるいは対照群と同程度の発生であり、投与関連性はないと考えられた。

<腫瘍性病変> 全ての腫瘍性病変について表 10 に示す。

3000 ppm 群雄の死亡 1 例の脳に悪性混合型神経膠細胞腫が認められた。

いずれの腫瘍性病変も用量依存性が認められないため、投与関連性はないと考えられた。

表 10. 中間層殺群における全ての腫瘍性病変

性別		雄					雌				
		投与量 (ppm)	0	50	250	1500	3000	0	50	250	1500
検査動物数		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
脳	検査組織数	10				10	10				10
	顆粒細胞腫瘍 (B)										1
	混合型神経膠細胞腫 (M)					1					
腎臓	検査組織数	10				10	10				10
	腺腫 (B)	1									
下垂体	検査組織数	10				10	10	1	2	1	10
	前葉腺腫 (B)								1	1	
甲状腺	検査組織数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	C-細胞腺腫 (B)	1			1			1			
子宮	検査組織数						10		1	1	10
	内膜間質ポリープ (B)						1		1	1	1

発がん性 (24 ヶ月最終屠殺) 群 ;

<非腫瘍性病変> 主要な非腫瘍性病変について表 11 に示す。

肝臓 : 250、1500 および 3000 ppm 群の雌雄とも肝臓重量の増加を伴う軽微-高度の小葉中心性肝細胞肥大が認められ、また病変は増悪化している。これらは、肝臓の解毒反応としての肝ミクロソーム酵素誘導によると考えられる。250 ppm 群の雌雄の肝臓重量の増加は軽度であり、肝細胞肥大は大部分が軽微であったが、1500 および 3000 ppm 群は顕著な肝臓重量の増加および用量依存性のある病変の程度を示していた。したがって、高用量の 2 群 (1500 および 3000 ppm) での所見は、毒性として評価された。50 ppm 群雄のこの所見の発生頻度は対照群と同等であった。この所見はほとんどの場合、肉眼的所見の顕著な腺房パターンあるいは腫大と関連があった。

肉眼的所見の巣状は組織学的に大部分が変異細胞巣で染色性から分類した。雄では変異細胞巣の総数は投与群と対照群で差はみられなかったが、好塩基性変異細胞巣 (NOS) の有意な増加が 3000 ppm 群で認められた。雌では変異細胞巣の総数は 1500 およ

よび 3000 ppm 群で対照群に比し減少がみられたが、250 および 3000 ppm 群で好酸性変異細胞巢の有意な増加が認められた。明瞭な用量依存性が認められなかったが、3000 ppm 群は投与の影響と考えられた。

海綿症（囊胞性変性）は一般に雄で好発する非腫瘍性所見である。本試験では、1500 および 3000 ppm 群の雄で用量依存的な増加が認められた。この所見の多くは肉眼的所見の囊胞と関連していた。

雌で用量依存性の PPB 染色陽性反応（微細顆粒状肝細胞鉄沈着）の減少が、特に 1500 および 3000 ppm 群でみられた。雄の対照群および 3000 ppm 群では PPB 染色は陰性であった。さらに、1500 および 3000 ppm 群の雌雄で肝細胞内に軽微-中等度の微細顆粒状褐色色素が認められ、肉眼的所見の暗褐色変色に一致していた。この色素は PPB 染色陰性かつ自己蛍光検査陽性であることから、リポフスチンと考えられる。

大腿骨： PPB 染色陽性がみられた動物の他の骨（鼻甲介、胸骨、椎骨）についても種々の程度および発生頻度で用量非依存的変化が認められた。これらの変化が最も顕著であった大腿骨について全動物の PPB 染色性について検査した結果、中間層殺群と同様に PPB 染色性陽性反応が主に骨皮質緻密骨、表面および骨幹の網状骨にみられた。この所見の発生頻度および程度は 250 ppm 以上の群の雌雄で、用量依存性に有意に増加し、雌がより増悪していた。骨構造の変化を示唆しているが、病理組織学的に変化がなく毒性学的意義はないと考えられた。

頭蓋骨： 肉眼的に認められた頭蓋骨（前頭骨、背側頭蓋骨、鼓室）の白色化に関連する限局性骨膜骨化過剰症が 3000 ppm 群雌雄の前頭骨、頂頭骨および鼓室胞に認められたが、PPB 染色は陰性であった。

甲状腺： 多巢性濾胞過形成の有意な増加が 1500 および 3000 ppm 群の雄で認められた。50 および 250 ppm 群の雄の発生頻度は対照群と同頻度で投与関連性はないと考えられた。1500 ppm 群の雌も有意に増加していたが、3000 ppm 群で有意な増加はみられず、対照群と同頻度であることから、投与関連性がないと考えられた。

切歯の白変： 肉眼的に切歯の白変が 250ppm 群で 1 ないし 2/50 例、1500 および 3000 ppm 群の多数例で認められた。しかしながら、中間層殺群で骨構造の構造変化を示唆する変化がみられなかったことから、歯の病理組織学的検査は実施しなかった。

その他の病変は用量非依存的あるいは対照群と同程度の発生であり、投与関連性はないと考えられた。

表 11. 発がん性試験群における主要な非腫瘍性病変

性別		雄					雌				
投与量 (ppm)		0	50	250	1500	3000	0	50	250	1500	3000
検査動物数		50	50	50	50	50	50	49	50	50	50
頭蓋骨	検査組織数	44				42	39	2	2	7	40
	前頭骨骨化過剰症					41↑					32↑
	頂頭骨骨化過剰症										5↑
	鼓室胞骨化過剰症					4					
甲状腺	検査組織数	50	50	50	50	50	50	49	50	48	50
	濾胞細胞過形成	3	4	8	17↑	14↑	2	1	2	8↑	4
	変性コロイド	40	44	46	48↑	47↑	30	33	37	41↑	45↑
上皮小体	検査組織数						45	46	49	46	47
	多巢性肥大							5↑	2	2	1
肝臓	検査組織数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	小葉中心性肝細胞肥大 合計	1	2	30↑	43↑	43↑			28↑	41↑	44↑
	軽微	1	2	23	1	1			20	5	1
	軽度			7	23	11			8	22	11
	中等度				19	30				14	32
	高度					1					
	変異細胞巢	43	47	42	44	40	46	46	47	24	27
	-好塩基性(虎斑)	37	40	35	20	9	45	45	47	9	5
	-好塩基性(瀰漫性)	7	8	2	5	1	4	1			1
	-好塩基性(NOS)	3	3	5	7	10↑	5	2	4	3	2
	-明細胞	11	19	5	3		6	1	2		
	-好酸性	33	36	39	38	35	10	10	19↑	16	23↑
	PPB 染色陽性						42	38	30	11	3
瀰漫性色素沈着	2			9↑	14↑	18	18	26	33↑	47↑	
海綿症			1	10↑	23↑						
大腿骨	検査組織数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	PPB 染色陽性 合計			35↑	50↑	50↑			33↑	50↑	50↑
	軽微			35	5	1			23		
	軽度				35	11			8	8	1
	中等度				10	29			2	41	29
	高度					9				1	20

Fisher 直接確率検定 (片側) ↑ ↓ : $p \leq 0.05$, ↑↓ : $p \leq 0.01$

<腫瘍性病変> 表 12 に肝臓の肝細胞腺腫および癌ならびに甲状腺濾胞細胞腺腫および癌の発生率について、表 13 にこれらの腫瘍の背景データ (発生率%) を示す。また、全ての腫瘍性病変について表 14 に示す。

肝臓： 肝細胞腺腫および癌の増加が 250 ppm 群の雄、ならびに 1500 および 3000 ppm 群の雌雄で用量依存性に認められた。250 ppm 群の雄および 1500 ppm 群の雌の腺腫の増加ならびに腺腫と癌の発生合計動物数は有意ではなかったが、背景データより好発していた。したがって、250 ppm 以上の群の雄および 1500 ppm 群の雌の両腫瘍の発生は投与関連性があると考えられる。

甲状腺： 1500 および 3000 ppm 群雄の甲状腺濾胞細胞腺腫または癌の発生動物数に

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

Fluxapyroxad

増加が認められ、3000 ppm 群の両腫瘍の発生動物数には有意な増加が認められた。しかし、これらの腫瘍は背景データの範囲内にあるため投与に関連しないと考えられる。

表 12. 肝臓および甲状腺での腫瘍性病変発生率 (%)

性別		雄					雌				
		0	50	250	1500	3000	0	50	250	1500	3000
投与量 (ppm)		0	50	250	1500	3000	0	50	250	1500	3000
肝臓	検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	肝細胞腺腫 (B)			8.0	14.0 [↑]	30.0 [↑]		4.0		8.0	14.0 [↑]
	肝細胞癌 (M)	2.0		2.0	6.0	18.0 [↑]	2.0	2.0			
	腺腫/癌発生動物数	2.0		10.0	20.0 [↑]	42.0 ^{↑1)}	2.0	6.0		8.0	14.0 [↑]
甲状腺	検査動物数	50	50	50	50	50	50	49	50	48	50
	濾胞細胞腺腫 (B)	6.0	4.0	8.0	16.0	18.0		6.1	2.0	6.3	4.0
	濾胞細胞癌 (M)			2.0	2.0	6.0	4.0		2.0		2.0
	腺腫/癌発生動物数	6.0	4.0	10.0	18.0	22.0 ^{↑2)}	4.0	6.1	4.0	6.3	6.0

¹⁾ は 3 動物、²⁾ は 1 動物が腺腫と癌の両方を有していた。

Fisher 直接確率検定 (片側) ↑ ↓ : $p \leq 0.05$ 、^{↑↓} : $p \leq 0.01$

表 13. 肝臓および甲状腺の腫瘍性病変背景データ (試験あたり各 50 匹、8 試験の発生率)

臓器	腫瘍	雄			雌		
		腫瘍発生動物数 /供試動物数	腫瘍発生率%		腫瘍発生動物数 /供試動物数	腫瘍発生率%	
			平均	範囲		平均	範囲
肝臓	肝細胞腺腫 (B)	8/400	2.0	0-4	3/400	0.8	0-6
	肝細胞癌 (M)	6/400	1.5	0-6	7/400	1.8	0-6
	腺腫/癌発生動物数	14/400	3.5	0-8	10/400	2.5	0-6
甲状腺	濾胞細胞腺腫 (B)	52/400	13.0	4-28			
	濾胞細胞癌 (M)	9/400	2.3	0-4			
	腺腫/癌発生動物数	60/400	15.0	4-30			

雄において、担腫瘍動物の総数は担悪性および良性腫瘍動物数とともに 3000ppm 群で増加がみられ、この増加は肝臓 (肝細胞腺腫および癌) および甲状腺 (濾胞細胞腺腫および癌) の腫瘍の増加に起因していた。雌における腫瘍の発生総数には投与群と対照群間に差は認められなかった。

表 14. 発がん性試験群における全ての腫瘍性病変

性別		雄					雌							
投与量 (ppm)		0	50	250	1500	3000	0	50	250	1500	3000			
死亡/切迫殺例														
検査全動物数		6	8	6	5	9	13	10	9	15	11			
脳	検査組織数	6	8	6	5	9	13	10	9	15	11			
	顆粒細胞腫 (B)		2											
	神経鞘腫 (B)			1										
下垂体	検査組織数	6	8	6	5	9	13	10	9	15	11			
	遠位部腺腫 (B)	3	6	3	3	2	9	6	4	10	2			
	遠位部癌 (M)							1						
甲状腺	検査組織数	6	8	6	5	9	13	9	9	13	11			
	C-細胞腺腫 (B)						2		1	1	1			
	濾胞細胞腺腫 (B)		1			2			1	1				
	C-細胞癌 (M)	1												
肝臓	検査組織数	6	8	6	5	9	13	10	9	15	11			
	肝細胞腺腫 (B)									1	1			
	血管肉腫 (M)				1									
副腎皮質	検査組織数	6	8	6	5	9	13	10	9	15	11			
	癌 (M)				1									
副腎髄質	検査組織数	6	8	6	5	9	13	10	9	14	11			
	褐色細胞腫 (M)									1				
	混合型褐色細胞腫 (M)						1							
膵臓	検査組織数	6	8	6	5	9	13	10	9	15	11			
	島細胞癌 (M)					2								
	腺房細胞腺腫 (B)			1										
前立腺	検査組織数	6	8	6	5	9	/							
	神経鞘腫 (M)					1								
卵巢	検査組織数	/					13	10	9	15	11			
	管間質腺癌 (M)													1
	顆粒膜細胞腫 (M)													1
子宮	検査組織数	/					13	10	9	15	11			
	子宮内膜間質乳頭腫 (B)						3		1	1	1			
	脱落膜腫 (B)									1				
	子宮内膜腺癌 (M)						2	1	1	2	5			
	扁平上皮癌 (M)										1			
子宮内膜間質肉腫 (M)	1		1	1										

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

Fluxapyroxad

皮膚	検査組織数	6	8	6	5	9	13	10	9	15	11
	角化棘細胞腫 (B)	2		1							
	基底細胞腫瘍 (B)	1									
	腺癌 (M)		1								
	線維腫 (B)	1		1							
	神経鞘腫 (M)					1					
腺胃	検査組織数	6	8	6	5	9	13	10	9	15	11
	肉腫 NOS (M)					1					
腸間膜 リンパ節	検査組織数	6	8	6	5	9	13	10	9	14	10
	血管腫 (B)			1					1		
乳腺	検査組織数	/					12	10	9	15	11
	線維腫 (B)						1				
	腺腫 (B)							1			
	線維腺腫 (B)						4		3	4	
	腺癌 (M)						1	2	1		
	線維性組織球腫 (M)				1	1					
骨	検査組織数	1				1	2	2	2	7	1
	歯芽腫 (B/M)								1		
胸髄	検査組織数	6	8	6	5	9	13	10	9	15	11
	寡突起膠腫 (M)								1		
血球系	検査組織数	6	8	6	5	9	13	10	9	15	11
	リンパ腫 (M)	2				1				1	

表 14. 発がん性試験群における全ての腫瘍性病変 (つづき)

最終層級例											
性別		雄					雌				
投与量 (ppm)		0	50	250	1500	3000	0	50	250	1500	3000
検査全動物数		44	42	44	45	41	37	40	41	35	39
脳	検査組織数	44	1	1		41	37	1	2	3	39
	顆粒細胞腫 (B)		1			1					
	顆粒細胞腫 (M)							1			
	髄膜肉腫 (M)					1					
下垂体	検査組織数	44	7	11	15	40	37	21	15	21	39
	中間部腺腫 (B)				1			1			
	遠位部腺腫 (B)	6	4	8	12	8	21	14	11	17	10
	遠位部癌 (M)						1				
	神経鞘腫 (M)			1							
甲状腺	検査組織数	44	42	44	45	41	37	40	41	35	39
	C-細胞腺腫 (B)	5	6	4	2	6	11	6	5	4	7
	濾胞細胞腺腫 (B)	3	1	4	8	7		3		2	2
	C-細胞癌 (M)					1		1			
	濾胞細胞癌 (M)			1	1	3	2		1		1
上皮小体	検査組織数	44	42	44	43	41	32	38	40	35	36
	腺腫 (B)	2		1	1	3		1	2		
胸腺	検査組織数	44				40	36	2	2	1	39
	胸腺腫 (B)					2	4	1	1	1	4
	胸腺腫 (M)	1									
肝臓	検査組織数	44	42	44	45	41	37	40	41	35	39
	肝細胞腺腫 (B)			4	7	15		2		3	6
	肝細胞癌 (M)	1		1	3	9	1	1			
腎臓	検査組織数	44	3	3	7	41	37		1	2	39
	脂肪腫 (B)	1									
	脂肪肉腫 (M)	1									
	腎間葉腫瘍 (M)	1									
脾臓	検査組織数	44	4	3	2	41	37		2	1	39
	血管腫 (B)						1				
	血管肉腫 (M)		1		1						
副腎皮質	検査組織数	44	1	5	8	41	37	20	13	4	39
	腺腫 (B)			1	2						
	癌 (M)					1					

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

Fluxapyroxad

副腎 髄質	検査組織数	44	1	4	5	41	37	13	7	2	39				
	褐色細胞腫 (B)	1	1	1	1			1							
	褐色細胞腫 (M)	1													
	混合型褐色細胞腫 (M)					1		1							
膵臓	検査組織数	44	3		3	41	37		1	1	39				
	島細胞腺腫 (B)	2	1		1						1				
	腺房島細胞腺腫 (B)				1										
精巣	検査組織数	44	8	11	5	41	/								
	ライディット細胞腺腫 (B)	4	1	2	1	2									
	中皮腫 (M)		1	1											
凝固腺	検査組織数	44				41	/								
	腺癌 (B)					1									
貯精囊	検査組織数	44	6	6	9	41	/								
	腺腫 (B)					1									
精巣 上体	検査組織数	44	4	2	2	41	/								
	中皮腫 (M)					1									
	肉腫 NOS (M)	1			1										
卵巢	検査組織数	/					37	14	15	11	39				
	囊胞腺腫 (B)								1						
	管間質腺腫 (B)														1
	管間質腺癌 (M)														1
	顆粒膜細胞腫 (B)											2	2	1	2
	顆粒膜細胞腫 (M)										2				
	卵胞膜細胞腫 (B)										1				
子宮	検査組織数	/					37	20	20	17	39				
	子宮内膜間質乳頭腫 (B)						6	6	6	5	4				
	腺乳頭腫 (B)							1							
	子宮内膜腺癌 (M)						6	6	7	7	6				
	子宮内膜間質肉腫 (M)						1			1	1				
膣	検査組織数	/					36				38				
	線維腫 (B)														1
皮膚	検査組織数	44	5	6	7	41	37		2	1	39				
	角化棘細胞腫 (B)	1	4	4	4	1					1				
	扁平上皮乳頭腫 (B)										1				
	線維腫 (B)		1	1	1										
	線維肉腫 (M)			1	1										
	肉腫 NOS (M)					1			1						

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

Fluxapyroxad

皮膚	血管肉腫 (M)				1						
	神経鞘腫 (M)			1							
前胃	検査組織数	44		1		41	37				39
	扁平上皮乳頭腫 (B)					1					
十二指腸	検査組織数	44				41	37	1			39
	線維肉腫 (M)							1			
直腸	検査組織数	44	1			41	37				39
	腺癌 (M)		1								
腸間膜	検査組織数		1								1
	平滑筋腫 (B)		1								
	中皮腫 (M)										1
腸間膜 リンパ節	検査組織数	44	7	2	7	41	37	2	1	3	39
	リンパ管腫 (M)					1					
	血管腫 (B)	1	2		3	1					
	血管肉腫 (M)		1		1						
乳腺	検査組織数	1	1	1			37	16	10	3	39
	血管腫 (B)										1
	腺腫 (B)						1				
	線維腺腫 (B)	1	1	1			8	13	8	1	5
	腺癌 (M)						3	3		1	1
骨格筋	検査組織数	44	1			41	36	2			39
	血管肉腫 (M)					1		1			
	肉腫 NOS (M)		1								
脂肪 組織	検査組織数	2	3	6		2	3	2	2		1
	脂肪腫 (B)		1	3							
	肉腫 NOS (M)			1							
	中皮腫 (M)			1							
血球系	検査組織数	44	1			41	37			1	39
	リンパ腫 (M)		1							1	

表 14. 発がん性試験群における全ての腫瘍性病変 (つづき)

		全動物									
性別		雄					雌				
投与量 (ppm)		0	50	250	1500	3000	0	50	250	1500	3000
検査全動物数		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
脳	検査組織数	50	9	7	5	50	50	11	11	18	50
	顆粒細胞腫 (B)		3			1					
	顆粒細胞腫 (M)						1				
	神経鞘腫 (M)			1							
	髄膜肉腫 (M)					1					
下垂体	検査組織数	50	15	17	20	49	50	31	24	36	50
	中間部腺腫 (B)				1			1			
	遠位部腺腫 (B)	9	10	11	15	10	30	20	15	27	12
	遠位部癌 (M)						1	1			
	神経鞘腫 (M)			1							
甲状腺	検査組織数	50	50	50	50	50	50	49	50	48	50
	C-細胞腺腫 (B)	5	6	4	2	6	13	6	6	5	8
	濾胞細胞腺腫 (B)	3	2	4	8	9		3	1	3	2
	C-細胞癌 (M)	1				1		1			
	濾胞細胞癌 (M)			1	1	3	2		1		1
上皮小体	検査組織数	50	50	50	48	50	45	46	49	46	47
	腺腫 (B)	2		1	1	3		1	2		
胸腺	検査組織数	50	7	5	5	48	49	11	10	16	49
	胸腺腫 (B)					2	4	1	1	1	4
	胸腺腫 (M)	1									
肝臓	検査組織数	50	50	50	50	50	50	49	50	50	50
	肝細胞腺腫 (B)			4	7 [†]	15 [†]		2		4	7 [†]
	肝細胞癌 (M)	1		1	3	9 [†]	1	1			
	血管肉腫 (M)				1						
腎臓	検査組織数	50	11	9	12	50	50	10	10	17	50
	脂肪腫 (B)	1									
	脂肪肉腫 (M)	1									
	腎間葉腫瘍 (M)	1									
脾臓	検査組織数	50	12	9	7	50	50	10	11	16	50
	血管腫 (B)						1				
	血管肉腫 (M)		1		1						

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

Fluxapyroxad

副腎 皮質	検査組織数	50	9	11	13	50	50	30	22	19	50
	腺腫 (B)			1	2						
	癌 (M)				1	1					
副腎 髄質	検査組織数	50	9	10	10	50	50	23	16	16	50
	褐色細胞腫 (B)	1	1	1	1			1			
	褐色細胞腫 (M)	1								1	
	混合型褐色細胞腫 (M)					1	1	1			
膵臓	検査組織数	50	11	6	8	50	50	10	10	16	50
	島細胞腺腫 (B)	2	1		1						
	島細胞癌 (M)					2					
	腺房島細胞腺腫 (B)				1						
	腺房細胞腺腫 (B)			1							
精巣	検査組織数	50	16	17	10	50					
	ライディット細胞腺腫 (B)	4	1	2	1	2					
	中皮腫 (M)		1	1							
前立腺	検査組織数	50	8	7	7	50					
	神経鞘腫 (M)					1					
凝固腺	検査組織数	50	8	6	5	49					
	腺癌 (B)					1					
貯精嚢	検査組織数	49	14	12	14	49					
	腺腫 (B)					1					
精巣 上体	検査組織数	50	12	8	7	50					
	中皮腫 (M)					1					
	肉腫 NOS (M)	1			1						
卵巣	検査組織数						50	24	24	26	50
	嚢胞腺腫 (B)								1		
	管間質腺腫 (B)										1
	管間質腺癌 (M)										2
	顆粒膜細胞腫 (B)							2	2	1	2
	顆粒膜細胞腫 (M)						2			1	
卵胞膜細胞腫 (B)	1										
子宮	検査組織数						50	30	29	32	50
	子宮内膜間質乳頭腫 (B)						9	6	7	6	5
	腺乳頭腫 (B)							1			
	脱落膜腫 (B)								1		
	子宮内膜腺癌 (M)						8	7	8	9	11
	扁平上皮癌 (M)										1
	子宮内膜間質肉腫 (M)						2		1	2	1

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

Fluxapyroxad

腫	検査組織数 線維腫 (B)						49	10	9	15	49
		50	13	12	12	50	50	10	11	16	50
											1
皮膚	検査組織数	50	13	12	12	50	50	10	11	16	50
	角化棘細胞腫 (B)	3	4	5	4	1					1
	扁平上皮乳頭腫 (B)										1
	基底細胞腫瘍 (B)	1									
	腺癌 (M)		1								
	線維腫 (B)	1	1	2	1						
	線維肉腫 (M)			1	1						
	肉腫 NOS (M)					1			1		
	血管肉腫 (M)				1						
	神経鞘腫 (M)			1		1					
前胃	検査組織数	50	8	7	5	50	50	10	9	15	50
	扁平上皮乳頭腫 (B)					1					
腺胃	検査組織数	50	9	9	5	50	50	11	11	16	50
	肉腫 NOS (M)					1					
十二指腸	検査組織数	47	8	6	4	49	50	11	9	14	50
	線維肉腫 (M)							1			
直腸	検査組織数	49	9	6	5	50	50	10	9	15	50
	腺癌 (M)		1								
腸間膜	検査組織数		1						1	1	6
	平滑筋腫 (B)		1								
	中皮腫 (M)										1
腸間膜 リンパ節	検査組織数	50	15	8	12	50	50	12	10	17	49
	リンパ管腫 (M)					1					
	血管腫 (B)	1	2	1	3	1			1		
	血管肉腫 (M)		1		1						
乳腺	検査組織数	1	1	1			49	26	19	18	50
	血管腫 (B)										1
	線維腫 (B)						1				
	腺腫 (B)						1	1			
	線維腺腫 (B)	1	1	1			12	13	11	5	5
	腺癌 (M)						4	5	1	1	1
線維性組織球腫 (M)									1	1	
骨格筋	検査組織数	50	9	6	5	50	49	12	9	15	50
	血管肉腫 (M)					1		1			
	肉腫 NOS (M)		1								

骨	検査組織数	44				42	39	2	2	7	40	
	歯芽腫 (B/M)								1			
胸髄	検査組織数	50	8	6	5	49	50	10	9	15	50	
	寡突起膠腫 (M)								1			
脂肪組織	検査組織数	2	3	6		2	3	2	2		2	
	脂肪腫 (B)		1	3								
	肉腫 NOS (M)			1								
	中皮腫 (M)			1								
血球系	検査組織数	50	9	6	5	50	50	10	9	16	50	
	リンパ腫 (M)	2	1			1				2		
検査動物総数		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
合計	腫瘍数	良性	35	34	42	49	53	73	59	51	52	51
		悪性	9	8	10	12	26	22	19	12	17	20
		腫瘍総数	44	42	52	61	79	95	78	63	69	71
	担腫瘍動物数	良性	28	26	28	28	32	42	35	30	33	29
		悪性	8	7	9	11	22	17	16	11	16	18
		動物総数	32	32	34	33	41	46	43	36	40	40

B : 良性腫瘍 M : 悪性腫瘍

統計学的解析 (全動物対象のみ実施、合計数については未実施) :

Fisher 直接確率検定 (片側) $\uparrow : p \leq 0.01$

3000 ppm 群の雌雄および 250 ppm 群の雌で体重および体重増加の抑制が認められた。

250 ppm 以上の群の雌雄において、血液生化学的検査で多くの検査項目で変動 (GGT 活性の亢進、T.Pro、Glob、Chol および Ca の増加、T.Bil および Cl の減少等) が認められ、検体によるミクロソーム酵素誘導に起因する変化と考えられた。酵素誘導に関連のある PTT の短縮 (雌 : 250 ppm 以上、雄 1500 ppm 以上) もみられた。投与関連性の病理学的変化は肝臓、甲状腺、歯および大腿骨にみられた。250 ppm 群の雄では対照群に比し有意ではなかったが、背景データを超越する肝細胞腫瘍の増加がみられた。1500 ppm 以上の群では肝臓で肝臓重量の増加を伴う軽微-高度の小葉中心性肝細胞肥大および肝細胞腫瘍 (雌雄) ならびに海綿状変性の増加 (雄)、甲状腺濾胞過形成の増加 (雄) が認められた。さらに、3000 ppm 群では好塩基性変異細胞巢 (NOS) (雄) および好酸性変異細胞巢の増加 (雌)、頭蓋骨で前頭骨骨膜骨化過剰症 (雌雄) が認められた。大腿骨において PPB 染色性陽性みられ、発生頻度および程度は 250 ppm 以上の群の雌雄で、用量依存的に有意に増加し、雌がより増悪していた。骨構造の変化を示唆しているが、病理組織学的に変化がないため、毒性学的意義はないと判断された。また、歯の白変も 1500 ppm 以上の群の雌雄で用量依存的に増加していたが、病理組織学的に異常がなく、投与関連性はあるが毒性影響ではないと判断された。

したがって、無毒性量は 50 ppm (雄 : 2.1 mg/kg/day ; 雌 : 2.7 mg/kg/day) であると考えられる。発がん性は肝細胞腫瘍が 250 ppm 以上の群の雄および 1500 ppm 以上の群の雌で認められた。

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

Fluxapyroxad

11-3. マウスを用いた 18 ヶ月間発がん性試験

(資料 14)

試験機関：

報告書作成年： (GLP 対応) / (改訂版)

検体純度：

試験動物： C57BL/6J Rj 系マウス

発がん試験群： 1 群 雌雄各 50 匹、

衛星群 (血液検査および病理検査用)： 1 群 雌雄各 10 匹

試験開始時週齢： 雄 6-8 週齢 雌 6-7 週齢

試験開始時体重： 雄 19.2-24.8 g (発がん試験群) 19.1-23.9 g (衛星群)

雌 16.6-21.9 g (発がん試験群) 17.0-20.5 g (衛星群)

投与期間： 発がん性試験群； 18 ヶ月間 ()

衛星群； 9 ヶ月間 ()

投与方法： 濃度別に検体を直接飼料に混合して、プレミックスを調製した。これに飼料を混合して、それぞれ 0、150、750、3000 および 6000 ppm の濃度とし、18 ヶ月間にわたって随時摂食させた。なお、衛星群は 0 および 6000 ppm の用量とした。検体を混入した飼料は安定性が保証された期間内で定期的 (1 ヶ月間隔) に調製した。

用量設定根拠：

試験項目および結果：

一般状態および死亡率；一般状態および生死について、毎日観察した。詳細な一般状態の観察は全動物を対象として、投与前期間およびその後、毎週行った。また、動物を標準観察台に移し、以下の項目について検査した。

取り扱い時の異常行動、被毛、皮膚、姿勢、流涎、呼吸、活動/覚醒レベル、振戦、痙攣、異常行動、歩行異常、流涙、眼瞼閉鎖、眼球突出、糞 (外観/硬さ)、尿、瞳孔径

投与終了時の死亡率を表 1 に示す。

衛星群では死亡例は認められなかった。

発がん性試験群では死亡率に投与関連性の影響は認められなかった。なお、6000 ppm 群雄 1 例が 547 日の剖検直前に死亡したので、この群の死亡率は試験終了時の 546 日で 10%あり (表 1) 屠殺時としては 12%となった。早期死亡に関連する投与関連性の病理組織学的所見は認められなかった。

表 1. 死亡率 (%)

試験群	投与期間	性別・投与量 (ppm)										
		雄					雌					
		0	150	750	3000	6000	0	150	750	3000	6000	
衛星群	雄 276 日 雌 274 日	0	/				0	/				0
発がん性試験群	546 日	18	10	20	20	10	22	16	26	18	6	

一般状態異常としては、歯の白変が 3000 および 6000 ppm 群で認められた (表 2)。歯の白変以外に投与関連性の所見は認められなかった。

表 2. 歯の白変の発生率 (%)

性別		雄					雌						
投与量 (ppm)		0	150	750	3000	6000	0	150	750	3000	6000		
衛星群	下顎	0	/				100	0	/				100
発がん性試験群	下顎	0	0	0	44	100	0	0	0	38	100		
	上顎	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2		

体重変化；投与開始日 (0 日) に測定し、投与 13 週までは週 1 回、その後は 4 週間に 1 回全ての生存動物の体重を測定した。

体重および体重増加を表 3 に示す。

衛星群の 6000 ppm 群の体重および体重増加は雄ではほぼ一貫して抑制され、体重は投与 91-231 日まで、体重増加は投与 77 から 259 日まで有意に抑制された。雌では投与 56 日にのみ有意な抑制 (対対照比 92 および 73%; $p \leq 0.01$) が認められ、その後も軽微な抑制が試験終了までみられた。

発がん性試験群の体重および体重増加は雄では 6000 ppm 群でほぼ一貫して抑制され、体重は投与 7 日-483 日まで、体重増加は投与 7-455 日まで、3000 ppm 群でもほぼ一貫して抑制され、体重は投与 56-399 日まで、体重増加は投与 63-343 日まで有意な抑制が認められ、試験終了までほぼ一貫して対照群より低かった。雌では体重および体重増加とも 3000 および 6000 ppm 群で有意な減少が散見され、全般的にわずかな抑制が認められたが、投与開始 1 年以降は対照群と差がほとんど認められなくなった。

表 3. 体重および体重増加量

試験群		投与後 日数	性別・投与量 (ppm)									
			雄				雌					
			150	750	3000	6000	150	750	3000	6000		
衛星群	体重	91日	/				/					
		175日									93 ↓	94
		273日									93 ↓	94
	体重 増加	91日	/				/					
		175日									81 ↓	88
		273日									83 ↓	89
発がん性 試験群	体重	91日			94 ↓	92 ↓			96	96		
		175日			91 ↓	88 ↓			97	94		
		371日			94 ↓	87 ↓			97	94		
		546日			98	93			102	103		
	体重 増加	91日			86 ↓	76 ↓			93	92		
		175日			80 ↓	72 ↓			96	88		
		343日			86 ↓	69 ↓			96	89		
		546日			93	84			109	110		

対照群を 100%とした際の値

統計学的方法：衛星群は Welch t-検定（両側）、発がん性試験群は Dunnett 検定（両側）
↓：p ≤ 0.05、↓：p ≤ 0.01 矢印のない数値は有意差なし。

摂餌量、食餌効率および検体摂取量；投与開始後 13 週間までは毎週 1 回、その後は 4 週間に 1 回、7 日間にわたる摂餌量を全動物について測定し、食餌効率も算出した。

摂餌量および食餌効率ともに、衛星群では有意な減少が、発がん性試験群では有意な増減が散見されたが、用量依存性も一貫性も認められないものであったことから検体投与に起因する毒性所見ではないと判断した。(Dunnett 両側検定 p ≤ 0.05 ないし 0.01)

投与期間中の平均検体摂取量を表 4 に示す。

表 4. 平均検体摂取量

		投与量 (ppm)				
		150	750	3000	6000	
平均検体摂取量 mg/kg/day	衛星群	雄	/			1119
		雌				1512
	発がん性 試験群	雄	21	107	468	996
		雌	33	158	652	1307

飲水量；飲水量の明らかな変化について、給水瓶を目視で毎日観察した。

投与に関連のある明らかな変化は認められなかった。

血液学的検査；発がん性試験群については全生存動物を対象として投与 12 ヶ月（雄 365 日、雌 367 日）後に無麻酔下で尾静脈穿刺により、試験終了時は少なくとも 16 時間絶食さ

せた後、断頭により採血した血液を用いて塗沫標本を作製し、対照群と高用量群について以下の検査を行った。さらに、切迫殺動物についても血液塗沫標本を作製した。
白血球細胞形態赤血球細胞形態、白血球百分比 (WBC-Dif)

生存動物および切迫殺動物ともに血球の細胞形態および白血球像に検体投与の影響は認められなかった。

血液生化学的検査；衛星群の全動物（各群雌雄各 10 例）を対象として投与終了時（雄 276 日後、雌 274 日後）に少なくとも 16 時間絶食させた後、麻酔下で断頭により採血した血液から得た血清を用いて、以下の項目の測定を行った。

アラントランスアミナーゼ (ALT)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、総タンパク (T.Pro)、アルブミン (Alb)、グロブリン (Glob)、トリグリセリド (TG)、コレステロール (Chol)

統計学的有意差の認められた項目を表 5 に示す。

表 5. 血液生化学的検査

性別		雄				雌			
		150	750	3000	6000	150	750	3000	6000
衛星群	ALP	-	-	-		-	-	-	122 ↑
	TG	-	-	-	65 ↓	-	-	-	76
	Chol	-	-	-	43 ↓	-	-	-	71 ↓

対照群を 100%とした際の値

Wilcoxon 検定 (両側) : ↑ : $p \leq 0.05$ 、↓ : $p \leq 0.01$

矢印のない数値は有意差なし。 - : 未実施

6000 ppm 群において、雌雄とも TRIG (雌は有意ではない) および T.Chol の減少、さらに、雌では ALP 活性の亢進が認められた。

臓器重量；試験終了時の全生存動物を対象として、麻酔下で断頭によって屠殺、瀉血後、以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、脾臓、脳、心臓

次表 6 に統計学的有意差の認められた項目を示す。

衛星群では 6000 ppm 群において雌雄とも肝臓の重量および対体重比が雌雄ともに有意に増加した。雌の卵巣重量の減少は軽度体重の抑制に起因すると考えられた。雄の副腎の重量および対体重比の増加が認められたが発がん性試験群の最終屠殺では有意な変化は認められなかったので、衛星群における副腎の増加に投与関連性はないと考えられた。

表 6. 臓器重量

性別		雄				雌				
投与量 (ppm)		150	750	3000	6000	150	750	3000	6000	
衛星群	最終体重	-	-	-	93	-	-	-	89	
	副腎	重量	-	-	-	151↑	-	-	-	
		対体重比	-	-	-	163↑	-	-	-	
	肝臓	重量	-	-	-	136↑	-	-	-	123↑
		対体重比	-	-	-	146↑	-	-	-	136↑
	卵巣	重量	-	-	-	-	-	-	-	87↓
発がん性試験群	最終体重	105	104	98	93	97	104	101	100	
	腎臓	重量			93↓	96↓				
		対体重比								
	肝臓	重量	115↑	114↑	122↑	124↑			109↑	118↑
		対体重比	111	110↑	126↑	132↑			107	116↑
	脾臓	重量		88	75↓	74↓				

対照群を 100%とした際の値

矢印のない数値は有意差なし。 - : 未実施

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

発がん性試験群において、肝臓は雄では 750 ppm 以上の群で重量および対体重比の増加が、雌は 3000 ppm の群で重量の増加が、6000 ppm 群で重量および対体重比の増加が認められた。150 ppm 群の雄で肝臓重量の増加が認められたが、対体重比に有意な変化はなく、病理組織学的に関連する変化もないことから、投与に関連しないと考えられた。

3000 および 6000 ppm 群の雄で腎臓および脾臓の臓器重量が有意に減少したが、対体重比に有意な変化はなく、病理組織学的に関連する変化もないことから、投与に関連しないと考えられた。

肉眼的病理検査；衛星群および発がん性試験群の途中死亡/切迫殺動物および試験終了時の全生存動物について剖検を行った。

主要な肉眼的所見を表 7 に示す。

衛星群で 6000 ppm 群の雌雄で全例に下顎切歯白変が認められた。その他の所見は、用量非依存性であったため投与に関連しないと判断した。

発がん性試験群において、3000 および 6000 ppm 群の雌雄の多数例で下顎および上顎の切歯白変が認められ、用量依存性の増加を示した。750 ppm 群の雌では 1 ないし 2 例に認められた。肝臓の腫大が、投与群の雄で認められたが、悪性リンパ腫または組織球肉腫の浸潤、脂肪変性あるいは肥大に起因していた。雌では対照群と同程度の発生頻度であった。

その他の所見は、用量非依存性あるいは対照群と同程度の発生頻度であり、検体投与に関連しないと判断した。

表 7. 主要な肉眼的病変

性別		雄					雌				
投与量 (ppm)		0	150	750	3000	6000	0	150	750	3000	6000
衛星群											
検査動物数		10	/			10	10	/			10
下顎	左右切歯白変					10					10
発がん性試験群											
検査動物数		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
肝臓	腫大		3	3	3	9	5	1		3	4
	巣状	10	9	15	9	19	10	9	10	13	14
	腫瘤	3	4	2	6	5	4	1		2	2
下顎	左右切歯白変				23	48			2	17	49
上顎	左右切歯白変				9	43			1	11	46

統計検定未実施

病理組織学的検査；肉眼的病理検査を行った動物から、下記の臓器/組織を摘出し、発がん性試験群については対照群、6000 ppm 群の全組織を、中間用量群（150、750 および 3000 ppm）については肝臓、甲状腺、上皮小体および全ての肉眼的異常病変のみをヘマトキシリン・エオジンで染色して病理標本を作製し、鏡検した。衛星群については肝臓、脾臓、甲状腺、上皮小体および全ての肉眼的異常病変のみ発がん性試験群と同様に鏡検した。さらに、発がん性試験群および衛星群とも対照群および 6000 ppm 群の脾臓についてパールプルシアンブルー（PPB）染色し、鉄イオンの検出を行った。中間用量群の脾臓はパラプラスト包埋して病理標本を作製し、鏡検した。なお、上顎および下顎切歯については衛星群の全動物を対象として HE 染色して鏡検したが、病理組織学的所見がみられなかったため、発がん性試験群については病理標本を作製しなかった。大腿骨の鉄沈着について、6000 ppm 群の雄の 6 例を対象として PPB 染色を行った結果、陰性であった。

脳、下垂体、甲状腺、上皮小体、胸腺、気管、肺、鼻腔、咽頭、喉頭、心臓、大動脈、唾液腺（下顎腺、舌下腺）、肝臓、胆嚢、腎臓、脾臓、副腎、膵臓、精巣、卵巣、子宮、卵管、陰、精巣上体、前立腺/貯精嚢（凝固腺を含む）、皮膚、食道、胃（前胃、腺胃）、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、リンパ節（腸間膜および腋窩）、雌の乳腺、骨髓（大腿骨）、大腿骨（膝関節を含む）、胸骨（骨髓を含む）、骨格筋、坐骨神経、ハーダー腺、脊髄（頸髄、胸髄および腰髄）、眼（視神経を含む）、肉眼的異常病変

<衛星群>

非腫瘍性病変： 表 8 に衛星群における主要な非腫瘍性所見を示す。

表 8. 衛星群における主要な非腫瘍性病変

性別		雄					雌					
投与量 (ppm)		0	150	750	3000	6000	0	150	750	3000	6000	
検査動物数		10					10					10
肝臓	脂肪変性 合計	10					10					10
	軽微	2										6
	軽度	4										7
	中等度	3					6					
	高度	1					4					
	大滴性脂肪変性	2					10					2
	門脈周囲肝細胞肥大											3
脾臓	髓外造血	3					1					5
	色素沈着	10					9					10

歯の白変が肉眼的に 6000 ppm 群の雌雄で認められたが、病理組織学的変化はなく、歯の構造に对照群との差が認められなかったため、毒性学的意義はないと考えた。

肝臓の脂肪変性が 6000 ppm 群の雌雄全例で認められ、病変の程度は雄で増悪していた。肝細胞内の大型の脂肪滴は大滴性脂肪変性と診断され、雄では对照群で 2 例に、投与群では全例に認められ、雌では投与群で 2 例に認められた。さらに、雌の投与群では門脈周囲肝細胞肥大が 3 例に認められた。これらの所見は肝臓重量の増加と関連があった。

その他の病変は用量非依存性あるいは对照群と同程度の発生であり、投与関連性はないと考えられた。

腫瘍性病変：9ヵ月間投与した衛星群で腫瘍性病変は認められなかった。

<発がん性試験群>

非腫瘍性病変：表 9 に発がん性試験群における主要な非腫瘍性病変を示す。

肝臓の肝細胞肥大の発生頻度と程度が 6000 ppm 群の雄および 3000 および 6000 ppm 群の雌で増加し、雄では小葉中心性に、雌では門脈域に多く認められた。

肝細胞の脂肪変性が、对照群を含む多くの雌雄で認められ、3000 ppm 群の雄および 6000 ppm 群の雌雄では病変の程度がわずかに増悪しているようであった。脂肪変性のパターンである大滴性脂肪変性の有意な増加が 750 ppm 以上の群の雌雄で認められた。

その他の病変は用量非依存性あるいは对照群と同程度の発生であり、投与関連性はないと考えられた。

腫瘍性病変：肝臓の肝細胞腫瘍の発生率%について本試験および背景データを表10および11に示す。また、本試験の全ての腫瘍性病変を表12に示す。

肝細胞腺腫および癌の発生率に雌雄とも有意差は認められず、用量依存性も認められなかったが、特に150、3000および6000 ppm群雄の肝細胞癌の発生率は最近10年間の7試験の背景データの範囲(0-2%)を超えていた。しかし、それ以前に実施した試験(C58BLマウス)の雄では4/50例(8%)までの肝細胞癌の発生が認められていることからすれば、本試験の腫瘍の発生率に投与関連性はないと考えられた。3000および6000 ppm群の雌における肝細胞腺腫の発生率は背景データの範囲内にあり、投与関連性はないと考えられた。

表 9. 発がん性試験群における主要な非腫瘍性所見

性別		雄					雌				
		0	150	750	3000	6000	0	150	750	3000	6000
投与量 (ppm)		0	150	750	3000	6000	0	150	750	3000	6000
検査動物数		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
肝臓	脂肪変性 合計	36	40	40	40	42	33	39	41	32	41
	軽微	8	11	7	5	7	4	2	5	3	5
	軽度	20	16	14	13	12	15	27	20	5	16
	中等度	7	13	16	15	14	14	10	16	19	18
	高度	1		2	7	9				5	2
	重篤			1							
	大滴性脂肪変性	17	22	30 [↑]	36 [↑]	36 [↑]	14	12	26 [↑]	26 [↑]	29 [↑]
	多病巣性脂肪変性	6	5	6	5	12	5	6	6	5	5
	小葉中心性肝細胞肥大 合計	4	2	2	2	24 [↑]				2	
	軽微	4	2	2	1	12					
	軽度				1	12				2	
	門脈周囲肝細胞肥大 合計	2	1	2	6	5	6	5	11	15 [↑]	47 [↑]
軽微	2	1	2	2	3	4	5	10	10	14	
軽度				4	2	2		1	5	32	
中等度										1	

Fisher 直接確率検定 (片側) ↑ ↓ : $p \leq 0.05$ 、↑↓ : $p \leq 0.01$

その他の臓器では、投与関連性のある特定の腫瘍の増加は認められず、また悪性および良性腫瘍数、担腫瘍動物数の増加は認められなかった。

表 10. 肝臓の腫瘍性病変の発生率 (%)

性別		雄					雌				
		0	150	750	3000	6000	0	150	750	3000	6000
投与量 (ppm)		0	150	750	3000	6000	0	150	750	3000	6000
検査動物数		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
肝臓	肝細胞腺腫 (B)		6	2	2	4				4	6
	肝細胞癌 (M)	2	6	2	6	6	2				
	腺腫/癌発生動物数	2	10	4	8	10	2			4	6

Fisher 直接確率検定 (片側)、有意差なし。

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

Fluxapyroxad

表 11-1. 雄における肝臓の肝細胞腫瘍の発生率の背景データ

試験 番号	試験期間 (月・年)	供試 動物数	肝細胞腺腫		肝細胞癌		肝細胞腺腫+癌	
			動物数	発生率%	動物数	発生率%	動物数	発生率%
88082	08.89-02.91	100	0	0	1	1	1	1
88112	12.90-06.92	100	0	0	0	0	0	0
90128	06.92-01.94	50	0	0	1	2	1	2
91028	11.91-05.93	50	0	0	4	8	4	8
92024	10.92-04.94	50	3	6	3	6	6	12
92070	09.93-03.95	50	0	0	0	0	0	0
94012	10.94-04.96	50	2	4	0	0	2	4
97103	02.98-08.99	50	0	0	0	0	0	0
98106	11.99-05.01	50	2	4	1	2	3	6
98112	11.99-05.01	50	1	2	0	0	1	2
01151	08.04-02.06	50	3	6	1	2	4	8
05082	05.07-11.08	50	0	0	1	2	1	2
01177	05.05-11.06	50	1	2	1	2	2	4
04090	09.06-03.08	50	2	4	0	0	2	4
合計		800	14		13		27	
平均				1.8		1.6		3.4
最大				6		8		12
最小				0		0		0

表中太線より下が本試験よりも過去 10 年内のもの

表 11-2. 雌における肝臓の肝細胞腫瘍の発生率の背景データ

試験 番号	試験期間 (月・年)	供試 動物数	肝細胞腺腫		肝細胞癌		肝細胞腺腫+癌	
			動物数	発生率%	動物数	発生率%	動物数	発生率%
88082	08.89-02.91	100	0	0	1	1	1	1
88112	12.90-06.92	100	0	0	2	2	2	2
90128	06.92-01.94	50	0	0	0	0	0	0
91028	11.91-05.93	50	0	0	1	2	1	2
92024	10.92-04.94	50	0	0	0	0	0	0
92070	09.93-03.95	50	0	0	0	0	0	0
94012	10.94-04.96	50	0	0	0	0	0	0
97103	02.98-08.99	50	1	2	0	0	1	2
98106	11.99-05.01	50	0	0	0	0	0	0
98112	11.99-05.01	50	1	2	0	0	1	2
01151	08.04-02.06	50	2	4	0	0	2	4
05082	05.07-11.08	50	0	0	1	2	1	2
01177	05.05-11.06	50	3	6	1	2	4	8
04090	09.06-03.08	50	0	0	1	2	1	2
合計		800	7		7		14	
平均				0.9		0.9		0.9
最大				6		2		8
最小				0		0		0

表中太線より下が本試験よりも過去 10 年内のもの

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。

Fluxapyroxad

表12. 腫瘍性病変

途中死亡/切迫殺											
性別		雄					雌				
投与量 (ppm)		0	150	750	3000	6000	0	150	750	3000	6000
検査動物数		9	5	10	10	6	11	8	13	9	3
脳	検査組織数	9	5	10	10	6	11	8	13	9	3
	脂肪性過誤腫 (B)		1								
頸髄	検査組織数	9	5	10	10	6	11	8	13	9	3
	神経鞘腫 (B)									1	
眼/視神経	検査組織数	9	5	10	10	6	11	8	13	9	3
	肉腫 NOS (M)					1					
ハート腺	検査組織数	9	5	10	10	6	11	8	13	9	3
	腺腫 (B)	1				1					
肝臓	検査組織数	9	5	10	10	6	11	8	13	9	3
	肝細胞腺腫 (B)									1	
	血管腫 (B)						1				
肺	検査組織数	9	5	10	10	6	11	8	13	9	3
	細気管支肺胞腺腫 (B)		1								
耳下腺	検査組織数				1						
	腺癌 (M)				1						
甲状腺	検査組織数	8	5	10	10	6	11	7	12	9	3
	濾胞細胞腺腫 (B)						1				
下垂体	検査組織数	9	5	10	9	6	10	8	13	8	3
	前葉腺腫 (B)						1			2	
皮膚	検査組織数	9	5	10	10	6	11	8	13	9	3
	線維肉腫 (M)		1							1	
血球系	検査組織数	9	5	10	10	6	11	8	13	9	3
	リンパ腫 (M)			3	4	2	1	3	3	2	
	組織球肉腫 (M)	1		2	1		2	1		2	1

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

Fluxapyroxad

表12. 腫瘍性病変 (つづき)

性別		最終層級													
		雄					雌								
投与量 (ppm)		0	150	750	3000	6000	0	150	750	3000	6000				
検査動物数		41	45	40	40	44	39	42	37	41	47				
脳	検査組織数	41				44	39			1	47				
	顆粒細胞腫瘍 (B)						1				1				
十二指腸	検査組織数	41				44	39				47				
	腺癌 (M)	1													
精巣上体	検査組織数	41	8	14	4	44									
	肉腫 NOS (M)			1											
前胃	検査組織数	41	1	1	2	44	39				47				
	扁平上皮乳頭腫 (B)		1												
膵臓	検査組織数	41	3	1	1	44	39	6	3	8	47				
	腺腫 (B)									1					
	腺癌 (M)			1											
ハダカ一腺	検査組織数	40		1	1	44	39		2	1	46				
	腺腫 (B)	1				1	2		1	1					
空腸	検査組織数	41	8	7	11	44	39	7	8	11	47				
	腺癌 (M)	2		1		1	1			1					
腎臓	検査組織数	41	1	2		44	39	2	1	1	47				
	移行上皮乳頭腫 (B)	1													
肝臓	検査組織数	41	45	40	40	44	39	42	37	41	47				
	肝細胞腺腫 (B)		3	1	1	2				1	3				
	血管腫 (B)			1											
	血管肉腫 (M)				1										
肺	検査組織数	41	4	1	2	44	39	1	1		47				
	細気管支肺胞腺腫 (B)		1	1	2		1	1			1				
	細気管支肺胞癌 (M)	2							1						
甲状腺	検査組織数	40	45	40	40	44	39	41	37	41	47				
	濾胞細胞腺腫 (B)						1				2				
下垂体	検査組織数	41	1		1	43	39	7	7	10	46				
	前葉腺腫 (B)	1					10	7	6	10	17				
脾臓	検査組織数	41	6	2	4	44	39	14	7	12	47				
	血管肉腫 (M)	1													
尿管	検査組織数	1			1	2	1	2		1	1				
	移行上皮乳頭腫 (B)					1		1							
子宮	検査組織数	/					39	30	26	31	47				
	子宮内膜間質核リンパ (B)						1				1				
	子宮内膜間質肉腫 (M)													1	
	平滑筋肉腫 (M)													1	
血球系	検査組織数	41	18	6	7	44	39	10	8	12	47				
	リンパ腫 (M)	11	13	2	6	2	3	8	6	9	7				
	組織球肉腫 (M)	3	4	4	1	4	6	3	3	4	6				

表12. 腫瘍性病変 (つづき)

		全動物									
性別		雄					雌				
投与量 (ppm)		0	150	750	3000	6000	0	150	750	3000	6000
検査動物数		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
脳	検査組織数	50	5	10	10	50	50	8	13	10	50
	脂肪性過誤腫 (B)		1								
	顆粒細胞腫瘍 (B)						1				1
頸髄	検査組織数	50	5	10	10	50	49	8	13	9	50
	神経鞘腫 (B)									1	
十二指腸	検査組織数	49	4	10	8	50	49	8	13	8	49
	腺癌 (M)	1									
精巣上体	検査組織数	50	13	24	14	50					
	肉腫 NOS (M)			1							
眼/視神経	検査組織数	50	5	13	11	50	50	9	16	12	50
	肉腫 NOS (M)					1					
前胃	検査組織数	50	6	11	12	50	50	8	13	9	50
	扁平上皮乳頭腫 (B)		1								
腺胃	検査組織数	50	8	11	11	50	50	14	16	17	50
	腺腫 (B)									1	
	腺癌 (M)			1							
ハゲ一腺	検査組織数	49	5	11	11	50	50	8	15	10	49
	腺腫 (B)	2				2	2		1	1	
空腸	検査組織数	49	13	17	20	50	50	14	20	20	50
	腺癌 (M)	2		1		1	1			1	
腎臓	検査組織数	50	6	12	10	50	50	10	14	10	50
	移行上皮乳頭腫 (B)	1									
肝臓	検査組織数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	肝細胞腺腫 (B)		3	1	1	2				2	3
	血管腫 (B)			1			1				
	血管肉腫 (M)				1						
	肝細胞癌 (M)	1	3	1	3	3	1				
肺	検査組織数	50	9	11	12	50	50	9	14	9	50
	細気管支肺胞腺腫 (B)		2	1	2		1	1			1
	細気管支肺胞癌 (M)	2							1		
耳下腺	検査組織数				1						
	腺癌 (M)				1						
甲状腺	検査組織数	48	50	50	50	50	50	48	49	50	50
	濾胞細胞腺腫 (B)						2				2
下垂体	検査組織数	50	6	10	10	49	49	15	20	18	49
	前葉腺腫 (B)	1					11	7	6	12	17
皮膚	検査組織数	50	14	17	16	50	50	16	21	17	50
	線維肉腫 (M)		1							1	
脾臓	検査組織数	49	11	12	14	50	50	22	20	21	49
	血管腫 (B)										
	血管肉腫 (M)	1									

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

Fluxapyroxad

尿管	検査組織数	1			1	2	1	2		1	1
	移行上皮乳頭腫 (B)					1		1			
子宮	検査組織数						50	38	39	40	50
	子宮内膜間質* リーブ (B)						1				1
	子宮内膜間質肉腫 (M)										1
	平滑筋肉腫 (M)									1	
血球系	検査組織数	50	23	16	17	50	50	18	21	21	50
	リンパ腫 (M)	11	13	5	10	4	4	11	9	11	7
	組織球肉腫 (M)	4	4	6	2	4	8	4	3	6	7
腫瘍合計											
検査動物数		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
腫瘍数	良性	4	6	3	3	5	19	9	7	17	26
	悪性	22	22	15	17	13	14	15	13	21	15
	腫瘍総数	26	28	18	20	18	33	24	20	38	41
担腫瘍動物数	良性	4	6	3	3	5	16	8	7	16	21
	悪性	20	22	15	15	11	14	14	11	18	14
	担腫瘍動物総数	21	25	18	17	16	25	19	17	29	18

B: 良性腫瘍 M: 悪性腫瘍

統計学的解析: Fischer 直接確率検定、有意差なし

本試験では、用量依存性のある切歯の白変が肉眼的に認められ、特に 3000 および 6000 ppm 群の雌雄で多数例に認められたが、病理組織学的変化はないため、毒性学的意義はないと判断した。

投与40週時に検査した衛星群において、6000 ppm群の雌雄ではTGおよびCholの減少、肝臓重量の増加が、さらに雄では体重および体重増加の抑制、肝臓の脂肪変性の増悪、雌ではALPの増加が認められた。

発がん性試験群では750 ppm以上の群の雄で肝臓重量の増加、雌雄で大滴性脂肪変性の増加が認められ、3000 ppm以上の群では、雄で体重/体重増加の抑制、雌で肝臓重量の増加および肝細胞肥大の増加が認められた。6000 ppm群では雌雄ともこれらの所見が認められた。150 ppm群では毒性所見は認められなかったため、無毒性量は150 ppm (雄: 21 mg/kg/day; 雌: 33 mg/kg/day) であった。催腫瘍性は6000 ppm (雄: 996 mg/kg/day; 雌: 1307 mg/kg/day) でも認められなかった。

12. 繁殖毒性及び催奇形性

12-1. ラットを用いた2世代繁殖毒性試験

(資料33)

試験機関¹ :

(GLP 対応)

報告書作成年 :

検体純度 :

試験動物 : Wistar 系ラット CrI:WI (Han) 1群 雌雄各 25 匹

投与開始時週齢 : 雌雄 約 5 週齢

投与開始時体重 (F0 世代) : 雄 125.1-157.6 g 雌 107.7-152.1 g

投与期間 :

F0 世代 ; 4 ヶ月間 ()

F1 世代 ; 4 ヶ月間 ()

投与方法 : 検体の摂取量が 0、10、50 および 300 mg/kg/day となるように、所定量の検体を直接飼料と混合して以下のように混餌を調製した。混餌飼料は自由に摂取させた。なお、対照群の動物には基礎飼料のみを同様に摂取させた。

交配前期間 ; 試験開始 1 週の混餌は馴化期間中の体重および背景データの飼料摂取量 (雄 18 g、雌 15 g) に基づいて混餌濃度を算出した。その後の混餌濃度は、前週の群別および性別の体重および摂取量に基づいて毎週調製した。

交配期間 ; 交配前期間の最後の週に給餌した混餌と同一濃度としたが、同居期間中は雌用の混餌を給餌し、同居翌朝に雌雄を離したときは、雄には雄用の混餌を給餌した。これを交尾が成立するまで続けた。混餌は 1 回調製した。

妊娠期間 ; 雌には交配前期間の最後の週に給餌した混餌と同一濃度の混餌を 1 回調製して給餌した。

哺育期間 ; 雌の摂取量は増加することから、雌には交配前期間の最後の週の混餌濃度の 50% の混餌を 1 回調製して給餌した。

離乳後の雌および交尾成立雄 ; 雄は前週の体重および摂取量に基づいて毎週調製した混餌を屠殺するまで、雌には交配前期間の最後の週に給餌した混餌と同一濃度の混餌を 1 回調製して給餌した。

F1 世代として選抜した離乳 F1 児 ; 全ての腹が離乳するまで、同じ週齢のラットの体重および摂取量の背景データに基づいて調製した混餌を給餌した。

F1 動物 ; 交配前期間の 1 週の混餌は試験 0 日の実体重および背景データの飼料摂取量に基づいて混餌濃度を算出して調製した。その後の混餌は F0 世代と同様にして調製した。離乳後の雌には交配前期間の最後の週に給餌した混餌と同一濃度の混餌を給餌した。

申請者注)

¹ 病理組織学的検査は

で行った。

表 1. 試験計画概要

世代	期間	作業手順	観察/検査項目
F0	生育(73日)		一般状態・生死：毎日観察 体重：週1回測定 摂餌量：週1回6日間の摂取量を測定
	交配(2週間)	雌雄 1:1 で交配。交配は膣垢検査で精子の有無で確認(妊娠0日)。	性周期の観察： 交配3週間前から交尾確認まで 交配状況の観察
	妊娠(3週間)		体重：妊娠0、7、14、20日に測定 摂餌量：妊娠0-7、7-14、14-20日に測定 出産状況の観察
F1	出産	(哺育1日)	新生児数、死産児数、外表異常、性別、生存児体重測定
	哺育(3週間)	哺育4日に1腹の同腹児数を雄4匹、雌4匹に調整(不可能なとき、合計8匹)。	親動物：哺育状況の観察 体重：出産後1、4、7、14、21日に測定 摂餌量： 出産後1-4、4-7、7-14、14-21日に測定
	F1 離乳	継代用の各群の雌雄各25匹を各腹からできる限り1匹ずつ無作為に離乳後に選抜。 次世代として選抜しなかった離乳児の屠殺。	児動物： 生存児数・体重：生後1、4、7、14、21日に測定 性成熟：雄包皮分離日、雌腔開口 剖検：死産児、生後4日屠殺児、哺育時死亡児の外表/内臓異常検査。異常所見は必要によりさらに検査
F1		親動物： 採血	親動物： 血液検査
		離乳後屠殺	剖検時膣垢検査： 性周期の段階の確認。剖検後、子宮の検査 精子形態検査 臓器重量測定 病理組織学的検査(生殖器官を中心)。
	生育(74日)	(F0世代に準ずる)	(F0世代に準ずる)
F2	交配(2週間)	(F0世代に準ずる)	(F0世代に準ずる)
	妊娠(3週間)		(F0世代に準ずる)
	出産		(F0世代に準ずる)
F2	哺育(3週間)		(F0世代に準ずる)
	離乳	児動物：離乳時に屠殺	(F1世代に準ずる)
		親動物：採血 雄は離乳直前、雌は離乳直後に屠殺	(F1離乳児に準ずる) (F0世代に準ずる) (F0世代に準ずる) 卵胞検査

検査項目：

<親動物>

一般状態および生死；全動物の一般状態および生死を投与期間中毎日観察した。

体重；雄は投与開始時とそれ以降毎週、雌は投与開始時とそれ以降交配前期間中毎週および妊娠0、7、14 および20日と出産後1、4、7、14 および21日に測定した。

摂餌量；雌雄とも交配前期間中毎週、さらに雌は妊娠後0-7、7-14、14-20日および出産後1-4、4-7、7-14、14-21日に測定した。

検体摂取量；雌雄とも交配前期間中、また雌は妊娠および哺育期間中について、体重、摂餌量および飼料中検体濃度から検体摂取量(mg/kg/day)を算出した。

交配および妊娠の確認；少なくとも73日間投与後、雌雄1対1で同居・交配させ、翌期腔垢中の精子により交尾を確認し、妊娠0日とした。妊娠は出産および剖検時に子宮内の着床痕の有無を調べて確認した。兄妹交配を避けた。

繁殖性に関する指標；生育、交配、妊娠および哺育の各期間と剖検時に以下の指標について調べた。

(性周期) 交配3週間前から交尾確認まで性周期を観察し、性周期の平均日数を算出

(交尾成立までの期間) 雌雄を同居後、雌の腔垢中に精子を確認するまでの日数

(雄交尾率) $(\text{交尾確認雄数}^a / \text{交配に用いた雄数}) \times 100$

(授精率) $(\text{雌を妊娠させた雄数}^b / \text{交配に用いた雄数}) \times 100$

(雌交尾率) $(\text{交尾確認雌数}^a / \text{交配に用いた雌数}) \times 100$

(受精率) $(\text{妊娠雌数}^b / \text{交尾確認雌数}^a) \times 100$

(出産率) $(\text{出産日に生存児を有する雌数} / \text{妊娠雌数}^b) \times 100$

(着床数) 子宮内の着床痕の数

(着床後胚損失率) $[(\text{着床数} - \text{産児数}) / \text{着床数}] \times 100$

(妊娠期間) 交尾を認めた日(妊娠0日)から出産完了日までの日数

精子；精巣および精巣上体尾部の精子について、運動率、形態(正常および異常形態精子の百分率)および精子頭部数(精巣および精巣上体尾部の形態および精子頭部数の検査は対照群と高用量群のみ実施)について調べた。

類別卵胞数；対照群と高用量群の全F1雌親動物について、両卵巣の近位部から遠位部にかけて5切片を作成して顕微鏡で観察し、Plowchalkらによる定義に従って、原始卵胞、発育卵胞を計数し、原始卵胞と発育卵胞の合計を算出した。

臨床検査；屠殺前にF0(雄：試験15週、雌：試験18週)およびF1(雄：試験14週、雌：試験19週)の雌雄各12匹の親動物から非絶食下で後眼窩静脈叢から穿刺で採血し、アラニントランスアミナーゼ(ALT)、アスパラギン酸アミノ基転移酵素(AST)、アルカリフォスファターゼ(ALP)およびγグルタミルトランスアミナーゼ(GGT)について検査した。

肉眼的病理所見；全てのF0およびF1親動物の肉眼的検査を、特に生殖器官に注意して行った。

臓器重量；最終剖検時まで生存した全てのF0およびF1親動物の以下の臓器重量を測定した。対体重比も算出した。

肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、精巣上体尾部、前立腺、貯精囊(凝固腺を含む)、卵巣、子宮、脾臓、甲状腺(上皮小体を含む)、脳、下垂体

^a 腔垢中の精子または子宮に着床を有する雌で交尾を確認。

^b 子宮に着床を有する雌で妊娠を確認。

病理組織学的検査；肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、以下の組織についてヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色して病理標本を作製し、対照群と高用量群の全てのF0およびF1親動物ならびに低用量群と中間用量群において妊娠率の低下が疑われた雌雄親動物および全群の全ての肉眼的異常部位について鏡検した。なお、副腎、肝臓および甲状腺については全群の全ての動物について鏡検した。鏡検はFraunhofer Institute for Toxicology and Experimental Medicineで行った。卵巣、卵管、子宮、子宮頸部、膣、左精巣、左精巣上体、貯精囊、凝固腺、前立腺、下垂体、副腎、肝臓、甲状腺、肉眼的異常部位
さらに、ホルマリン固定下顎の左側の歯の病理組織学的検査をF0世代の対照群および300mg/kg群の雌雄各2例について、プラスチック包埋、無脱灰で切断研磨、HE染色およびパールプルシアンブルー染色を行い鏡検した。

<児動物>

一般状態および生死；全動物の一般状態および生死を哺育期間中毎日観察し、以下の指標を算出した。

(総産児数) 出生日(生後0日)における生存児と死亡児の合計
(平均産児数(児数/腹)) 総産児数/生存児を出産した母動物数
(生存児出産率) (出産時生存児数/総産児数) x 100
(生存率) (調整前生後4日の生存児数/出生日の生存児数) x 100
(哺育率) (生後21日の生存児数/調整後生後4日の生存児数) x 100
(性比) (生後0または21日の生存雄または雌の児数/生後0または21日の総生存児数) x 100

体重；生後1、4(調整前)、7、14および21日に個体別に測定し、各腹の雌雄別平均体重を基にして、各群の雌雄別平均体重および体重増加を求めた。

性成熟(F1児動物)；雄の包皮分離は生後38日から毎日観察し、分離日の体重を測定した。雌の膣開口は生後27日から毎日観察し、開口日の体重を測定した。

肉眼的病理所見；計画殺(生後4日の調整児および離乳児)した全てのF1およびF2児動物の外表面および内臓の肉眼的検査を行った。異常所見のある児動物については、必要によりさらに検査した。死産児および離乳までの死亡児も外表面および内臓の肉眼的検査を行った。

臓器重量；離乳時に屠殺し、F1およびF2児動物から、腹当たり最初に生まれた雌雄各1匹を選抜して脳、胸腺および脾臓の重量を測定し、生後21日の体重に対する対体重比を算出した。

結果；概要を以下に示す。

親動物(表1)；

(死亡率) 10 mg/kg群のF0世代の雌2例を切迫殺した。これ以外に死亡例は認められなかった。1例は肝臓の中程度の多巣性壊死、子宮の腔拡張、出血、重度の多巣性化膿性および血栓性汎動脈炎がみられ、着床部位に影響があった。他の1例には瀕死状態を説明できる病理組織学的所見は認められなかった。

F1世代では死亡例は認められなかった。

(一般状態) 300 mg/kg群のF0およびF1世代の雌雄とも試験期間中切歯の白変が投与2週以降全例に認められた。

F0世代；雄では全ての群で摂餌量に対照群との差は認められなかったが、300 mg/kg群では体重は投与5週以降試験終了まで有意に抑制され、各週の体重増加は有意な減少が散見され、総体重増加は有意に抑制された。50 mg/kg以下の群では体重および体

重増加に投与の影響は認められなかった。

雌の摂餌量は300 mg/kg群では哺育1-4日を除く全ての測定時点で、50 mg/kg群では生育および妊娠期間中の数測定時点で有意に減少していた。しかし、生育、妊娠および哺育期間中の平均摂餌量に有意差は認められなかったが、対照群より8~10%少なかった。これに伴い、50および300 mg/kg群の体重は投与4週以降哺育期間の終了まで有意に抑制された。妊娠期間中の総体重増加は300mg/kg群では有意に抑制されたが、50 mg/kg群では有意差はみられなかった。哺育期間中の総体重増加は逆に有意に増加した。しかし、対照群と同等までは回復しなかった。10 mg/kg群では7~8週時の体重増加に有意な抑制がみられたのみで、投与に関連しないと判断した。

F1世代： 雄では摂餌量は全ての群で対照群との差は認められなかったが、300 mg/kg群では体重は投与開始時から試験終了まで有意に抑制され、各週の体重増加は有意な減少が散見され、総体重増加は有意に抑制された。50 mg/kg群では体重増加が10-11週のみ有意に抑制されたのみであり、投与の影響は認められなかった。

雌では300 mg/kg群の摂餌量は生育時に投与4-9週まで有意に減少したが、生育時の平均摂餌量に有意な減少はみられなかったが、対照群よりわずかに少なかった(5%)。これに伴い体重は試験期間中有意に抑制され、また生育期間中の総体重増加の抑制を伴っていた。妊娠時の各週の摂餌量は有意に減少していたが、平均摂餌量に有意差は認められなかったが、対照群よりわずかに少なかった(8%)。妊娠時の体重増加に有意差は認められなかったが、わずかに抑制されていた(11%)。哺育時の摂餌量は対照群と同等であったが、体重増加は有意に増加したが、対照群と同等までは回復しなかった。

なお、平均検体摂取量は以下の通りであった。

設定用量

0, 10, 50および300 mg/kg

生育期間

F0世代雄： 0, 9.5, 47.6および285.4 mg/kg

F0世代雌： 0, 9.8, 48.8および292.9 mg/kg

F1世代雄： 0, 9.6, 47.7および285.6 mg/kg

F1世代雌： 0, 9.6, 47.9および288.5 mg/kg

妊娠期間

F0世代雌： 0, 10.2, 53.4および317.8 mg/kg

F1世代雌： 0, 10.5, 53.1および312.1 mg/kg

哺育期間

F0世代雌： 0, 11.8, 61.1および360.2 mg/kg

F1世代雌： 0, 11.9, 61.1および378.5 mg/kg

表 1-1. 親動物：一般状態、体重、摂餌量および検体摂取量

世 代		親：F0 児：F1				親：F1 児：F2				
投与量 (mg/kg/day)		0	10	50	300	0	10	50	300	
動物数	雄	25	25	25	25	25	25	25	25	
	雌	25	25	25	25	25	25	25	25	
一般状態	雄：切歯白変				25				25	
	雌：切歯白変				25				25	
死亡数	雄									
	雌		2							
体重 ^a	雄	生育時 (11週)			93 ↓				89 ↓	
		15/14 週			92 ↓				89 ↓	
	雌	生育時 (10週)			93 ↓	92 ↓			97	91 ↓
		妊娠時 (20日)			94 ↓	91 ↓			96	90 ↓
体重増加 ^a	雄	生育時 (0-15/0-14週)			89 ↓			97	88 ↓	
		雌	生育時 (0-10週)		87 ↓	84 ↓		97	92 ↓	
摂餌量 ^a	雄	妊娠時			86 ↓			93	89	
		哺乳時			151 ↑	169 ↑		116	139 ↑	
		生育時								
検体摂取量 ^b mg/kg/day	雄	生育時		98	95	92			95	
		妊娠時		98	96	92			92	
		哺乳時		98	95	90			98	
検体 摂取量 ^b mg/kg/day	雌	生育時	9.5	47.6	285.4		9.6	47.7	285.6	
		妊娠時	9.8	48.8	292.9		9.6	47.9	288.5	
		哺乳時	10.2	53.4	317.8		10.5	53.1	312.1	
		生育時	11.8	61.1	360.2		11.9	61.1	378.5	

空欄：発生なし、異常なしまは対照群と差なし

^a：表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値である。

^b：生育期：雄は投与0-15週、雌は0-10週、妊娠時：妊娠0-20日、哺乳期：哺乳1-21日の平均値。

統計学的方法：Dunnett(両側)検定：↑↓：p≤0.05、↑↓：p≤0.01

矢印のない数値は有意差なし。

(繁殖性)雄の繁殖性に関する諸項目(交尾率、授精率、精巢および精巢上体の精子数、精子運動率、精子の形態)にF0およびF1世代のいずれの投与群とも投与の影響は認められなかった。

雌の繁殖性に関して、F0世代の50および300 mg/kg群で妊娠期間が有意に短縮(対照群22.5日；50および300 mg/kg群22.1日)していたが、対照群との差は半日以内であり、投与群は背景データ(21.5~22.3日)の範囲内にあり、対照群が背景データの上限を超えていたことによるもので、また、F1世代でこのような差がないことから投与の影響ではないと考えられた。両世代とも性周期、交尾までの日数、交尾率、授精率、受精率、着床数、子宮内胚胎児死亡(着床後胚損失率)、出生時生存児率、死産児数に投与関連性の影響は認められなかった。

表 1-2. 親動物：繁殖能

世 代		親：F0 児：F1				親：F1 児：F2				
投与量 (mg/kg/day)		0	10	50	300	0	10	50	300	
動物数	雄	25	25	25	25	25	25	25	25	
	雌	25	25	25	25	25	25	25	25	
繁殖能	雄	交尾率	100	100	100	100	100	100	100	100
		授精率	96	96	100	100	96	100	92	100
		精子数 ^a 精巢	91	—	—	85	96	—	—	98
		精巢上体尾部	545	—	—	547	372	—	—	345
		運動精子率 (%)	82	84	80	82	85	80	83	81
		正常形態精子率 (%)	99.0	—	—	98.2	98.7	—	—	98.2
		異常形態精子率 (%)	1.0	—	—	1.8	1.3	—	—	1.8
	雌	性周期 (発情日数)	4.1	4.1	4.1	4.4	4.2	4.0	4.0	4.2
		交尾までの日数	2.2	3.0	2.5	2.7	2.8	1.7	2.2	2.8
		交尾率	100	100	100	100	100	100	100	100
		受精率	96	96	100	100	96	100	92	100
		出産率	96	92	100	96	96	100	91	96
		生存児を有する腹数	23	22	25	24	23	25	21	24
		死産児を有する腹数	2	2	2	5	4	2	0	1
生存児のいない腹数	0	0	0	1	0	0	0	0		
妊娠期間 (日)	22.5	22.5	22.1 [↓]	22.1 [↓]	22.0	22.2	21.9	21.9		
総着床数	294	278	296	299	289	298	255	300		
総着床後損失数	22	16	14	20	16	20	16	16		
着床後胚損失率 (%)	10.7	5.6	4.8	8.5	9.3	6.6	13.3	8.4		

—：検査せず 空欄：発生なし、異常なしまたは対照群と差なし

^a：精巢または精巢上体尾部 1g 当りの総精子細胞数 ($\times 10^6$)

統計学的方法：Dunnett (両側) 検定：交尾成立までの日数、妊娠期間、総着床数、着床後胚損失率；

Wilcoxon (片側) 検定：精子数； Wilcoxon + Bonferoni Holm 補正 (片側) 検定：運動精子率 (%)；

Fisher 直接確立検定 (両側)：雄交尾率、授精率； Fisher 直接確立検定 (片側)：雌交尾率、受精率、

生存児/死産児を有する腹数、生存児のいない腹数；[↓]： $p \leq 0.01$

矢印のない数値は有意差なし。

(血液生化学的検査) F0およびF1世代の雌雄ともGGTの有意な増加が、雄ではALT、ALPおよびAST (F1世代のみ)の減少が認められた。雌ではALTの減少、さらにF1世代ではASTおよびALPの減少が認められた。ALT、ASTおよびALPの減少は毒性学的に意義がないと判断される。

表 1-3. 親動物—血液生化学的検査

世 代		親 : F0 児 : F1				親 : F1 児 : F2				
投与量 (mg/kg/day)		0	10	50	300	0	10	50	300	
動物数	雄	12	12	12	12	12	12	12	12	
	雌	12	12	12	12	12	12	12	12	
血液生化学的検査。	雄	ALT				83 ↓				86 ↓
		AST								83 ↓
		ALP				74 ↓				80 ↓
		GGT (nkat/l)	0	0	0	125 ↑	0	0	0	99 ↑
	雌	ALT		89 ↓	87 ↓	76 ↓			79 ↓	77 ↓
		AST								81 ↓
		ALP								68 ↓
		GGT (nkat/l)	0	1	1	38 ↑	0	0	1	54 ↑

空欄：発生なし、異常なしまたは対照群と差なし

*：表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値である。ただし、GGT は実数を示した。

統計学的方法：Kruskal-Wallis+Wilcoxon 検定（両側） ↓：p ≤ 0.05、↑：p ≤ 0.01

矢印のない数値は有意差なし。

（臓器重量）副腎の重量および対体重比の増加（F0世代：300 mg/kg群の雄）ならびに対体重比のみの増加（F0世代：300 mg/kg群の雌、F1世代：300 mg/kg群の雄）が認められ、皮質肥大を伴っていた。50 mg/kg群の両世代の雌でも同様に増加が認められたが、関連する病理組織学的変化を伴っていなかった。

肝臓の重量および対体重比の増加（F0世代：50および300 mg/kg群の雌雄、F1世代：全投与群の雌雄）、対体重比のみの増加（F0世代：10 mg/kg群の雄）で認められ、肝細胞肥大を伴っていた。

甲状腺の対体重比の増加（F0世代：300 mg/kg群の雌雄、F1世代：300 mg/kg群の雌）、さらに、重量および対体重比の増加（F1世代：50および300 mg/kg群の雄）で認められ、濾胞細胞肥大/過形成を伴っていた。

雄で前立腺重量の減少および雌で下垂体重量の減少が50および300 mg/kg群で認められたが、組織学的に関連する病変は認められず、最終体重の低下に起因していると考えられた。また、300 mg/kg群のF0世代の雌およびF1世代の雌雄で認められた脾臓重量の減少も同様に考えられ、組織学的に関連する病変も認められなかった。

F0世代で精巣上体（300 mg/kg群の雄）、精巣（10および300 mg/kg群の雄）、卵巣（50および300 mg/kg群の雌）の対体重比の増加が認められた。F1世代では精巣上体および精巣（300 mg/kg群の雄）、卵巣（300 mg/kg群の雌）の重量の減少が認められた。これらの変動は最終体重の低下に起因しており、臓器に組織学的に関連する病変は認められなかったため、毒性学的意義はないと考えられた。

脳の対体重比のみの増加（F0世代：300 mg/kg群の雄、50および300 mg/kg群の雌、F1世代：50 mg/kg群の雌）ならびに重量の減少および対体重比の増加（F1世代：300 mg/kg群の雌雄）、腎臓の対体重比の増加（F0世代：10および300 mg/kg群の雄、50および300 mg/kg群の雌、F1世代：50および300 mg/kg群の雌雄）が認められたが、これらの臓器については病理組織学的検査をしなかったが、最終体重の低下に起因する二次的变化で投与関連性はないと考えられた。さらに、腎臓では用量依存性も認められなかった。子宮の対体重比の増加がF1世代の50 mg/kg群の雌で認められたが、1例の動物で認められた高度の瀰漫性子宮腫瘍に関連があると考えられた。

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。

Fluxapyroxad

(卵胞検査) 300 mg/kg群のF1の雌について卵胞を検査したが、対照群との差は認められなかった。

表 1-4. 親動物-臓器重量および卵胞検査

世 代		親 : F0 児 : F1				親 : F1 児 : F2				
投与量 (mg/kg/day)		0	10	50	300	0	10	50	300	
動物数	雄	25	25	25	25	25	25	25	25	
	雌	25	25	25	25	25	25	25	25	
雄	最終体重			98	98	90↓		101	97	88↓
	副腎	重量			104	111↑				
		対体重比			106	123↑			105	122↑
	脳	重量								96↓
		対体重比			102	108↑			103	109↑
	肝臓	重量		103	123↑	159↑		108↑	125↑	156↑
		対体重比		105↑	125↑	176↑		107↑	128↑	177↑
	腎臓	対体重比		105 ↑	105	112↑		103	108↑	116↑
	脾臓	重量						95	86↓	
	甲状腺	重量						100	114 ↑	117↑
		対体重比		102	108	123↑		98	117 ↑	132↑
	前立腺	重量		93	91 ↓	87 ↓				
	精巣	重量							102	94 ↓
		対体重比		107 ↑	103	111↑				
精巣上体	重量							99	92 ↓	
	対体重比			102	111↑					
雌	最終体重			98	93↓	91↓		98	96↓	89↓
	副腎	対体重比		100	110 ↑	109 ↑				
	脳	重量								96↓
		対体重比		102	107↑	108↑			103↑	107↑
	肝臓	重量		102	110↑	143↑		103 ↑	109↑	146↑
		対体重比		105	119↑	157↑		104↑	114↑	163↑
	腎臓	対体重比		102	106↑	106↑		108↑	108↑	
	脾臓	重量		95	90 ↓	87↓		101	91↓	
	下垂体	重量		91	83↓	80↓				
	甲状腺	対体重比			106	120↑		103	113	126↑
	卵巣	重量								92 ↓
		対体重比		100	110↑	115↑				
	子宮	対体重比						89	124↑	105
	原始卵胞		-	-	-	-	-	-	-	101.1
発育卵胞		-	-	-	-	-	-	-	97.1	
原始卵胞+発育卵胞		-	-	-	-	-	-	-	100.4	

空欄：発生なし、異常なしまたは対照群と差なし

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値である。

統計学的方法：Kruskal-Wallis H+Wilcoxon検定（両側）：臓器重量

Wilcoxon（片側）検定：卵胞 ↑ ↓ : p ≤ 0.05、↑↓ : p ≤ 0.01

矢印のない数値は有意差なし。 - : 検査せず

(肉眼的および組織学的所見²) 剖検で300 mg/kg群において、F0世代では下顎切歯の白変が雌雄全例、上顎切歯の白変が雄1例に認められ、F1世代では上下顎とも雌雄全例で認められた。用量関連性のある肝臓の変色が認められたが、関連する病理組織学的変化は認められなかった。また、肝臓の用量依存性のある腫大が認められ、300 mg/kg群では大部分の雌雄で認められた。これら以外に投与関連性の所見は認められなかった。

以下のような用量依存性のある病理組織学的変化が甲状腺、肝臓および副腎に認められた。

甲状腺： 瀰漫性濾胞細胞肥大/過形成の発生頻度増加が50および300 mg/kg群のF0およびF1世代の雌雄とも大多数～全例に認められ、病変の強さは用量依存的に増悪し、大部分の動物で軽微ないし軽度の瀰漫性分泌減少を伴っていた。

肝臓： 10 mg/kg群の雌を除く、F0およびF1世代の全ての投与群で顕著な用量依存性のある多葉性ないし瀰漫性の小葉中心性肝細胞肥大が認められた。10 mg/kg群では多葉性の分布パターンを示し、50および300 mg/kg群では瀰漫性を示していた。300 mg/kg群のF0世代の雄では軽微な肝細胞壊死を伴っていた。10 mg/kg群の肥大の強さは他の群に比較して弱く、異物の投与による適応性の変化で悪影響とは考えられなかった。さらに、肝細胞(脂肪性)細胞質空胞化の発生頻度の増加が50および300 mg/kg群のF0世代の雄で認められた。F1世代の雌雄とも50 mg/kg群で細胞質空胞化の有意な増加がみられたが、明瞭な用量依存性は認められなかった。

副腎： 軽微ないし中等度の両側性瀰漫性皮質肥大が300 mg/kg群の両世代の雌雄で、主として束状帯に認められた。この変化は直接的検体投与の影響ではなく、悪影響のある肝臓病変に起因する二次的およびストレス応答性変化であると考えられる。不妊動物の検査で不妊を説明できる病理組織学的変化はF0世代の雌雄とも認められなかった。F1世代では50 mg/kg群の1例で黄体なし、他の1例で子宮の高度の瀰漫性化膿性炎症(子宮膿腫を伴う)および子宮内膜扁平上皮化生、卵管の化膿性炎症、卵巣の萎縮、慢性炎症、上皮嚢胞形成等が認められた。その他の不妊例では不妊を説明できる病理組織学的変化はF1世代の雌雄とも認められなかった。

投与動物において、黄色鉄含有色素はエナメル質成熟域のエナメル芽細胞内およびエナメル色素沈着域に存在しなかった。さらに、歯根および歯冠領域の外エナメル層内の黄色色素は明らかでなかった。歯冠領域では黄色色素は対照群の動物では均等に分布しているのに対して、まったく存在しないあるいは他の数領域で不規則にみられた。したがって、組織学的な唯一の所見はエナメル芽細胞およびエナメル外層の黄色色素の減少であった。歯の白変に関するその他の構造上の形態学的変化は認められなかった。

² 原文780頁 5. Pathology Phase-Reportを参照

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。

Fluxapyroxad

表 1-5. 親動物の成績—剖検および病理組織学的所見

世 代		親 : F0 児 : F1				親 : F1 児 : F2			
投与量 (mg/kg/day)		0	10	50	300	0	10	50	300
動物数 (雌雄各)		25	25	25	25	25	25	25	25
剖検所見									
下顎	切歯白変 (雄/雌)				25/25				25/25
上顎	切歯白変 (雄/雌)				1/0				25/25
肝臓	変色 (雄/雌)			4/3	21/23				22/25
	腫大 (雄/雌)			1/6	23/24			1/0	18/25
	顕著な腺房パターン (雄/雌)				1/0			0/1	
病理組織学的所見									
甲状腺 雌	検査組織数	25	25	25	25	25	25	25	25
	瀰漫性濾胞細胞肥大/過形成 合計			25↑	25↑			25↑	25↑
	軽微			19↑	1			18↑	1
	軽度			6↑	22↑			7↑	22↑
	中等度				2				2
	分泌減少 合計			23↑	25↑			21↑	24↑
軽微			19↑	11↑			15↑	15↑	
軽度			4	14↑			6↑	9↑	
甲状腺 雄	検査組織数	25	25	25	25	25	25	25	25
	瀰漫性濾胞細胞肥大/過形成 合計			21↑	25↑			25↑	25↑
	軽微			17↑	1			21↑	2
	軽度			4	23↑			4	21↑
	中等度				1				2
	分泌減少 合計			18↑	25↑			17↑	25↑
軽微			13↑	13↑			17↑	16↑	
軽度			5	12↑				9↑	
肝臓 雄	検査組織数	25	25	25	25	25	25	25	25
	小葉中心性肝細胞肥大 合計		10↑	25↑	25↑		15↑	25↑	25↑
	軽微		10↑				15↑		
	軽度			23↑				22↑	
	中等度			2	20↑			3	21↑
	高度				5				4
	肝細胞(脂肪性)細胞質空胞化 合計	3	6	18↑	13↑	4	10	14↑	7
	軽微	2	4	17↑	13↑	4	10	14↑	7
	軽度	1	2	1					
	肝細胞壊死 合計				6↑			1	5
軽微				6↑				5	
中等度							1		
小肉芽腫 合計	21	22	21	22	23	23	20	20	
軽微	12	9	19	11	18	13	17	12	
軽度	9	13	2↓	11	5	10	3	8	

空欄：発生なし、異常なしまたは対照群と差なし

統計学的方法：Fisher 直接確率検定 ↑：p≤0.05、↑↑：p≤0.01、↑↑↑：p≤0.001

矢印のない数値は有意差なし。

表 1-5. 親動物の成績－病理組織学的所見（つづき）

世 代		親：F0 児：F1				親：F1 児：F2			
投与量(mg/kg/day)		0	10	50	300	0	10	50	300
動物数（雌雄各）		25	25	25	25	25	25	25	25
肝 臓 雌	検査組織数	25	25	25	25	25	25	25	25
	小葉中心性肝細胞肥大 合計		5	25↑	25↑		5	25↑	25↑
	軽微		5				5		
	軽度			22↑				24↑	
	中等度			3	18↑			1	22↑
	高度				7↑				3
	肝細胞(脂肪性)細胞質空胞化 合計	2	4	8	5	2	3	9↑	5
	軽微	2	3	8	5	2	3	9↑	3
	軽度		1						2
	肝細胞壊死 合計	1	1				1	1	
軽微	1					1	1		
中等度		1							
小肉芽腫 合計	14	14	17	17	17	20	17	16	
軽微	12	12	13	14	13	15	13	12	
軽度	2	2	4	3	4	5	4	4	
副 腎 雄	検査組織数	25	24	25	25	25	25	24	25
	皮質肥大 合計				21↑	1			13↑
	軽微				6↑				7↑
	軽度				14↑	1			6
	中等度				1				
副 腎 雌	検査組織数	25	25	25	25	25	25	25	25
	皮質肥大 合計		1	1	17↑	1			10↑
	軽微		1	1	10↑				8↑
	軽度				7↑	1			2
	中等度								

空欄：発生なし、異常なしまたは対照群と差なし

統計学的方法：Fisher 直接確率検定 ↑：p≤0.05、↑：p≤0.01、↑↑：p≤0.001

矢印のない数値は有意差なし。

児動物（表2）：

（児数）F1およびF2児とも腹当たり平均産児数、出生時生存児率および死産児率に対照群と投与群間に差は認められなかった。F1児の10 mg/kg群で有意な食殺数の増加および生後4日生存児数、F2児の50 mg/kg群で生後21日生存児数の有意な軽度低下がみられたが用量関連性もなく投与に関連しないと考えられた。

（体重）F1児雌雄とも哺育期間中の体重および体重増加は有意に低かった。F2児の体重は雌雄とも生後7日以降、体重増加は生後4日以降有意に抑制された。

（臓器重量）50および300 mg/kg群のF1児および300 mg/kg群のF2児とも脳、胸腺および脾臓重量あるいはその対体重比に有意な変動が表のように認められたが、体重の減少に基づく二次的な変化で毒性学的に意義はないと考えられた。

（肉眼的病理所見）F1およびF2児とも表のような異常（死後自己融解、胸腺出血、横隔膜ヘルニア、腎盂拡張、小型精巣、切歯傾斜、腎臓腫大、無眼球症/小眼球症、胃が空、水腎症、水尿管症、精巣出血）が認められたが、投与関連性の異常は認められなかった。腹あたり異常児数がF1児の300 mg/kg群で、またF2児の50 mg/kg群で有意に増加していたが、発生率はそれぞれ1.4%および2.4%で背景データ（平均4.2%、範囲0.5～15.2%）³以下であり、用量関連性もなかった。

³ 803腹、7769児の検査結果。

(性成熟) F1児において、膣開口日に対照群と投与群間に差は認められなかったが、開口日の平均体重(86.4g)は300 mg/kg群で有意に低かったが、背景データ(範囲85.5~101.5g)⁴の範囲内にあった。包皮分離日は300 mg/kg群で有意なわずかな遅延がみられたが、有意ではないが分離日の体重は対照群よりわずかに低く、性成熟の期間中に体重が有意に抑制されたことによる二次的影響と考えられる。

表 2. 児動物の成績

世 代		親 : F0 児 : F1				親 : F1 児 : F2			
投与量 (mg/kg/day)		0	10	50	300	0	10	50	300
生存児を有する腹数		23	22	25	24	23	25	21	24
児 動 物	一般状態	検体投与の影響なし							
	総産児数 (腹当り児数)	272 (11.8)	262 (11.9)	282 (11.3)	279 (11.2)	273 (11.9)	278 (11.1)	239 (11.4)	284 (11.8)
	死産児総数	6	3	5	7	4	5	0	1
	生存児総数	266	259	277	272	269	273	239	283
	生後4日生存児総数 (腹当り児数)	265 (11.5)	250 [↓] (11.4)	273 (10.9)	271 (10.8)	266 (11.6)	266 (10.6)	239 (11.4)	280 (11.7)
	生後4日調整児数	83	79	77	81	83	81	74	88
	生後4日調整後児数 (腹当り児数)	182 (7.9)	171 (7.8)	196 (7.8)	190 (7.6)	183 (8.0)	185 (7.4)	165 (7.9)	192 (8.0)
	生後21日生存児総数 (腹当り児数)	182 (7.9)	171 (7.8)	196 (7.8)	190 (7.6)	183 (8.0)	185 (7.4)	160 [↓] (7.6)	191 (8.0)
	性比% (雄/雄+雌)								
	哺育0日	51.9	49.4	49.1	45.2	46.1	46.5	49.8	44.5
	哺育21日	51.6	49.7	52.0	46.8	49.2	49.7	50.0	45.5
	生存児出生率 (%)	98	99	98	97	99	98	100	100
	死産児出生率 (%)	2.2	1.1	1.8	2.5	1.5	1.8	0.0	0.4
	死亡児率 (%)	0.4	1.5	0.4	0.4	0.4	1.1	1.3	0.7
	食殺率 (%)	0.0	1.9 [↑]	1.1	0.0	0.7	1.4	0.8	0.7
	生後4日生存率 (%)	100	97 [↓]	99	100	99	97	100	99
	生後21日哺育率 (%)	100	100	100	100	100	100	97 [↓]	99
	包皮分離(日齢)	40.2	40.0	40.4	41.4 [↑]	-	-	-	-
包皮分離日平均体重(g)	163.4	164.9	164.0	159.8	-	-	-	-	
膣開口(日齢)	30.4	31.1	30.4	31.0	-	-	-	-	
膣開口日平均体重(g)	92.7	94.5	90.3	86.4 [↓]	-	-	-	-	

統計学的方法 : Dunnett (両側) 検定 : 産児数、体重、体重増加、包皮分離、膣開口

Fisher の直接確率検定 (片側) : 児数、生存率、哺育率

↓ : p ≤ 0.05, ↑ : p ≤ 0.01 - : 検査せず

⁴ 13試験の平均値。

表 2. 児動物の成績 (つづき)

世 代				親 : F0 児 : F1				親 : F1 児 : F2			
投与量 (mg/kg/day)				0	10	50	300	0	10	50	300
生存児を有する腹数				23	22	25	24	23	25	21	24
児動物	体重 (g) ^a	雄	生後 1 日	7.0	6.7	6.5 ↓	6.3 ↓	6.5	6.8	6.6	6.1
			生後 4 日 ^b	10.9	10.3	9.8 ↓	9.2 ↓	9.9	10.4	10.0	9.2
			生後 14 日	33.9	33.7	31.6 ↓	27.9 ↓	32.3	32.6	32.9	27.8 ↓
			生後 21 日	54.7	54.4	50.7 ↓	44.4 ↓	50.3	51.5	51.7	44.1 ↓
		雌	生後 1 日	6.7	6.3	6.2 ↓	6.0 ↓	6.2	6.4	6.2	5.8
			生後 4 日 ^b	10.5	10.0	9.5 ↓	9.1 ↓	9.6	10.0	9.6	8.9
			生後 14 日	32.9	32.8	30.8 ↓	27.4 ↓	31.4	32.1	32.0	27.1 ↓
			生後 21 日	52.7	52.4	48.8 ↓	43.5 ↓	48.5	50.5	49.8	42.8 ↓
	雄+雌	生後 21 日	53.7	53.3	49.8 ↓	43.9 ↓	49.4	50.7	50.7	43.4 ↓	
	体重増加 (g) ^a	雄	生後 1-4 日	3.8	3.6	3.3 ↓	2.9 ↓	3.4	3.5	3.4	3.0
			生後 4-7 日	6.7	6.6	6.1 ↓	5.3 ↓	6.1	6.3	6.0	5.3 ↓
			生後 4-21 日	43.9	44.1	40.9 ↓	35.2 ↓	40.4	41.2	41.7	35.0 ↓
		雌	生後 1-4 日	3.7	3.5	3.3	3.0 ↓	3.4	3.6	3.4	3.0
生後 4-7 日			6.5	6.4	5.9 ↓	5.2 ↓	6.0	6.2	5.9	5.1 ↓	
生後 4-21 日			42.3	42.5	39.3 ↓	34.5 ↓	39.0	40.6	40.3	34.0 ↓	

a: 平均重量 (g).

b: 児数調整後.

統計学的方法: Dunnett (両側) 検定: ↓: $p \leq 0.05$, ↓↓: $p \leq 0.01$

矢印のない数値は有意差なし。

表 2. 児動物の成績 (つづき)

世 代		親 : F0 児 : F1				親 : F1 児 : F2						
投与量 (mg/kg/day)		0	10	50	300	0	10	50	300			
生存児を有する腹数		23	22	25	24	23	25	21	24			
児動物	臓器重量 a	雄	最終体重		99	93↓	81↓	102	103	88↓		
			脳	重量			96↓					
				対体重比		107↑	120↑			111↑		
			胸腺	重量			73↓			83↓		
		対体重比				92↓			96			
		脾臓	重量			68↓			71↓			
			対体重比			86↓			82↓			
		雌	最終体重		99	93↓	83↓	104	103	88↓		
	脳		重量		97↓	95↓			98			
			対体重比		106↑	116↑			112↑			
	胸腺		重量			76↓			83↓			
		対体重比						95				
	脾臓	重量			70↓			80↓				
		対体重比			86↓			92				
	剖検所見	異常所見	検査児数合計		222	207	229	229	271	274	237	282
			児生存児数		216	204	224	222	267	269	237	281
死産児数			6	3	5	7	4	5	0	1		
異常児数合計			0	4	1	4	2	9	6	5		
異常児を有する腹数			0	2	1	3	2	6	6	4		
異常児数/腹		0.0	2.7	0.4	1.4↑	0.6	3.3	2.4↑	2.1			
異常所見		死後自己融解		0	3	0	0	0	3	0	1	
		胸腺出血		0	0	0	1	0	1	0	1	
		切歯傾斜						0	0	1	0	
		横隔膜ヘルニア		0	0	0	1	0	3	0	0	
	腎盂拡張		0	1	0	2	1	1	1	2		
小型精巣		0	0	1	0	1	0	1	0			
腎臓腫大						0	1	0	0			
無眼球症/小眼球症						0	0	0	1			
胃が空						0	0	1	0			
水腎症						0	0	1	0			
水尿管症						0	0	1	0			
精巣出血						0	0	1	0			

空欄：発生なし、異常なしまたは対照群と差なし

a: 表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値である。

統計学的方法: Kruskal-Wallis H+Wilcoxon 検定 (両側): 臓器重量

Wilcoxon 検定 (片側): 異常児数

↑ ↓ : p ≤ 0.05, ↑ ↓ : p ≤ 0.01

矢印のない数値は有意差なし。

以上の結果より、親動物において標的臓器は肝臓、甲状腺および副腎であった。50 mg/kg群では雌で体重/体重増加の抑制が認められ、F0世代では有意ではないが摂餌量の減少を伴っていた。両世代の雌雄とも肝臓小葉中心性肝細胞肥大、甲状腺の濾胞細胞肥大/過形成および分泌減少が認められ、肝臓の重量増加を伴っていた。さらに、F1世代の雄では甲状腺重量の増加を伴っていた。300 mg/kg群ではこれらの所見に加え、さらに、両世代の雌雄とも体重/体重増加の抑制、GGT活性の亢進、副腎皮質肥大が認められ、これら臓器の重量の増加ないし増加傾向を伴っていた。さらに、

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

Fluxapyroxad

雄では肝細胞限局性壊死も認められた。両世代の雌雄とも歯のエナメル芽細胞およびエナメル外層の黄色色素の減少による切歯の白変が全例で認められたが、構造上の形態学的変化は認められなかった。

児動物において、50 mg/kg群のF1児の雌雄とも離乳前の体重および体重増加の抑制が認められたが、F2児では雌雄とも全く投与の影響は認められなかった。300 mg/kg群ではF1およびF2児とも離乳前の体重および体重増加の抑制が認められた。

したがって、無毒性量は親動物および児動物に対して雌雄とも10 mg/kg/dayと判断される。
(F0世代：雄9.5 mg/kg/day、雌9.8 mg/kg/day、F1世代：雄9.6 mg/kg/day、雌9.6 mg/kg/day)
繁殖性については300 mg/kg/dayでも影響は認められなかった。

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

Fluxapyroxad

12-2. ラットを用いた催奇形性試験

(資料15)

試験機関:

(GLP 対応)

報告書作成年:

検体純度:

試験動物: Wistar 系 CrI:WI (Han) 妊娠ラット 1 群 25 匹

妊娠 0 日週齢: 10-12 週齢

妊娠 0 日体重: 146.1-188.6 g

投与期間: 14 日間()

投与方法: 検体を直接 0.5%カルボキシメチルセルロースに懸濁し、0、25、200 および 1000 mg/kg/day の投与用量で、妊娠 6-19 日まで(着床から出産予定日の 1 日前まで)の 14 日間毎日 1 回経口投与した。なお、対照群の動物には賦形剤のみ同様に投与した。投与液は最長 7 日までの間隔で調製した。産垢中に産栓/精子を確認した日を妊娠 0 日とした。

申請者注)

検査項目:

<母動物>

一般状態、妊娠状態および生死; 毎日観察し、妊娠 0、1、3、6、8、10、13、15、17、19 および 20 日に体重を測定した。摂餌量は妊娠 0 日を除いて、体重測定日に測定した。妊娠 20 日に非絶食麻酔下で後眼窩静脈叢から採血後、帝王切開し、肉眼的病理検査を行い、肝臓および甲状腺(上皮小体を含む)重量、妊娠子宮重量を測定した。ついで黄体数、着床数、死亡・吸収胎児数、生存胎児数および胎盤重量を検査した。

血液学的検査: 以下の項目について検査した。血液塗沫標本は作製したが、検査は実施しなかった。

白血球数(WBC)、赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(Hb)、ヘマトクリット値(HCT)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)、平均赤血球色素濃度(MCHC)、血小板数(PLT)、白血球百分比(WBC-Dif)、網状赤血球数(RET)

血液生化学的検査: 血清を用いて、以下の項目について行った。

アラニントランスアミナーゼ(ALT)、アスパラギン酸アミノ基転移酵素(AST)、アルカリフォスファターゼ(ALP)、γグルタミルトランスアミナーゼ(GGT)、無機リン酸(INP)、カルシウム(Ca)、尿素(Urea)、クレアチニン(Crea)、グルコース(Gluc)、総ビリルビン(T. Bil)、総タンパク(T. Pro)、アルブミン(Alb)、グロブリン(Glob)、

トリグリセリド (TG)、コレステロール (Chol)

病理組織学的検査；全ての群の全ての動物を対象にして甲状腺の病理組織標本を作製して、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い鏡検した。

<胎児>

性別、体重、外表異常、胎盤、臍帯、胎膜、羊水の観察を行ない、胎盤重量の測定を行った。各同腹児群の1/2の胎児については骨格標本を作製し、骨格異常の有無を検査し、残りの胎児については内臓異常の有無を検査した。

結果： 結果の概要を親動物は表1に、児動物は表2に示す。

<母動物>

投与に関連のある一般状態の変化はなく、死亡例も認められなかった。

摂餌量、体重および体重増加、妊娠子宮重量ならびに補正体重増加は対照群と同程度であり、投与の影響は認められなかった。しかし、200 および 1000 mg/kg 群で摂餌量の有意な減少が散見されたが、明確な用量関連性もなかった。投与初期に体重増加の減少が妊娠6-8日に認められたが、投与期間中の体重増加に対照群との差はなく、毒性学的意義はないと考えられた。

血液学的検査結果に投与関連性の影響は認められなかった。白血球分画の絶対数に対照群との差は認められなかったが、好中球の割合が全ての投与群で有意に減少し、リンパ球の割合は有意に増加していた。さらに、25 および 1000 mg/kg 群では好酸球の割合が減少していた。しかし、いずれの値も背景データ(下表「背景データとの比較」参照)の範囲内にあり、毒性学的意義はないと考えられた。

血液生化学的検査では200 および 1000 mg/kg 群でT. Bil が減少し、アルブミンが増加していた。さらに、1000 mg/kg 群ではT. Pro および Ca が増加していた。

最終体重において有意な減少が200 (97%) および 1000 (96%) mg/kg 群で認められた。ただし、極めて軽微な減少であり前日まで有意な減少は認められず、また有意差も5%以下水準であることから投与関連性はないと考えられた。1000 mg/kg 群で有意な肝臓および甲状腺の重量および対体重比の増加が認められ、甲状腺では7/25例が軽度瀰漫性濾胞細胞肥大/過形成を伴っており投与の影響と考えられた。200 mg/kg 群でも甲状腺重量および対体重比の有意な増加が認められ、1/25例にのみ濾胞細胞肥大/過形成を認めたが、毒性学的意義はないと考えられた。25 mg/kg 群で甲状腺の対体重比の有意な増加が認められたが、病理組織学的変化もなく、検体投与の影響ではないと考えられた。

妊娠率は対照群が100%であったのに対して、投与群で84-92%の範囲にあったが、投与以前の事象であり、着床所見に対照群との差も認められないことから、繁殖成績に関して投与の影響はないと考えられた。

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。

Fluxapyroxad

表. 背景データとの比較

	投与量 (mg/kg)	好中球		リンパ球		好酸球	
		絶対数	比率	絶対数	比率	絶対数	比率
本 試 験	0	1.59	33.6	2.94	61.9	0.09	1.9
	25	1.52	30.1	3.35	65.9	0.08	1.7
	200	1.41	30.2	3.12	65.6	0.09	1.9
	1000	1.40	29.9	3.12	66.0	0.08	1.6
背景データ		1.21-1.63	29.4-36.2	2.55-3.37	59.5-66.5	0.04-0.09	0.8-1.9

単位：絶対数 giga/L、比率%

<胎児動物>

胎児に対するすべての検査項目（生存胎児数、性比、体重、胎盤重量、外表、内臓および骨格異常）で投与関連性の変化は認められなかった。

表 1. 母動物の成績

投与量 (mg/kg/day)		対照群	25	200	1000	
1 群当り雌動物数		25	25	25	25	
死亡動物数						
不妊動物数			3	2	4	
妊娠雌動物数 (妊娠率%)		25 (100)	22 (88)	23 (92)	21 (84)	
一般状態		検体投与に起因する異常なし				
体重 ^a		検体投与に起因する異常なし				
体重増加 ^a		検体投与に起因する異常なし				
摂餌量 ^a		検体投与に起因する異常なし				
妊娠子宮重量 ^b (g)		52.1	51.2	48.9	47.2	
補正体重増加 ^{b,c}		38.0	37.5	35.0	34.8	
カーカス重量 ^{b,d}		234.7	235.4	228.4	228.1	
臓器重量	最終体重		98	97↓	96↓	
	肝臓	重量			109↑	
		対体重比			113↑	
	甲状腺	重量		106↑	112↑	
対体重比		109↑	110↑	116↑		
着床所見 ^b	黄体数		11.2	11.5	10.8	11.6
	着床数		10.6	10.3	9.8	9.9
	着床前胚損失率 (%)		4.6	10.9	9.7	11.1
	着床後胚損失率 (%)		7.2	6.3	4.1	12.2
	総胚吸収数		0.8 (7.2)	0.6 (6.3)	0.4 (4.1)	1.0 (12.2)
	早期胚吸収数 (%)		0.7 (6.4)	0.6 (6.3)	0.4 (4.1)	0.9 (11.4)
	後期胚吸収数 (%)		0.1 (0.8)	0	0	0.1 (0.8)
	死亡胎児数		0	0	0	0
	全胚吸収腹数		0	0	0	1
生存胎児を有する腹数		25	22	23	20	
血液検査 ^e	好中球%			90↓	90↓	89↓
	リンパ球%			106↑	106↑	107↑
	好酸球%			89↓		84↓
	Ca					103↑
	T. Bil				76↓	53↓
	T. Pro					106↑
	Alb				104↑	108↑
肉眼的検査		検体投与に起因する異常なし				
病理組織学的検査						
濾胞細胞肥大/過形成		0/25	0/25	1/25	7/25	

空欄は対照群と差なし

a: 摂餌量、体重および体重増加は妊娠母動物のみの平均値。

b: 妊娠子宮重量、補正体重増加、繁殖成績、肝臓重量は屠殺時の妊娠母動物平均値。

c: 補正体重増加 = 最終体重 - (妊娠子宮重量 + 妊娠 6 日の体重)

d: カーカス重量 = 最終体重 - 妊娠子宮重量

e: 表中の数値は変動の目安として群平均値の対照群に対する変動 (%) を示した

統計学的方法: Dunnett 検定 (両側): 体重、体重増加、摂餌量、妊娠子宮重量、補正体重増加、カーカス重量、黄体数、着床数、着床前/後胚損失率、胚吸収数 (率);

Kruskal-Wallis+Wilcoxon 検定 (両側): 血液検査、臓器重量

↑ ↓: p ≤ 0.05, ↑↓: p ≤ 0.01 矢印のない数値は有意差なし

表 2. 胎児の成績

投与量 (mg/kg/day)		対照 (0)	25	200	1000
生存胎児のいる腹数		25	22	23	20
生存胎児総数		247	213	216	188
生存胎児数 ^a 雄雌合計 (腹当たり)	雄	9.9	9.7	9.4	9.4
	雌	5.0	4.8	4.0	4.5
	雌	4.8	4.9	5.4	4.9
性比 (%)	雄	51.0	49.8	42.6	47.9
	雌	49.0	50.2	57.4	52.1
体重 (g)	雄雌合計	3.4	3.4	3.4	3.5
	雄	3.5	3.5	3.6	3.6
	雌	3.3	3.4	3.3	3.3
胎盤重量 (g)		0.43	0.45	0.44	0.43
外表異常	検査胎児 (腹) 数	247 (25)	213 (22)	216 (23)	188 (20)
	奇形胎児総数 (腹数)				
内臓異常	検査胎児 (腹) 数	115 (25)	100 (22)	103 (23)	90 (20)
	奇形胎児総数 (腹数)			1 (1)	
	内臓逆位			1 (1)	
	変異胎児総数 (腹数)	5 (5)			5 (5)
	変異発生率 (%)	4.3 (20)			5.6 (25)
	口蓋皺襞不整				1 (1)
	腕頭動脈短小	1 (1)			1 (1)
	腎盂拡張 尿管拡張	4 (4) 1 (1)			3 (3)
骨格異常	検査胎児 (腹) 数	132 (25)	113 (22)	113 (23)	98 (20)
	奇形胎児総数 (腹数)			1 (1)	
	奇形発生率 (腹発生率) (%)			0.9 (4.3)	
	胸骨裂 (軟骨裂)			1 (1)	
	変異胎児総数 (腹数)	132 (25)	113 (22)	113 (23)	98 (20)
	変異発生率 (腹発生率) (%)	100 (100)	100 (100)	100 (100)	100 (100)
	上後頭骨穴	10 (8)	14 (8)	5 (5)	7 (6)
	基蝶骨不完全骨化	32 (18)	16 (10)	14 (11)	6 (5)
	上後頭骨不完全骨化	33 (17)	24 (14)	30 (16)	24 (13)
	胸骨分節不完全骨化	103 (25)	93 (22)	90 (22)	72 (20)
14 番過剰肋骨	80 (24)	77 (20)	70 (21)	52 (17)	

空欄は発生なし、異常なしまたは対照群と差なし

統計学的方法 : Dunnett 検定 (両側) : 生存胎児数、性比、胎児体重、胎盤重量

Fisher の直接確立検定 (片側) : 胎児所見のある腹数

Wilcoxon 検定 (片側) : 腹当りの奇形および(または)変異胎児の発生率
有意差なし

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

Fluxapyroxad

本試験では、1000 mg/kg 群において、肝臓および甲状腺の重量/対体重比の増加、軽度瀰漫性甲状腺濾胞細胞肥大/過形成が認められた。甲状腺重量の増加に関する機序は機序に関する数試験で明らかにされている。本検体は肝臓での肝ミクロソーム系酵素を誘導し、フェノバルビタールと同様な間接的機序を介して甲状腺に作用し、甲状腺ホルモンの代謝分解を亢進する。ラットはこの作用機序に関して特に高感受性であり、TSHの放出を増加させ、結果として甲状腺重量を増加させることはよく知られている。ヒトではこの間接的機序が適切であるとは考えられない。したがって、本試験で認められた甲状腺重量の増加はヒトのリスク評価にあたって毒性学的意義があるとは考えられない。200 および 1000 mg/kg 群で T.Bil が減少し、Alb が増加していた。さらに、1000 mg/kg 群では T.Pro が増加していたが、これらは肝ミクロソーム系酵素誘導に関連している適応性の変化と考えられる。1000 mg/kg 群では Ca が増加しており、遊離 Ca 濃度の恒常性を維持するための生理的作用として Alb の高値と関連している。したがって、これらの影響に毒性学的意義は無いと考えられる。

以上より、無毒性量は母動物で 25 mg/kg/day (申請者注)、胎児動物では 1000 mg/kg/day と判断される。1000 mg/kg でも催奇形性は認められなかった。

(申請者注)

12-3. ウサギを用いた催奇形性試験

(資料16)

試験機関:

(GLP 対応)

報告書作成年:

検体純度:

供試動物: Himalayan[Cr1:CHBB(HM)]系ウサギ 1群当り人工授精雌 25匹

妊娠0日週齢: 約18-21週齢

妊娠0日体重: 2.2-2.8 kg

投与期間: 23日間 ()

試験(人工授精~屠殺)は4回に分けて行った。

投与方法: 検体を直接0.5%カルボキシメチルセルロースに懸濁し、0、10、25 および 60 mg/kg/day の投与用量で、妊娠6-28日まで(着床から出産予定日の1日前まで)の23日間毎日1回経口投与した。なお、対照群の動物には賦形剤のみ同様に投与した。投与液は最長7日までの間隔で調製した。人工授精した日を妊娠0日とした。

申請者注)

検査項目:

母動物: 一般状態、妊娠状態および生死を毎日観察し、体重は妊娠0、2、4、6、9、11、14、16、19、21、23、25、28 および 29日に、摂餌量は妊娠1日から毎日測定した。妊娠29日に帝王切開し、肉眼的病理検査を行い、子宮および卵巣を摘出し、妊娠子宮重量を測定した。ついで黄体数、着床数、死亡胚(早期吸収胚、後期吸収胚、死亡胎児)数および生存胎児数を検査した。

胎児: 性別、体重、外表異常、胎盤、臍帯、胎膜、羊水の観察を行ない、胎盤重量の測定を行った。全胎児の胸腔および腹腔内臓器の異常(心臓および腎臓は切断して内部構造の異常)の有無を検査した。各腹約半数の胎児の頭部をWilson法に従って横断10切片を作成し断面を検査した。さらに、全胎児の骨格異常の有無を検査した。

結果: 結果の概要を以下の表に示す。

母動物(表1):

(死亡、切迫屠殺) 60 mg/kg 群で妊娠9日に1/25例の誤投与による死亡が発見された。他の1/25例は流産が認められたので屠殺した。10 mg/kg 群で妊娠26日での死亡が発見されたが、前日まで何の状態異常も認められていなかったため、検体投与によるものではない。

(一般状態) 60 mg/kg 群で検体投与関連性のある無脱糞/脱糞減少が8/25例に、流産が1/25例に認められた。これらの動物では摂餌量が減少しており、その結果であると考えられた。10 および 25 mg/kg 群で各1/25例に脱糞減少が認められた。25 mg/kg

群の例は妊娠 27 から 29 日に顕著な摂餌量の減少によるものと考えられる。また、剖検で臍帯ヘルニアおよび脱腸が認められたが、状態不良によるものと考えられ、投与に起因するものではない。

(体重、摂餌量) 60 mg/kg 群の摂餌量で、投与期間中(妊娠 6-28 日)は有意ではないが対照群に比し 78%と少なかった。また投与期間中、妊娠 8-20 日に有意な摂餌量減少が認められた(対照群に対して 55.3-94.6%の摂餌量)が、投与期間中の一過的なものであった。体重は妊娠 16-29 日に有意な抑制、試験終了時は対照群に比し 95%であった。体重増加は妊娠 9-16 日に有意に抑制、投与期間中は対照群に比し 51%で、全試験期間中も有意に抑制(対照群に比し 63%)された。

10 および 25 mg/kg 群では摂餌量、体重および体重増加ともに対照群と同等であった。

補正体重増加〔最終体重-(妊娠子宮重量+妊娠 6 日の体重)〕は対照群を含むすべての群で減少していたが、有意差は認められなかった。

(肉眼的病理所見)すべての群で表のような所見が認められたが、投与関連性のある所見は認められなかった。

(着床所見) 60 mg/kg 群で早期吸収(着床後胚損失率)が有意に高かったが、これは 2 例の着床数が各 1 つのみで、これが損失したために、損失率が 100%となり、この影響が現れたものである。しかしながら、背景データの範囲内にあった。着床 1 つの損失は、対照群を含め一般に認められることであり、60 mg/kg 群の 2 例を除いて算出した着床後胚損失率は表 2 に示すとおり 12.7%で有意差は認められない。早期胚吸収数および吸収率はそれぞれ 0.6 および 9.5%で、有意に高かった。10 および 25 mg/kg 群の着床所見に投与関連性のある変化は認められなかった。

(妊娠子宮重量) 60 mg/kg 群で妊娠子宮重量は対照群に比し 88.3 g 少なく(約 25%減)有意な減少が認められた。しかし、この減少は以下の理由から投与関連性がないと考えられた。

妊娠子宮重量に寄与する主要な要因は腹当り胎児数および生存胎児総数である。全群の平均胎児体重は約 38 g で、60 mg/kg 群と対照群の胎児数の差は約 1 匹であることから、これに羊水と胎盤重量を加えると妊娠子宮重量の対照群との差の約半分を占めることになる。腹当り平均着床数は対照群が 7.5 であるのに対して、60 mg/kg 群は 6.5 と投与開始前から差が生じている。さらに、着床所見で述べたように、60 mg/kg 群では投与関連性のない全胚吸収が認められている。これらの 2 例の子宮重量は 7.8 および 5.7 g で、平均妊娠子宮重量に相当影響している。この 2 例を除外して算出した平均妊娠子宮重量は 299.2 g で、対照群より 17%低い、有意差は認められない。60 mg/kg 群と対照群の胎児体重の差は約 2g で、腹あたり平均胎児数が 6 匹であることから、体重の差は 12 g となり、子宮の重量差の約 14%を占めることになる。したがって、投与関連性や毒性学的な意義があるとは考えられない。

表 1. 母動物の成績概要

投与量 (mg/kg/day)		対照群	10	25	60
1 群当り雌動物数		25	25	25	25
不妊雌動物数		2	1		2
妊娠雌動物数 (%)		23 (92)	24 (96)	25 (100)	23 (92)
死亡数	誤投与後死亡				1
	死亡発見		1		
	流産後屠殺				1
全胚吸収動物数				1	2
生存胎児を有する雌数		23	23	24	19
終了時妊娠雌数		23	23	25	21
一般状態	脱糞なし				2
	脱糞量減少		1	1	8
体重 ^a	妊娠 29 日		98	98	95 ↓
体重増加 ^a	妊娠 0-6 日		81	99	87
	妊娠 6-28 日		77	83	51 ↓
	妊娠 0-29 日		79	89	63 ↓
摂餌量	妊娠 0-6 日		100	103	100
	妊娠 6-28 日		94	97	78
	妊娠 0-29 日		96	98	84
剖検所見	無所見動物数 (%)	21 (84)	21 (84)	19 (76)	16 (64)
	臍帯ヘルニア			1	
	胸腔：血液性体液				1 ^f
	肺：点状出血		1		
	肺葉：左内下側欠損	2		4	1
	胆嚢：欠損				1
	胃：空	1	2 ^e		3
	胃：餌/体液で充満/拡張			1	1
	腎臓：腎盂に白色集塊				1
	小腸/直腸：糞なし		1 ^e		2
	盲腸：壁に黄色点			1	
	水様便			1	
	途中死亡例の着床に特殊所見		1		1
	子宮角末端傷害	1	1		1
流産例の着床に特殊所見				1	
妊娠子宮重量 (g)		359.6	318.0	339.0	271.3 ↓
カーカス重量 (g) ^b		2551.5	2522.8	2516.5	2480.6
補正体重増加 (g) ^c		-55.7	-76.4	-74.1	-99.1

表 1. 母動物の成績概要 (つづき)

投与量 (mg/kg/day)		対照群	10	25	60
1 群当り雌動物数		25	25	25	25
着床 所見 ^d	黄体数 (総数)	8.2 (189)	7.3 (169)	7.6 (191)	7.3 (153)
	着床数 (総数)	7.5 (173)	6.6 (151)	6.8 (170)	6.5 (137)
	着床前胚死亡率 (%)	8.3	11.3	10.3	12.4
	着床後胚損失率 (%)	5.6	9.1	9.3	21.1 ↑
	総胚吸収数 (%)	0.4 (5.6)	0.6 (9.1)	0.6 (9.3)	0.9 (21.1 ↑)
	早期胚吸収数 (%)	0.2 (2.1)	0.3 (5.8)	0.3 (4.4)	0.7 ↑ (18.1 ↑)
	後期胚吸収数 (%)	0.3 (3.5)	0.2 (3.3)	0.3 (4.9)	0.2 (2.9)
	死亡胎児総数	死亡胎児なし			
	全胚吸収の腹数			1	2

^a: 表中の数値は変動の目安として群平均値の対照群に対する変動 (%) を示した。

^b: カーカス重量 = 最終体重 - 妊娠子宮重量

^c: 補正体重増加 = 最終体重 - (妊娠子宮重量 + 妊娠 6 日の体重)

^d: 腹当たり °: 途中死亡例を含む f: 誤投与動物

統計学的方法:

Dunnett 検定 (両側): 体重、摂餌量、体重増加、妊娠子宮重量、補正体重増加、カーカス重量、
着床所見; Fisher 直接確率検定 (片側): 死亡率、妊娠雌数

↑: $p \leq 0.05$, ↓: $p \leq 0.01$ 矢印のない数値は有意差なし。

表 2. 着床数が1個であった60mg/kg群の2例を除いて算出した子宮重量、体重および着床所見データ(太字で示す)および背景データ

投与量(mg/kg/day)	対照群	10	25	60		背景データ(範囲) ^a	
1群当り雌動物数	25	25	25	25			
終了時妊娠雌数	23	23	25	21	19	460	
妊娠子宮重量(g)	359.6	318.0	339.0	271.3 \downarrow	299.2		
カーカス重量(g) ^b	2551.5	2522.8	2516.5	2480.6	2463.6		
補正体重増加(g) ^c	-55.7	-76.4	-74.1	-99.1	-144.0		
着床所見 ^d	黄体数(総数)	8.2 (189)	7.3 (169)	7.6 (191)	7.3 (153)	7.8 (149)	7.9 (6.5-10.2)
	着床数(総数)	7.5 (173)	6.6 (151)	6.8 (170)	6.5 (137)	7.1 (135)	6.8 (5.4-8.0)
	着床前胚死亡率(%)	8.3	11.3	10.3	12.4	10.2	14.3 (3.1-28.9)
	着床後胚損失率(%)	5.6	9.1	9.3	21.1 \uparrow	12.7	11.0 (0.0-50.0)
	総胚吸収数(%)	0.4 (5.6)	0.6 (9.1)	0.6 (9.3)	0.9 (21.1 \uparrow)	0.9 (12.7)	0.7 (0.0-3.1) (10.8(0.0-50.0))
	早期胚吸収数(%)	0.2 (2.1)	0.3 (5.8)	0.3 (4.4)	0.7 \uparrow (18.1 \uparrow)	0.6\uparrow (9.5\uparrow)	データなし
	後期胚吸収数(%)	0.3 (3.5)	0.2 (3.3)	0.3 (4.9)	0.2 (2.9)	0.3 (3.3)	
胎盤重量(g) (雌雄の平均値)	4.5	4.8	4.7	4.4		4.82 (3.27-8.42)	
生存胎児体重(g) 雌雄合計	37.6	38.8	39.1	35.7		37.9 (27.3-48.7)	

^a: 表中の数値は変動の目安として群平均値の対照群に対する変動(%)を示した。

^b: カーカス重量=最終体重-妊娠子宮重量

^c: 補正体重増加=最終体重-(妊娠子宮重量+妊娠6日の体重)

^d: 腹当たり

^e: 交尾動物480例、妊娠動物460例のデータ

統計学的方法:

Dunnett検定(両側): 妊娠子宮重量、補正体重増加、カーカス重量、着床所見

\uparrow : $p \leq 0.05$, \downarrow : $p \leq 0.01$ 矢印のない数値は有意差なし。

胎児動物（表3）：

（性比、胎児体重、胎盤重量）対照群と比較して有意差はなかった。

（胎児の異常）外表奇形が60 mg/kg 群の1例で髄膜瘤/二分脊椎、25 mg/kg 群の1例で右前肢爪欠損が認められたが、用量依存性のない単一動物による所見であることから、投与関連性はないと考えられた。外表変異として肢過屈曲が全試験群で、頭部皮下浮腫が10および60 mg/kg 群で認められ、変異発生胎児総数の腹当り平均発生率は有意に増加していた。60 mg/kg 群における肢過屈曲の腹当り平均発生率は有意に増加しており、軽微な変化が認められた。頭部皮下浮腫は1胎児の発生のみであり、用量依存性もなく投与に関連しないと考えられた。分類不能所見として羊水の変色、胎盤の嚢胞性拡張および類壊死胎盤が対照群および60 mg/kg 群で見られたが、検体投与に関連しないと考えられた。

内臓奇形として小型胸腺、心肥大、筋性部心室中隔欠損、小型肺、横隔膜ヘルニア、小型脾臓、胆嚢欠損、腎臓欠損、副腎欠損、尿管欠損が対照群を含む投与群で認められたが、1例のみの発生、用量依存性がない、あるいは対照群と同等の発生頻度であった。内臓変異として肺葉欠損（左下内側）、頭動脈洞枝位置異常および脳室拡張が認められたが、用量依存性がなく、対照群と同等の発生頻度であった。

分類不能所見として出血性卵巣が対照群を含む投与群で認められたが、用量依存性がなく、対照群と同等の発生頻度であった。

骨格異常として、小型切歯骨、重度奇形頭蓋骨、腰椎欠損、飛散腰椎弓、胸骨分節重度癒合が対照群を含む投与群で認められたが、用量依存性がなく、対照群と同等の発生頻度であった。種々の骨格変異が認められたが、いずれの所見も対照群と投与群間に差は認められなかった。骨の構造に影響のない軟骨の所見を分類不能所見としたが、対照群を含む投与群で認められ、用量依存性がない投与非関連所見であった。

表 3. 胎児の成績

投与量 (mg/kg/day)		対照群	10	25	60
生存胎児を有する雌数		23	23	24	19
生存胎児数 [腹当たり(総数)]		7.1 (163)	6.0 (138)	6.5 (155)	6.2 (118)
雄		3.7 (86)	3.0 (68)	3.0 (71)	3.2 (61)
雌		3.3 (77)	3.0 (70)	3.5 (84)	3.0 (57)
性比% (雄/雄+雌)		52.8	49.3	45.8	51.7
胎盤重量 (g) (雌雄の平均値)		4.5	4.8	4.7	4.4
生存胎児体重 (g) 合計		37.6	38.8	39.1	35.7
雄		37.6	39.0	39.1	35.6
雌		37.1	38.5	38.9	35.9
検査胎児(腹)数		163 (23)	138 (23)	155 (24)	118 (19)
外表異常	奇形：胎児(腹)数			1 (1)	1 (1)
	髄膜瘤/二分脊椎				1 (1)
	右前肢爪欠損			1 (1)	
	変異：胎児(腹)数	6 (4)	5 (4)	4 (3)	14 (8)
	腹当り平均発生率(%)	3.1	3.5	2.4	10.9 ↑
	肢過屈曲：胎児(腹)数	6 (4)	4 (3)	4 (3)	13 (8)
	腹当り平均発生率(%)	3.1	2.9	2.4	10.3 ↑
	頭部皮下浮腫：胎児数(腹数)		1 (1)		1 (1)
	腹当り平均発生率(%)		0.5		0.7
	分類不能所見：胎児数(腹数)	4 (3)			4 (1)
腹当り平均発生率(%)	2.3			3.0	
内臓異常	奇形：胎児(腹)数	7 (6)	6 (5)	2 (2)	3 (3)
	腹当り平均発生率(%)	7.7	4.8	2.8	2.1
	小型胸腺			1 (1)	
	心肥大				1 (1)
	筋性部心室中隔欠損	1 (1)	2 (2)		
	小型肺			1 (1)	
	横隔膜ヘルニア	1 (1)			
	小型脾臓	1 (1)		1 (1)	
	胆嚢欠損	4 (4)	2 (2)		1 (1)
	腎臓欠損	1 (1)	2 (1)	1 (1)	1 (1)
	副腎欠損		2 (1)		
	尿管欠損	1 (1)	2 (1)	1 (1)	1 (1)
	変異：胎児(腹)数	25 (14)	22 (8)	21 (12)	15 (9)
	腹当り平均発生率(%)	17.4	13.9	14.0	12.1
	脳室拡張		1 (1)		
頸動脈洞枝位置異常	4 (4)	5 (4)	1 (1)		
肺葉欠損(左下内側)	21 (11)	16 (4)	21 (12)	15 (9)	
分類不能所見：胎児(腹)数	5 (3)	6 (3)	2 (2)	2 (2)	
腹当り平均発生率(%)	3.0	4.2	1.2	3.7	

表 3. 胎児の成績 (つづき)

投与量 (mg/kg/day)		対照群	10	25	60
生存胎児を有する雌数		23	23	24	19
骨格 異常	奇形：胎児(腹)数	5 (5)	2 (2)	3 (3)	4 (4)
	腹当り平均発生率 (%)	4.8	2.0	3.2	3.6
	小型切歯骨	1 (1)			1 (1)
	重度奇形頭蓋骨/sprayed 腰椎弓				1 (1)
	腰椎欠損	1 (1)		1 (1)	2 (2)
	胸骨分節重度癒合	3 (3)	2 (2)	2 (2)	
	変異：胎児(腹)数	87 (22)	80 (23)	77 (24)	55 (17)
	腹当り平均発生率 (%)	52.7	60.0	51.7	46.5
分類不能所見：胎児(腹)数	38 (15)	26 (13)	30 (13)	14 (8)	
腹当り平均発生率 (%)	22.4	19.3	19.5	13.4	

空欄は発生なし、異常なしまたは対照群と差なし

胎児の検査値の xx (yy) は所見を有する胎児数 (その腹数) を示す。

統計学的方法：Dunnett 検定 (両側)：胎児数、性比、胎盤重量、胎児体重；Fisher 直接確率検定 (片側)：外表および内蔵異常；Wilcoxon 検定 (片側)：腹当り平均奇形/変異発生率 ↑：p ≤ 0.05

本試験では、母動物に対して 60 mg/kg 群で摂餌量の減少が見られ、結果として脱糞量の減少/なしが多数例で認められた。体重/体重増加の抑制、外表変異 (肢過屈曲) の腹当り異常胎児数の増加が認められた。顕著な摂餌量の減少を伴い 1 例で流産が認められた。25 mg/kg 以下の群では毒性所見は認められなかった。また、胎児発生における奇形・変異 (外表・内臓・骨格) は、60 mg/kg 投与でも認められなかった。

したがって、無毒性量 (NOAEL) は母動物・胎児ともに 25 mg/kg/day であると判断される。催奇形性は 60 mg/kg/day でも認められなかった。

13. 変異原性

13-1. 遺伝子突然変異

13-1-1. 細菌を用いた復帰突然変異試験：Ames試験

(資料17)

試験機関：

(GLP対応)

報告書作成年：

検体度：

方法： Ames試験

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA100、TA1537、TA98株) およ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) の存在下および非存在下で、標準プレート法 (Amesら) およびプレインキュベーション法 (矢作、松島ら) により変異原性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、試験濃度は OECD 471 等に基づき最高 5000 μg /プレートとした。試験は3反復で行った。

(実験1) \pm S9 mix標準プレート法

濃度：0、20、100、500、2500、5000 μg /プレート (TA1535、TA100、TA1537、TA98、WP2 uvrA)

(実験2) \pm S9 mixプレインキュベーション法

濃度：0、20、100、500、2500、5000 μg /プレート (TA1535、TA100、TA1537、TA98、WP2 uvrA)

結果： 標準プレート法およびプレインキュベーション法共に his+ 変異体数の軽度減少が、菌株および濃度 (約 500 μg /プレート以上) により時々観察された。

標準プレート法 S9 mix 非存在下の 100 μg /プレートにおいて TA1535 株で his+ 変異体数の軽度増加が 2/3 プレート (変異体コロニー数平均 22) で認められた。しかし、この増加に濃度依存性はなく、プレインキュベーション法では増加は認められず、背景データ (2005年6月-2007年11月に実施した 400 プレートの値：平均 16、範囲 10-25) の範囲内にあり、陽性の判断基準である溶媒対照の変異体数の 2 倍以上 (100 μg /プレート：1.7倍) にも合致しなかった。

検体は代謝活性化系の存在下および非存在下において、5000 μg /プレートの濃度でも復帰変異コロニー数の増加を認めなかった。

検体の沈殿が代謝活性化系の存在下および非存在下に係わらず、全ての菌株の 500 μg /プレート以上の濃度で認められた。

一方、陽性対照として用いた 2-AA (2-aminoanthracene)、MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)、AAC (9-aminoacridine chloride monohydrate)、4-NQO (4-nitroquinoline-N-oxide) および NOPD (4-nitro-o-phenylenediamine) 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。

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。

Fluxapyroxad

標準プレート法 (太字は3反復の平均値を示す)

薬物	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										
			WP2 uvrA			TA1535			TA100			TA1537			TA98							
対照 (DMSO)	-	-	53	35	41	43	12	14	14	13	105	99	124	109	7	7	9	8	18	25	26	23
検体	20	-	37	39	27	34	14	12	16	14	106	117	107	110	9	8	9	9	19	20	29	23
	100	-	44	27	44	38	23	17	26	22	99	138	114	117	11	4	7	7	22	25	23	23
	500*	-	34	31	35	33	17	13	18	16	114	82	99	98	7	8	7	7	17	23	20	20
	2500*	-	35	38	35	36	10	13	13	12	99	40	62	67	4	3	3	3	24	20	14	19
	5000*	-	29	39	29	32	6	10	1	6	34	20	41	32	3	1	3	2	7	8	6	7
対照 (DMSO)	+	+	43	44	40	42	18	16	16	17	103	125	98	109	8	10	11	10	35	29	39	34
検体	20	+	48	34	59	47	10	17	16	14	113	106	102	107	11	9	9	10	47	20	41	36
	100	+	44	46	50	47	12	11	11	11	121	111	102	111	11	7	9	9	44	31	39	38
	500*	+	31	36	35	34	11	13	13	12	98	81	108	96	8	7	3	6	34	15	26	25
	2500*	+	34	40	37	37	8	7	8	8	90	70	87	82	8	9	1	6	19	16	14	16
	5000*	+	39	35	35	36	6	8	6	7	61	40	51	51	4	2	0	2	10	11	8	10
陽性 対照 **	2-AA 2.5	+					107	114	139	120	798	625	782	735	117	140	124	127	808	674	843	775
	2-AA 60	+	157	259	201	206																
	MNNG 5	-					599	517	526	547	622	662	665	650								
	AAC 100	-													411	331	398	380				
	NOPD 10	-																	426	497	447	457
	4-NQO 5.0	-	803	848	836	829																

* : 全ての菌株で不溶性沈殿物を認める。

** : 2-AA: 2-aminoanthracene

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

AAC: 9-aminoacridine

NOPD: 4-nitro-o-phenylenediamine

4-NQO: 4-nitroquinoline-N-oxide

*** : 3反復の個別値を示し、太字は平均値を示す。

ブレインキューベーション法 (太字は3反復の平均値を示す)

薬物	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									
			WP2 uvrA				TA1535				TA100		TA1537			TA98						
対照 (DMSO)	-	-	27	30	33	30	14	15	14	14	102	102	108	104	7	8	12	9	27	27	31	28
検体	20	-	32	37	28	32	14	18	17	16	112	100	111	108	4	7	7	6	24	31	26	27
	100	-	34	36	31	34	16	16	14	15	104	99	90	98	4	6	9	6	26	22	29	26
	500*	-	20	34	34	30	16	15	13	15	100	100	93	98	8	4	6	6	25	17	26	23
	2500*	-	28	37	36	34	14	10	13	12	99	102	44	82	3	8	8	6	18	16	16	17
	5000*	-	37	21	24	27	5	9	8	7	70	66	82	73	2	4	1	2	11	5	12	9
対照 (DMSO)	-	+	31	27	29	29	16	12	15	14	96	101	107	101	10	7	8	8	37	30	31	33
検体	20	+	45	34	24	34	14	12	18	15	96	109	111	105	6	11	6	8	29	39	31	33
	100	+	35	28	34	32	16	11	19	15	80	114	104	99	4	9	10	8	34	31	28	31
	500*	+	28	36	34	33	11	18	9	13	105	105	100	103	7	9	6	7	33	36	27	32
	2500*	+	25	41	31	32	9	16	13	13	97	103	100	100	4	7	5	5	20	35	21	25
	5000*	+	28	21	22	24	15	12	8	12	90	77	64	77	4	1	1	2	14	10	10	11
陽性 対照 **	2-AA 2.5	+					160	99	92	117	753	751	718	741	120	109	111	113	570	540	561	557
	2-AA 60	+	217	190	184	197																
	MNNG 5	-					1058	1005	972	1012	1241	1023	1274	1179								
	AAC 100	-													418	441	436	432				
	NOPD 10	-																	417	400	429	415
	4-NQO 5.0	-	772	782	818	791																

* : 全ての菌株で不溶性沈殿物を認める。

** : 2-AA: 2-aminoanthracene

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

AAC: 9-aminoacridine

NOPD: 4-nitro-o-phenylenediamine

4-NQO: 4-nitroquinoline-N-oxide

*** : 3反復の個別値を示し、太字は平均値を示す。

13-1-2. 細菌を用いた復帰突然変異試験 : Ames試験

(資料18)

試験機関:

(GLP対応)

報告書作成年:

検体純度:

方法: Ames試験

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535, TA100, TA1537, TA98株) およ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) の存在下および非存在下で、標準プレート法 (Amesら) およびプレインキュベーション法 (矢作、松島ら) により変異原性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、純度を考慮して最高 5300 μg /プレートとし、以下の実験を3反復で行った。

(実験1) \pm S9 mix標準プレート法

濃度: 0, 21, 106, 530, 2650, 5300 μg /プレート (TA1535, TA100, TA1537, TA98, WP2 uvrA)

(実験2) \pm S9 mixプレインキュベーション法

濃度: 0, 21, 106, 530, 2650, 5300 μg /プレート (TA1535, TA100, WP2 uvrA)

濃度: 0, 11, 53, 265, 1325, 2650 μg /プレート (TA1537)

濃度: 0, 2, 11, 53, 265, 530 μg /プレート (TA98)

結果: 標準プレート法およびプレインキュベーション法共に his⁺ または trp⁺ 変異体数の軽度減少が、菌株および濃度 (標準プレート法: 530 μg /プレート以上、プレインキュベーション法: 265 μg /プレート以上) により観察された。

検体は代謝活性化系の存在下および非存在下において、全ての濃度で復帰変異コロニー数の増加を認めなかった。

検体の沈殿が代謝活性化系の存在下および非存在下に係わらず、全ての菌株の 530 μg /プレート以上の濃度で認められた。

一方、陽性対照として用いた 2-AA (2-aminoanthracene)、MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine)、AAC (9-amino-acridine chloride monohydrate)、4-NQO (4-nitro-quinoline-N-oxide) および NOPD (4-nitro-o-phenylene-diamine) 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。

実験1. 標準プレート法 (太字は3反復の平均値を示す)

薬物	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										
			WP2 uvrA			TA1535			TA100			TA1537			TA98							
対照 (DMSO)	-	-	39	34	30	34	15	18	17	17	109	104	98	104	8	8	9	8	27	27	27	27
検体	21	-	28	36	30	31	15	13	21	16	77	108	92	92	7	9	7	8	22	27	20	23
	106	-	37	32	31	33	19	12	14	15	104	114	91	103	10	3	7	7	24	31	19	25
	530*	-	30	28	36	31	14	17	21	17	114	88	118	107	6	3	5	5	17	16	19	17
	2650*	-	36	29	27	31	15	16	10	14	92	88	84	88	2	1	2	2	13	10	8	10
	5300*	-	32	30	33	32	8	1	9	6	72	60	52	61	1	2	3	2	6	9	7	7
対照 (DMSO)	+	+	44	36	40	40	21	18	17	19	135	114	132	127	7	9	6	7	34	36	31	34
検体	21	+	31	26	40	32	16	12	15	14	128	125	115	123	7	8	5	7	27	30	28	28
	106	+	37	29	39	35	18	14	18	17	139	141	146	142	9	7	5	7	30	28	30	29
	530*	+	35	24	37	32	16	13	18	16	137	109	135	127	5	8	8	7	24	18	25	22
	2650*	+	36	25	21	27	17	13	12	14	80	86	78	81	3	4	3	3	11	14	11	12
	5300*	+	24	20	29	24	10	8	6	8	70	68	52	63	4	2	2	3	12	13	12	12
陽性 対照 **	2-AA 2.5	+					155	124	168	149	640	660	700	667	170	180	166	172	594	552	522	556
	2-AA 60	+	221	247	238	235																
	MNNG 5	-					559	578	658	598	697	712	714	708								
	AAC 100	-													384	379	402	388				
	NOPD 10	-																	355	368	380	368
	4-NQO 5.0	-	779	890	866	845																

* : 全ての菌株で不溶性沈殿物を認める。

** : 2-AA: 2-aminoanthracene

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

AAC: 9-aminoacridine

NOPD: 4-nitro-o-phenylenediamine

4-NQO: 4-nitroquinoline-N-oxide

*** : 3反復の個別値を示し、太字は平均値を示す。

実験2. プレインキュベーション法 (太字は3反復の平均値を示す)

薬物	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											
			WP2 uvrA				TA1535				TA100			
対照 (DMSO)		-	31	28	26	28	19	14	21	18	111	99	119	110
検体	21	-	28	31	34	31	17	21	22	20	113	120	92	108
	106	-	28	29	31	29	19	16	14	16	113	109	112	111
	530*	-	21	34	28	28	16	19	16	17	120	111	90	107
	2650*	-	34	29	21	28	12	14	13	13	82	90	78	83
	5300*	-	14	18	16	16	10	14	9	11	52	44	34	43
対照 (DMSO)		+	41	37	30	36	22	15	18	18	120	101	97	106
検体	21	+	36	29	44	36	17	24	16	19	116	130	102	116
	106	+	24	51	34	36	14	13	20	16	91	126	100	106
	530*	+	34	41	31	35	20	17	19	19	70	92	110	91
	2650*	+	28	21	14	21	21	15	18	18	66	81	70	72
	5300*	+	16	12	12	13	14	7	5	9	52	60	31	48
陽性 対照	2-AA 2.5	+					135	150	129	138	964	821	788	858
	2-AA 60	+	224	298	241	254								
	MNNG 5	-					665	678	702	682	887	735	830	817
	4-NQO 5.0	-	533	507	554	531								

* : 全ての菌株で不溶性沈殿物を認める。

** : 2-AA: 2-aminoanthracene

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

4-NQO: 4-nitroquinoline-N-oxide

*** : 3反復の個別値を示し、太字は平均値を示す。

実験2. プレインキュベーション法 (太字は3反復の平均値を示す)

薬物	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***				薬物	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***			
			TA1537							TA98			
対照 (DMSO)		-	9	6	9	8	対照 (DMSO)	-	24	19	21	21	
検体	11	-	7	9	9	8	検体	2	-	24	18	31	24
	53	-	10	7	8	8		11	-	15	28	29	24
	265	-	9	6	7	7		53	-	34	18	26	26
	1325*	-	8	7	6	7		265	-	21	14	19	18
	2650*	-	2	4	4	3		530*	-	11	9	9	10
対照 (DMSO)		+	10	5	7	7	対照 (DMSO)	+	31	28	34	31	
検体	11	+	11	8	10	10	検体	2	+	36	28	34	33
	53	+	7	4	9	7		11	+	18	29	26	24
	265	+	8	10	8	9		53	+	26	28	34	29
	1325*	+	4	1	2	2		265	+	29	12	14	18
	2650*	+	1	3	2	2		530*	+	10	8	7	8
陽性	2-AA 2.5	+	156	111	124	130	陽性	2-AA 2.5	+	665	634	670	656
対照	AAC 100	-	355	397	406	386	対照	AAC 100	-				
**	NOPD 10	-					**	NOPD 10	-	558	537	509	535

* : 全ての菌株で不溶性沈殿物を認める。

** : 2-AA: 2-aminoanthracene

AAC: 9-aminoacridine

NOPD: 4-nitro-o-phenylenediamine

*** : 3反復の個別値を示し、太字は平均値を示す。

13-1-3. チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO-K1細胞株) を用いた遺伝子突然変異試験: HPRT
試験 (資料19)

試験機関:

(GLP対応)

報告書作成年:

検体純度:

試験方法: HPRT試験

チャイニーズハムスター卵巣細胞由来の培養細胞 (CHO-K1細胞) 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 (S9 mix) の存在下および非存在下で3回行った。溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。

用量設定根拠:

(実験1) (\pm S9 mixで4時間処理) : 0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0 μ g/mL

実験1で相対コロニー形成率が \pm S9 mixにおいて50 μ g/mLおよび+S9 mixにおいて20 μ g/mLで10-20%であったので、濃度を変更して実験2を行った。

(実験2) (-S9 mixで24時間処理、+S9 mixで4時間処理) :

\pm S9 mix : 0, 6.3, 12.5, 25.0, 50.0, 75.0, 100.0 μ g/mL

陽性対照 [S9 mixの非存在下ではエチルメタンサルホネート (EMS) 300 μ g/mL, S9 mixの存在下では3-メチルコラントレン (MCA) 10 μ g/mL] および陰性 (溶媒) 対照も同様に試験した。

自然HPRT欠損突然変異体を除去するために細胞を播種し ($3-5 \times 10^5$ 個/フラスコ)、HAT培地で3-4日間培養し、さらに、血清添加Ham's F12培地で継代し、3-4日間培養を継続した。2回継代培養後の対数増殖期の細胞 1×10^6 個/フラスコを血清添加Ham's F12培地に播種し、20-24時間培養し、試験に用いた。附着期間後、代謝活性化系の非存在下および存在下で、無血清培地中で4時間または血清添加培地中で24時間検体処理を行った。細胞をHank's平衡塩溶液 (HBSS) で洗浄後、血清添加Ham's F12培地を加え3日間 (4時間処理) または2日間 (24時間処理) 培養後、1回目の継代を行った。6-8日の全発現期間後、2回目の継代培養時に、選択培地 (6-チオグアニン10 μ g/mL添加) を含むシャーレに約 3×10^5 細胞/フラスコを播種した。培養6-8日後、コロニーを固定・染色して計測した。

細胞毒性 (CE1=コロニー形成率1) は、血清添加Ham's F12培地を入れたフラスコに

約200細胞を播種し、20-24時間の付着時間経過後、細胞を溶媒、検体あるいは陽性対照で4または24時間処理した後、HBSSで数回洗浄し、血清添加Ham's F12培地に交換した。

処理時間経過後の変異率の測定 (CE2=コロニー形成率2) は変異体の選択と並行して行い、血清添加Ham's F12培地に約200細胞/フラスコを播種した。

CE1およびCE2とも、培地を交換または播種後、約5-8日間培養し、固定・染色してコロニー数を計測した。

pHはS9 mixの非存在下および存在下の処理群の少なくとも2高濃度、溶媒対照について、浸透圧はS9 mixの非存在下および存在下の処理群の少なくとも最高濃度、溶媒対照について測定した。また検体の沈殿の有無について培地に検体を処理直後および処理終了時に、細胞形態に関して処理終了時に検査した。

結果： 細胞毒性および突然変異頻度を表2-3、培養細胞の状態および培養条件について表4に示した。

突然変異誘発性；検体は2回の試験において代謝活性化系の有無に係らず、いずれの濃度においても補正突然変異頻度 (0.27-5.64/10⁶細胞) は背景溶媒対照データ (-S9 mix : 0.00-14.73/10⁶細胞、+S9 mix : 0.00-9.38/10⁶細胞) の範囲内にあり、増加は認められなかった。なお、24時間処理の背景データは蓄積されていないが、無処理および溶媒対照は4時間処理の背景溶媒対照データの範囲内にあった。

一方、陽性対照として用いたEMSおよびMCAでは明らかな突然変異頻度の増加を示した。

実験ごとの培養細胞の状態および培養条件は以下の通りであった。

実験1 (±S9 mixで4時間処理) ；

-S9 mixでは20.0 μg/mL以上の濃度で実験終了時に細胞接着に対する障害 (少数の細胞が円形) が認められ、100.0 μg/mLでは細胞密度が顕著に減少し、50 μg/mL以上ではコロニー形成率1は明らかに減少していた (相対コロニー形成率 ; 50.0 μg/mL : 18.0%) 。

+S9 mixでは100.0 μg/mLで実験終了時に細胞接着に対する障害 (大部分の細胞が円形) が認められ、100.0 μg/mLで細胞密度は減少し、20.0 μg/mL以上でコロニー形成率1は減少していた (相対コロニー形成率 ; 20.0 μg/mL : 15.8%) 。

実験2 (-S9 mixで24時間処理、+S9 mixで4時間処理) ；

-S9 mixでは50.0 μg/mL以上の濃度で実験終了時に細胞接着に対する障害 (少数の細胞が円形) が認められ、75.0 μg/mL以上で細胞密度が減少し、コロニー形成率1は明らかに減少していた (相対コロニー形成率1 ; 75.0 μg/mL : 19.0%) 。

+S9 mixでは75.0 μg/mL以上の濃度で実験終了時に細胞接着に対する障害 (少数の細胞が円形) が認められ、細胞密度への影響は認められなかったが、コロニー形成率1は50.0 μg/mL以上の濃度で減少していた (相対コロニー形成率 ; 50.0 μg/mL : 20.4%) 。

pHおよび浸透圧に検体の添加による影響は認められなかった。全ての実験で、試験終了時に培地中に検体の沈殿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。

Fluxapyroxad

以上の結果より、検体は代謝活性化系の有無に係らず本試験の条件下において遺伝子突然変異誘発性を有しないものと判断される。

表1. 予備試験結果

表2. 試験結果-実験1 (±S9 mixで4時間処理)

濃度 (μg/mL)	S9 mix	1回目 継代時 細胞密度 (x10 ⁵ /mL)	細胞毒性試験CE1 (処理4時間後)		細胞毒性試験CE2 (突然変異発現時間 後)		突然変異試験	
			コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		突然変異頻度 (10 ⁶ 個当り)	
			絶対値	相対値	絶対値	相対値	補正前	補正後 ^b
溶媒対照1% DMSO	-	6.75	98.2	100.0	80.4	100.0	2.78	3.44
検体 (4時間)	5.0	6.84	96.6	98.4	78.1	97.1	1.67	2.15
	10.0	6.26	93.2	94.9	82.9	103.1	0.84	1.01
	20.0	6.79	92.6	94.3	72.7	90.4	0.56	0.79
	50.0	6.65	17.7	18.0	68.2	84.8	0.56	0.87
	100.0	0.45	0.0	0.0	-	-	-	-
陽性対照EMS 300	-	7.23	82.0	83.5	74.2	92.3	91.95	123.94
溶媒対照1% DMSO	+	6.57	62.7	100.0	94.3	100.0	1.95	2.08
検体 (4時間)	5.0	6.61	38.0	60.6	94.2	99.9	0.56	0.60
	10.0	5.56	26.9	42.9	98.3	104.2	3.06	3.19
	20.0	6.15	9.9	15.8	88.6	94.0	2.78	3.15
	50.0	6.45	13.0	20.7	94.3	100.0	2.23	2.36
	100.0	2.39	0.0	0.0	92.0	97.6	0.84	0.89
陽性対照MCA 10.0	+	6.01	67.6	107.8	84.8	89.9	102.78	121.05

^b: 発現時間後のコロニー形成率(細胞毒性試験2)により補正を行った

-: 細胞毒性が強く、計測できなかった

表3. 試験結果-実験2 (-S9 mixで24時間処理、+S9 mixで4時間処理)

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix	1回目 継代時 細胞密度 ($\times 10^3/\text{mL}$)	細胞毒性試験CE1 (処理4時間後)		細胞毒性試験CE2 (突然変異発現時間後)		突然変異試験		
			コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		突然変異頻度 (10^6 個当り)		
			絶対値	相対値	絶対値	相対値	補正前	補正後 ^b	
無処理対照	-	8.11	100.8	(-)	90.4	(-)	2.22	2.46	
溶媒対照1% DMSO	-	7.88	96.5	100.0	92.1	100.0	2.23	2.39	
検体 (24時間)	6.3	-	8.38	98.1	101.7	94.7	102.8	0.56	0.69
	12.5	-	8.34	100.0	103.6	102.8	111.6	5.56	5.28
	25.0	-	8.11	88.8	92.0	86.9	94.4	1.39	1.83
	50.0	-	6.82	79.8	82.7	83.8	91.0	4.73	5.64
	75.0	-	1.76	18.3	19.0	79.7	86.5	2.50	3.19
	100.0	-	0.99	0.0	0.0	88.4	96.0	0.28	0.27
陽性対照EMS 300	-	7.36	75.7	78.4	69.8	75.8	203.06	290.93	
溶媒対照1% DMSO	+	4.72	82.0	100.0	88.7	100.0	2.50	2.82	
検体 (4時間)	6.3	+	7.26	81.0	98.8	93.7	105.6	3.62	3.94
	12.5	+	7.38	74.2	90.5	100.3	113.1	1.12	1.14
	25.0	+	7.28	56.0	68.3	92.7	104.5	1.12	1.24
	50.0	+	7.13	16.7	20.4	100.2	113.0	1.11	1.16
	75.0	+	4.89	2.4	2.9	90.0	101.5	0.28	0.35
	100.0	+	6.49	0.0	0.0	-	-	-	-
陽性対照MCA 10.0	+	7.77	82.4	100.5	89.7	101.1	73.06	83.60	

^b : 発現時間後のコロニー形成率(細胞毒性試験2)により補正を行った

- : 細胞毒性が強く、計測できなかった

EMS : Ethyl methanesulfonate MCA : 3-Methylcholanthrene

表4. 培養細胞の状態および培養条件

濃度 (μg/mL) (処理時間)	S9 mix	細胞 形態 ^a	pH	浸透圧 mOsm ^b	溶解性/観察 ^c					
					溶媒	培地				
						肉眼	添加時 肉眼	3-4 時間 肉眼 顕鏡		
実験 1	1% DMSO	-	+	7.2	383					
	検体 (4 時間)	5.0	-	+			S	S	S	S
		10.0	-	+			S	S	S	S
		20.0	-	++			S	S	S	S
		50.0	-	++	7.3	363	S	S	S	S
		100.0	-	+++	7.3	375	S	S	S	S
	1% DMSO	+	+	7.1	360					
	検体 (4 時間)	5.0	+	+			S	S	S	S
		10.0	+	+			S	S	S	S
		20.0	+	+			S	S	S	S
		50.0	+	+	7.1	335	S	S	S	S
		100.0	+	+++	7.1	332	S	S	S	S
実験 2	無処理対照	-	+	7.3	261					
	1% DMSO	-	+	7.4	427					
	検体 (24 時間)	6.3	-	+			S	S	S	S
		12.5	-	+			S	S	S	S
		25.0	-	+			S	S	S	S
		50.0	-	++			S	S	S	S
		75.0	-	+++	7.4	385	S	S	S	S
		100.0	-	+++	7.4	402	S	S	S	S
	1% DMSO	+	+	7.2	366					
	検体 (4 時間)	6.3	+	+			S	S	S	S
		12.5	+	+			S	S	S	S
		25.0	+	+			S	S	S	S
50.0		+	+			S	S	S	S	
75.0		+	++	7.1	369	S	S	S	S	
100.0		+	+++	7.2	366	S	S	S	S	

空欄は実施せず

^a: +=完全に付着 (線維芽細胞様細胞)

++=付着軽度減少 (少数の円形細胞)

+++ =付着減少 (大部分の細胞が円形)

++++ =完全に剥離、全ての細胞が円形

^b: mOsm=milliosmolar

^c: S: 可溶; P: 沈殿

13-1-4. チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-K1細胞株)を用いた遺伝子突然変異試験:HPRT試験 (資料20)

試験機関:

(GLP対応)

報告書作成年:

検体純度:

方法: HPRT試験

チャイニーズハムスター卵巣細胞由来の培養細胞(CHO-K1細胞)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(S9 mix)の存在下および非存在下で3回行った。溶媒としてジメチルスルホキシド(DMSO)を用いた。

用量設定根拠:

<実験1> (±S9 mixで4時間処理):

0, 6.3, 12.5, 25.0, 50.0, 75.0, 100.0, 125.0 $\mu\text{g/mL}$

<実験2> (-S9 mixで24時間処理、+S9 mixで4時間処理):

-S9 mix: 0, 6.3, 12.5, 25.0, 50.0, 75.0, 100.0, 125.0 $\mu\text{g/mL}$

+S9 mix: 0, 40.0, 60.0, 80.0, 100.0, 120.0, 140.0, 160.0 $\mu\text{g/mL}$

<実験3> (+S9 mixで4時間処理):

0, 25.0, 50.0, 75.0, 100.0, 125.0, 150.0 $\mu\text{g/mL}$

陽性対照[S9 mixの非存在下ではエチルメタンサルホネート(EMS) 300 $\mu\text{g/mL}$ 、S9 mixの存在下では3-メチルコラントレン(MCA) 10および20 $\mu\text{g/mL}$] および陰性(溶媒)対照も同様に試験した。

自然HPRT欠損突然変異体を除去するために細胞を播種し(3-5 x 10⁵個/フラスコ)、HAT培地で3-4日間培養し、さらに、血清添加Ham's F12培地で継代し、3-4日間培養を継続した。2回継代培養後の対数増殖期の細胞 1 x 10⁶個/フラスコを血清添加Ham's F12培地に播種し、20-24時間培養後、試験に用いた。附着期間後、代謝活性化系の非存在下および存在下で、無血清培地中で4時間または血清添加培地中で24時間検体処理を行った。細胞をHank's平衡塩溶液(HBSS)で洗浄後、血清添加Ham's F12培地を加え3日間培養後、1回目の継代を行った。7-9日の全発現期間後、2回目の継代培養時に、選択培地(6-チオグアニン10 $\mu\text{g/mL}$ 添加)を含むシャーレに約3 x 10⁵細胞/フラスコを

播種した。培養6-7日後、コロニーを固定・染色して計測した。

細胞毒性 (CE1=コロニー形成率1) は、血清添加Ham's F12培地を入れたフラスコに約200細胞を播種し、20-24時間の付着時間経過後、細胞を溶媒、検体あるいは陽性対照で4または24時間処理した後、HBSSで数回洗浄し、血清添加Ham's F12培地に交換した。

処理時間経過後の変異率の測定 (CE2=コロニー形成率2) は変異体の選択と並行して行い、血清添加Ham's F12培地に約200細胞/フラスコを播種した。

CE1およびCE2とも、培地を交換または播種後、約5-8日間培養し、固定・染色してコロニー数を計測した。

pHはS9 mixの非存在下および存在下の処理群の少なくとも2高濃度、溶媒対照について、浸透圧はS9 mixの非存在下および存在下の処理群の少なくとも最高濃度、溶媒対照について測定した。また検体の沈殿の有無について培地に検体を処理直後および処理終了時に、細胞形態に関して処理終了時に検査した。

結果： 細胞毒性および突然変異頻度を表1-3、培養細胞の状態および培養条件について表4に示した。

突然変異誘発性：検体は2回の試験において代謝活性化系の有無に係らず、いずれの濃度においても補正突然変異頻度 (0.00-6.44/10⁶細胞) は背景溶媒対照データ (1.61-6.87/10⁶細胞) の範囲内にあり、増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いたEMSおよびMCAでは明らかな突然変異頻度の増加を示した。

各実験ごとの培養細胞の状態および培養条件は以下の通りであった。

実験1 (±S9 mixで4時間処理)：

-S9 mixでは100.0 μg/mL以上の濃度では実験終了時に細胞接着に対する障害 (少数の細胞が円形) が認められ、細胞密度およびコロニー形成率1は明らかに減少していた (相対コロニー形成率；100.0 μg/mL：5.7%、125.0 μg/mL：1.9%)。

+S9 mixでは125.0 μg/mLで実験終了時に細胞接着に対する障害 (少数の細胞が円形) が認められ、細胞密度およびコロニー形成率1は減少していた (相対コロニー形成率；31.5%)。

実験2 (-S9 mixで24時間処理、+S9 mixで4時間処理)：

-S9 mixでは50.0 μg/mL以上の濃度では実験終了時に細胞接着に対する障害 (少数の細胞が円形) が認められ、細胞密度が減少し (100.0 μg/mL以上では生存細胞はみられなかった)、コロニー形成率1は明らかに減少していた (相対コロニー形成率1；75.0 μg/mL：50.9%、100.0および125.0 μg/mL：0.0%)。

+S9 mixでは100.0 μg/mL以上の濃度で実験終了時に細胞接着に対する障害 (少数の細胞が円形) が認められ、100.0 μg/mL以上の濃度で細胞密度が減少し、コロニー形成率1は120.0 μg/mL以上の濃度で減少していた (相対コロニー形成率；120.0 μg/mL：31.2%)。

実験3 (+S9 mixで4時間処理) :

125.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で処理終了時に検体の沈殿、細胞接着に対する障害(少数の細胞が円形)が認められた、細胞密度およびコロニー形成率は減少していた(相対コロニー形成率; 125.0 $\mu\text{g/mL}$: 20.9%)。

pHおよび浸透圧に検体の添加による影響は認められなかった。全ての実験で、試験終了時に培地中に検体の沈殿が125.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化系の有無に係らず遺伝子突然変異誘発性を有さないと判断される。

表1. 試験結果-実験1 (\pm S9 mixで4時間処理)

濃度 ($\mu\text{g/mL}$) (処理時間)	S9 mix	1回目 継代時 細胞密度 ($\times 10^3/\text{mL}$)	細胞毒性試験CE1 (処理4時間後)		細胞毒性試験CE2 (突然変異発現時間後)		突然変異試験		
			コロニー形成率(%)		コロニー形成率(%)		突然変異頻度 (10^6 個当たり)		
			絶対値	相対値	絶対値	相対値	補正前	補正後 ^a	
溶媒対照 1% DMSO	-	4.53	62.7	100.0	96.4	100.0	3.06	3.05	
検体 (4時間)	6.3	-	5.04	78.7	125.5	88.7	92.0	0.84	0.97
	12.5	-	5.56	76.6	122.2	82.2	85.3	3.34	4.04
	25.0	-	5.02	73.8	117.7	83.2	86.3	5.28	6.36
	50.0	-	4.88	78.4	125.0	91.3	94.7	1.67	1.89
	75.0	-	3.24	49.3	78.6	82.5	85.6	3.34	3.93
	100.0	-	1.37	3.6	5.7	78.1	81.0	0.28	0.27
	125.0*	-	0.49	1.2	1.9	-	-	-	-
陽性対照 EMS 300	-	4.15	74.8	118.5	79.4	82.4	75.28	95.99	
溶媒対照 1% DMSO	+	6.21	75.3	100.0	91.7	100.0	5.84	6.87	
検体 (4時間)	6.3	+	5.48	86.4	114.7	(-)	(-)	(-)	(-)
	12.5	+	5.77	79.8	106.0	(-)	(-)	(-)	(-)
	25.0	+	6.31	80.7	107.2	69.8	76.1	0.00	0.00
	50.0	+	5.53	80.7	107.2	94.8	103.4	2.23	2.24
	75.0	+	5.13	86.4	114.7	86.9	94.8	3.89	4.38
	100.0	+	3.83	66.6	88.4	82.9	90.4	0.28	0.31
	125.0*	+	2.08	23.7	31.5	86.3	94.1	3.89	4.40
陽性 対照MCA	10.0	+	5.95	79.0	104.9	79.0	86.2	31.95	40.46
	20.0	+	5.21	72.8	96.7	76.1	83.0	27.23	35.88

^a: 発現時間後のコロニー形成率(細胞毒性試験2)により補正を行った

-: 細胞毒性が強く、計測できなかった。 *: 全ての菌株で不溶性沈殿物を認める。

(-): 最低4濃度の計測が要求されていることから、計測しなかった。

EMS: Ethyl methanesulfonate MCA: 3-Methylcholanthrene

表2. 試験結果-試験2 (-S9 mixで24時間処理、+S9 mixで4時間処理)

濃度 (μg/mL)	S9 mix	1回目 継代時 細胞密度 (x10 ³ /mL)	細胞毒性試験CE1 (処理4時間後)		細胞毒性試験CE2 (突然変異発現時間後)		突然変異試験		
			コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		突然変異頻度 (10 ⁶ 個当り)		
			絶対値	相対値	絶対値	相対値	補正前	補正後 ^a	
溶媒対照 1% DMSO	-	7.50	112.6	100.0	84.7	100.0	2.78	3.28	
検体 (24時間)	6.3	-	6.80	107.2	95.2	86.3	101.9	2.50	2.91
	12.5	-	6.39	107.2	95.2	89.3	105.4	1.95	2.10
	25.0	-	6.25	105.9	94.0	87.7	103.5	0.84	0.98
	50.0	-	3.41	97.4	86.5	90.4	106.7	3.89	4.32
	75.0	-	1.83	57.3	50.9	90.7	107.1	2.50	2.76
	100.0	-	0.47	0.0	0.0	-	-	-	-
	125.0*	-	0.34	0.0	0.0	-	-	--	--
陽性対照 EMS 300	-	5.17	94.3	83.7	77.3	91.3	384.45	497.73	
溶媒対照 1% DMSO	+	3.43	103.4	100.0	87.0	100.0	2.50	2.89	
検体 (4時間)	40.0	+	3.89	100.0	96.7	86.2	99.1	3.61	4.16
	60.0	+	3.91	97.5	94.3	87.9	101.0	0.00	0.00
	80.0	+	3.69	99.3	96.0	86.2	99.1	5.56	6.44
	100.0	+	1.73	71.4	69.1	84.7	97.4	3.89	4.62
	120.0	+	0.90	32.3	31.2	81.8	94.0	0.28	0.34
	140.0*	+	0.77	0.0	0.0	-	-	-	-
	160.0*	+	0.71	0.0	0.0	-	-	-	-
陽性 対照MCA	10.0	+	4.07	113.3	109.6	77.2	88.7	43.34	55.98
	20.0	+	4.83	125.2	121.1	66.1	76.0	69.17	105.22

^a: 発現時間後のコロニー形成率(細胞毒性試験2)により補正を行った

-: 細胞毒性が強く、計測できなかった

*: 全ての菌株で不溶性沈殿物を認める。

EMS: Ethyl methanesulfonate

MCA: 3-Methylcholanthrene

表3. 試験結果-試験3 (+S9 mixで4時間処理)

濃度 ($\mu\text{g/mL}$) (処理時間)	S9 mix	1回目 継代時 細胞密度 ($\times 10^3/\text{mL}$)	細胞毒性試験CE1 (処理4時間後)		細胞毒性試験CE2 (突然変異発現時間 後)		突然変異試験		
			コロニー形成率(%)		コロニー形成率(%)		突然変異頻度 (10^6 個当り)		
			絶対値	相対値	絶対値	相対値	補正前	補正後 ^a	
溶媒対照 1% DMSO	+	4.65	82.8	100.0	86.0	100.0	1.39	1.61	
検体 (4時間)	25.0	+	5.46	79.8	96.4	84.9	98.7	5.28	6.22
	50.0	+	5.50	72.0	87.0	85.2	99.1	3.34	3.88
	75.0	+	5.35	83.0	100.2	80.9	94.1	0.84	1.03
	100.00	+	3.53	50.4	60.9	86.3	100.3	0.56	0.65
	125.0*	+	2.18	17.3	20.9	83.3	96.9	4.45	5.48
	150.0*	+	1.45	0.0	0.0	-	-	-	-
陽性対照 MCA	10.0	+	4.62	69.8	84.3	71.1	82.7	48.06	67.97
	20.0	+	4.90	69.0	83.3	78.2	90.9	79.17	101.15

^a: 発現時間後のコロニー形成率(細胞毒性試験2)により補正を行った

-: 細胞毒性が強く、計測できなかった

*: 全ての菌株で不溶性沈殿物を認める。

EMS: Ethyl methanesulfonate

MCA: 3-Methylcholanthrene

表4. 培養細胞の状態および培養条件

濃度 (μg/mL) (処理時間)	S9 mix	細胞 接着 。	pH	浸透圧 mOsm ^b	溶解性/観察 ^c					
					溶媒 肉眼	培地				
						添加時 肉眼	3-4 時間 肉眼 顕鏡			
実験 1	溶媒対照 1% DMSO		-	+	7.7	414				
	検体 (4 時間)	6.3	-	+			S	S	S	S
		12.5	-	+			S	S	S	S
		25.0	-	+			S	S	S	S
		50.0	-	+			S	S	S	S
		75.0	-	+			S	S	S	S
		100.0	-	++	7.7	409	S	S	S	S
	125.0	-	+++	7.8	409	S	P	P	P	
	溶媒対照 1% DMSO		+	+	7.4	386				
	検体 (4 時間)	6.3	+	+			S	S	S	S
		12.5	+	+			S	S	S	S
		25.0	+	+			S	S	S	S
		50.0	+	+			S	S	S	S
		75.0	+	+			S	S	S	S
100.0		+	+	7.4	390	S	S	S	S	
125.0	+	++	7.4	390	S	P	P	P		
実験 2	溶媒対照 1% DMSO		-	+	7.5	397				
	検体 (24 時間)	6.3	-	+			S	S	S	S
		12.5	-	+			S	S	S	S
		25.0	-	+			S	S	S	S
		50.0	-	++			S	S	S	S
		75.0	-	++			S	S	S	S
		100.0	-	+++	7.3	415	S	S	S	S
	125.0	-	++++	7.3	420	S	P	P	P	
	溶媒対照 1% DMSO		+	+	7.5	386				
	検体 (4 時間)	40.0	+	+			S	S	S	S
		60.0	+	+			S	S	S	S
		80.0	+	+			S	S	S	S
		100.0	+	++			S	S	S	S
		120.0	+	++			S	S	S	S
140.0		+	+++	7.5	381	S	P	P	P	
160.0	+	+++	7.5	380	S	P	P	P		

表4. 培養細胞の状態および培養条件 (つづき)

濃度 ($\mu\text{g/mL}$) (処理時間)	S9 mix	細胞 接着 ^a	pH	浸透圧 mOsm ^b	溶解性/観察 ^c				
					溶媒 肉眼	溶媒			
						添加時 肉眼	3-4 時間 肉眼 顕鏡		
溶媒対照 1% DMSO	+	+	7.1	384					
実験 3 検体 (4 時間)	25.0	+	+			S	S	S	S
	50.0	+	+			S	S	S	S
	75.0	+	+			S	S	S	S
	100.0	+	+			S	S	S	S
	125.0	+	++	7.1	391	S	P	P	P
	150.0	+	+++	7.2	374	S	P	P	P

空欄は測定せず

^a: +=完全に付着 (線維芽細胞様細胞)

++=付着軽度減少 (少数の円形細胞)

+++ = 付着減少 (大部分の細胞が円形)

++++ = 完全に剥離、全ての細胞が円形

^b: mOsm=milliosmolar

^c: S=溶解 P=沈殿あり

13-2. 染色体異常誘発性

13-2-1. 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：

検体純度：

方法： チャイニーズハムスターV79細胞を用いて、代謝活性化系の存在下 (+S9 mix) および非存在下 (-S9 mix) で染色体異常誘発性を検索した。検体はDMSO (最終濃度1%) に溶解して用いた。試験は各濃度あたり2反復で、3回行った。細胞採取時期は無処理のV79細胞周期が約12-14時間であることから、1回目の採取は18時間後に、2回目は遅滞を考慮して28時間後とした。

10%牛胎児血清含有培地で培養し、調製した単細胞懸濁液 ($3-8 \times 10^4$ 細胞) を播種24-30時間後に新培地と交換した。+S9 mixおよび-S9 mixで無血清培地に検体を添加し、4時間培養後または血清添加培地で18時間培養後、Hanks平衡塩溶液で2回洗浄した後、血清添加培地に交換した。さらに10、14あるいは24時間培養後、標本作製した。-S9 mixにおいて18時間血清添加培地で連続培養 (実験2) では培養直後あるいは、さらに10時間培養後、標本作製した。なお、細胞採取2-3時間前にコルセミド $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ を処理した。

細胞の処理濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) は以下の通りである。なお、太字の濃度について染色体異常について評価した。

(実験1) (\pm S9 mixで4時間処理後、さらに14時間培養し染色体標本作製)：
濃度：0、3.9、7.8、**15.6**、**31.3**、**62.5**、125.0、250.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$

(実験2) (-S9 mixで、18時間連続処理後、処理終了直後あるいは10時間培養後、染色体標本作製、+S9 mixでは4時間処理後、さらに24時間培養し染色体標本作製)：
濃度：-S9 mix (18時間処理、処理終了直後標本作製) 0、3.9、7.8、**15.6**、**31.3**、**62.5**、**125.0** $\mu\text{g}/\text{mL}$
-S9 mix (18時間処理、処理終了10時間後標本作製) 0、15.6、31.3、**62.5**、125.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
+S9 mix (4時間処理、処理終了24時間後標本作製) 0、3.9、7.8、**15.6**、**31.3**、**62.5**、**125.0**、250.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$

(実験3) (\pm S9 mixで、4時間処理後、さらに14時間培養し染色体標本作製)：
濃度：0、30.0、40.0、50.0、**60.0**、**70.0**、**80.0** $\mu\text{g}/\text{mL}$

陽性対照として、-S9 mixではエチルメタンサルホネート(EMS) $500.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ を、+S9 mixではシクロホスファミド(CPP) $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ を用いた。また、溶媒対照 (1%DMSO) を設け、同様に試験した。

観察は、検体処理群およ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)、染色体異常の発現率が明らかに高い場合 (実験3) および陽性対照群では各反復

あたり50個のよく広がった中期分裂像について行った。染色体異常は構造的染色体異常[ギャップ、切断、断片、欠失、複数異常、細片化、交換、内部交換、相互交換(対称、非対称)]および数的異常(異数性、倍数性、核内倍数性)について評価した。

細胞毒性を評価するにあたり、反復当たり分裂細胞を含む1000細胞を観察し、前期、中期、後期および終期にある全ての細胞を分裂細胞とした。陽性対照を除く全ての試験群について別途培養し、培養終了時に細胞数を計測し、生育抑制を評価した。

pHはS9 mixの非存在下および存在下の処理群の少なくとも2高濃度、溶媒対照について、浸透圧はS9 mixの非存在下および存在下の処理群の少なくとも最高濃度、溶媒対照について測定した。また検体の沈殿の有無について培地に検体を処理直後および処理終了時に肉眼または顕微鏡で検査した。

用量設定根拠：

結果： 染色体異常の分析結果を表1、培養細胞の状態、培養条件および細胞毒性について表2に示した。

S9 mixの有無に係わらず検体を4時間処理後、ギャップを含むおよび含まない構造的染色体異常の出現頻度の有意な増加が認められた。

実験1 (±S9 mixで4時間処理後、さらに14時間培養) では62.5 μg/mLではデータのばらつきが大きかったので、この濃度については400細胞について観察したが、背景溶媒対照データの染色体異常出現頻度(ギャップを除く0-5.5%)をわずかに超える有意でない増加(6.3%)が認められた。また、62.5 μg/mLではS9 mixの存在下で染色体交換の有意な増加が認められた。

実験2 (-S9 mixで、18時間連続処理後、処理終了直後あるいは10時間培養、+S9 mixでは4時間処理後、さらに24時間培養) ではいずれの濃度区とも構造的染色体異常数の出現頻度の増加は認められなかった。

実験3 (±S9 mixで、4時間処理後、さらに14時間培養) では濃度を高くして実験を行い、全ての濃度(60-80 μg/mL)で背景溶媒対照データの染色体異常出現頻度を超える明らかな構造的染色体異常出現頻度の有意な増加(ギャップを除く16-33%)がS9 mixの有無にかかわらず認められ、実験1の結果が確認された。また、染色体交換が全ての濃度で有意に増加し、さらに複数の異常を有する細胞の有意な増加がS9 mix非存在下の全ての濃度および存在下の60 μg/mLで認められた。

数的染色体異常の増加はいずれの試験でも認められなかった。

pHおよび浸透圧に検体の添加による影響は認められなかった。全ての試験で、試験終了時に培地中に検体の沈殿が125.0 μg/mL以上の濃度で認められた。

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

Fluxapyroxad

陽性対照物質であるEMSおよびCPPIは、明らかな構造的染色体異常の出現頻度の増加が認められ、また、溶媒対照の構造的染色体異常の出現頻度も背景データの範囲内であった。

したがって、本実験条件下で、検体は代謝活性化系の有無に係わらず、染色体異常誘発性を有すると考えられる。

表1. 染色体異常試験結果

実験No. (処理/ 培養時間)	S9 mix	試験区	用量 (μ g/mL)	観察 細胞 数	異常を有する細胞数/100細胞								細胞毒性(%)	
					構造的染色体異常*				数的 染色体異常				細胞 数	分裂 頻度
					Gを 含む	Gを含まない			異数 性	倍数 性	核内倍 数性			
						合計	Ex	mA				Dis		
実験1 (4/14時間)	無	DMSO	1%	200	8.0	2.5	1.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	100.0	100.0
		検体	15.6	200	7.5	3.0	1.0	0.0	0.0	0.5	1.5	0.0	105.2	80.2
			31.3	200	4.5	3.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	64.2	85.9
			62.5	400	7.5	6.3	2.5	0.0	0.0	0.2	0.2	0.5	83.4	57.1
		EMS	500	100	26.0 \uparrow	23.0 \uparrow	15.0 \uparrow	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	nt	93.8
	有	DMSO	1%	200	9.5	3.5	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	100.0	100.0
		検体	15.6	200	7.0	3.5	1.5	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	110.6	93.7
			31.3	200	10.0	4.5	2.0	0.0	0.0	1.4	1.0	1.0	76.0	98.4
			62.5	400	10.0	6.3	3.3 \uparrow	0.0	0.0	0.2	1.7	1.2	78.8	93.1
		CPP	0.5	100	34.0 \uparrow	28.0 \uparrow	13.0 \uparrow	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	nt	74.6
実験2 (18/0時間)	無	DMSO	1%	200	8.0	4.0	0.5	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	100.0	100.0
		検体	7.8	200	8.0	2.0	1.0	0.0	0.0	2.4	1.0	0.0	76.7	56.9
			15.6	200	8.5	3.5	0.5	0.0	0.0	0.5	2.0	0.0	63.1	71.3
			31.3	200	8.5	2.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0	45.3	80.0
	EMS	500	100	27.0 \uparrow	26.0 \uparrow	13.0 \uparrow	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	nt	66.2	
実験2 (18/10時間)	無	DMSO	1%	200	7.5	3.5	0.5	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	100.0	100.0
		検体	62.5	200	6.0	2.0	0.5	0.0	0.0	0.5	1.0	0.0	40.1	83.6
		EMS	500	100	32.0 \uparrow	31.0 \uparrow	18.0 \uparrow	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	nt	64.6
実験2 (4/24時間)	有	DMSO	1%	200	9.5	4.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0
		検体	7.8	200	10.0	2.5	0.0	0.0	0.0	1.9	1.0	0.0	106.8	118.6
			15.6	200	12.0	4.5	0.5	0.0	0.0	1.0	2.4	0.0	92.2	96.5
			31.3	200	8.0	4.0	2.5	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	127.6	121.5
	CPP	0.5	100	24.0 \uparrow	19.0 \uparrow	9.0 \uparrow	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	nt	118.6	
実験3 (4/14時間)	無	DMSO	1%	200	6.0	3.5	2.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	100.0	100.0
		検体	60.0	100	21.0 \uparrow	16.0 \uparrow	12.0 \uparrow	4.0 \uparrow	0.0	1.0	1.0	1.9	98.1	134.0
			70.0	100	27.0 \uparrow	22.0 \uparrow	17.0 \uparrow	3.0 \uparrow	0.0	1.0	0.0	1.0	89.2	116.4
			80.0	100	35.0 \uparrow	33.0 \uparrow	24.0 \uparrow	4.0 \uparrow	0.0	0.0	0.0	0.0	59.4	66.0
	EMS	500	100	24.0 \uparrow	22.0 \uparrow	11.0 \uparrow	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	nt	71.7	
実験3 (4/14時間)	有	DMSO	1%	200	7.5	4.0	0.5	0.0	0.0	0.5	0.0	0.5	100.0	100.0
		検体	60.0	100	28.0 \uparrow	25.0 \uparrow	15.0 \uparrow	4.0 \uparrow	0.0	1.0	1.9	0.0	66.2	90.5
			70.0	100	21.0 \uparrow	17.0 \uparrow	12.0 \uparrow	1.0	0.0	1.9	1.0	0.0	65.7	81.8
			80.0	100	33.0 \uparrow	28.0 \uparrow	16.0 \uparrow	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	48.1	53.4
	CPP	0.5	100	35.0 \uparrow	33.0 \uparrow	22.0 \uparrow	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	nt	59.1	

nt : 試験せず

* 構造的染色体異常: G = キヤップ、Ex = 交換、mA = 複数(≥ 5)の異常、Dis=細片化
統計学的方法; Fisher直接確立検定(片側) \uparrow : $p \leq 0.05$, \uparrow : $p \leq 0.01$

表2 培養細胞の状態、培養条件および細胞毒性

実験 No. (処理/ 培養時間)	S9 mix	試験区	用量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	細胞 形態 ^a	5分 ^c 評価 ^b	pH	浸透圧 mOsm ^c	溶解性/観察 ^d				細胞毒性(%)		
								溶媒 肉眼	培地			細胞 数	分裂 頻度	
									添加 肉眼	3-4時間				
										肉眼	顕鏡			
実験 1 4/14 時間	無	DMSO	1%	+	E1	7.7	358	nd	nd	nd	nd	100.0	100.0	
		検体	3.9	+	E1	nd	nd	nd	S	S	S	S	103.1	nd
			7.8	+	E1	nd	nd	nd	S	S	S	S	110.9	nd
			15.6	+	E1	nd	nd	nd	S	S	S	S	105.2	80.2
			31.3	+	E1	nd	nd	nd	S	S	S	S	64.2	85.9
			62.5	+++	E1	nd	nd	nd	S	P	S	S	83.4	57.1
			125.0	+++	N1	7.7	407	S	P	P	P	P	9.3	nd
			250.0	+++	N1	7.7	398	S	P	P	P	P	3.6	nd
	EMS	500	+	E1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nt	93.8	
	有	DMSO	1%	+	E1	7.5	386	nd	nd	nd	nd	nd	100.0	100.0
		検体	3.9	+	E1	nd	nd	nd	S	S	S	S	83.2	nd
			7.8	+	E1	nd	nd	nd	S	S	S	S	80.8	nd
			15.6	+	E1	nd	nd	nd	S	S	S	S	110.6	93.7
			31.3	+	E1	nd	nd	nd	S	S	S	S	76.0	98.4
62.5			+	E1	nd	nd	nd	S	P	S	S	78.8	93.1	
125.0			+++	N1	7.6	386	S	P	P	P	P	45.7	nd	
250.0			+++	N1	7.6	407	S	P	P	P	P	28.8	nd	
CPP	0.5	+	E1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nt	74.6		
実験 2 18/0 時間	無	DMSO	1%	+	E1	7.8	348	nd	nd	nd	nd	100.0	100.0	
		検体	3.9	+	E1	nd	nd	nd	S	S	S	S	59.7	nd
			7.8	+	E1	nd	nd	nd	S	S	S	S	76.7	56.9
			15.6	+	E1	nd	nd	nd	S	S	S	S	63.1	71.3
			31.3	+	E3	nd	nd	nd	S	S	S	S	45.3	80.0
			62.5	+++	N2	7.7	374	S	P	S	S	S	44.5	nd
			125.0	++++	N1	7.7	369	S	P	P	P	P	5.1	nd
EMS	500	+	E1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nt	66.2		
実験 2 18/10 時間	無	DMSO	1%	+	E1	7.6	374	nd	nd	nd	nd	100.0	100.0	
		検体	15.6	+	E1	nd	nd	nd	S	S	S	S	52.0	nd
			31.3	++	E1	nd	nd	nd	S	S	S	S	55.8	nd
			62.5	+++	E3	7.6	353	S	S	S	S	S	40.1	83.6
			125.0	++++	N1	7.6	377	S	P	P	P	P	43.6	nd
EMS	500	+	E1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nt	64.6		

表2 培養細胞の状態、培養条件および細胞毒性（つづき）

実験2 4/24 時間	有	DMSO	1%	+	E1	7.4	358	nd	nd	nd	nd	100.0	100.0
		検体	3.9	+	E1	nd	nd	S	S	S	S	86.3	nd
			7.8	+	E1	nd	nd	S	S	S	S	106.8	118.6
			15.6	+	E1	nd	nd	S	S	S	S	92.2	96.5
			31.3	+	E3	nd	nd	S	S	S	S	127.6	121.5
			62.5	++	N1	nd	nd	S	P	S	S	96.2	nd
			125.0	+++	N1	7.5	373	S	P	P	P	22.5	nd
		250.0	+++	N1	7.5	378	S	P	P	P	7.8	nd	
CPP	0.5	+	E1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nt	118.6		
実験3 4/14 時間	無	DMSO	1%	+	E1	7.8	450	nd	nd	nd	nd	100.0	100.0
		検体	30.0	+	E1	nd	nd	S	S	S	S	97.1	nd
			40.0	++	E1	nd	nd	S	S	S	S	96.2	nd
			50.0	+++	E1	nd	nd	S	S	S	S	97.1	nd
			60.0	+++	E1	nd	nd	S	S	S	S	98.1	134.0
			70.0	+++	E1	7.8	404	S	P	S	S	89.2	116.4
			80.0	+++	E1	7.8	438	S	P	S	S	59.4	66.0
		EMS	500	+	E1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nt	71.7
実験3 4/14 時間	有	DMSO	1%	+	E1	7.6	406	nd	nd	nd	nd	100.0	100.0
		検体	30.0	+	E1	nd	nd	S	S	S	S	85.5	nd
			40.0	+	E1	nd	nd	S	S	S	S	82.2	nd
			50.0	+	E1	nd	nd	S	S	S	S	81.7	nd
			60.0	+	E1	nd	nd	S	S	S	S	66.2	90.5
			70.0	+	E1	7.6	372	S	S	S	S	65.7	81.8
			80.0	+	E1	7.6	373	S	P	S	S	48.1	53.4
		CPP	0.5	+	E1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nt	59.1

^a: +=完全に付着（線維芽細胞様細胞）

++=付着軽度減少（少数の円形細胞）

+++ = 付着減少（大部分の細胞が円形）

++++ = 完全に剥離、全ての細胞が円形

^b: E1 = 評価可能な良質で十分な中期分裂細胞

E2 = 評価可能中期分裂細胞数減少

E3 = 少数の細胞は質不良であるが評価可能中期分裂細胞数減少

N1 = 中期分裂細胞がないか、ほとんどなく評価不可能

N2 = 中期分裂細胞がないか、ほとんどなく、かつ少数の細胞は質不良で評価不可能

^c: mOsm = milliosmolar

^d: S = 溶解 P = 沈殿あり

13-2-2. 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22)

試験機関:

報告書作成年:

検体純度:

方法: チャイニーズハムスターV79細胞を用いて、代謝活性化系の存在下(+S9 mix)および非存在下(-S9 mix)で染色体異常誘発性を検索した。検体はDMSO(最終濃度1%)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。細胞採取時期は無処理のV79細胞周期が約12-14時間であることから、1回目の採取は18時間後に、2回目は遅滞を考慮して28時間後とした。

10%牛胎児血清含有培地で培養し、調製した単細胞懸濁液(3-8 x 10⁴細胞)を播種約24-30時間後に新培地と交換した。+S9 mixおよび-S9 mixで無血清培地に検体を添加し、4時間培養後、Hanks平衡塩溶液で2回洗浄した後、血清添加培地に交換した。さらに、14あるいは24時間培養後、標本作製した。

-S9 mixで18時間血清添加培地で連続培養(実験2)では培養直後あるいは、さらに10時間血清添加培地で培養後、標本作製した。なお、細胞採取2-3時間前にコルセミド1μgで処理した(10μg/mL溶液を100μL添加)。

細胞の処理濃度(μg/mL)は以下の通りである。なお、太字の濃度について染色体異常について評価した。

(実験1) (±S9 mixで4時間処理後、さらに14時間培養し染色体標本作製):
濃度: 0, 6.3, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0, 400.0 μg/mL

(実験2) (-S9 mixで、18時間連続処理後、処理終了直後あるいは10時間培養後、染色体標本作製、+S9 mixでは4時間処理後、さらに24時間培養し染色体標本作製):
濃度: -S9 mix (18時間処理、処理終了直後標本作製) 0, 3.1, 6.3, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0 μg/mL

-S9 mix (18時間処理、処理終了10時間後標本作製) 0, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0 μg/mL
+S9 mix (4時間処理、処理終了24時間後標本作製) 0, 3.1, 6.3, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0 μg/mL

陽性対照として、-S9 mixではエチルメタンスルホネート(EMS) 500.0 μg/mLを、+S9 mixではシクロホスファミド(CPP) 0.5 μg/mLを用いた。また、溶媒対照(1%DMSO)を設け、同様に試験した。

観察は、検体処理群およ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個のよく広がった中期分裂像について行った。染色体異常は構造的染色体異常[ギャップ、切断、断片、欠失、複数異常、細片化、内部交換、相互交換(対称、非対称)]および数的異常(異数性、倍数性、核内倍数性)について評価した。

細胞毒性を評価するにあたり、反復当たり分裂細胞を含む1000細胞を観察し、前期、

中期、後期および終期にある全ての細胞を分裂細胞とした。陽性対照を除く全ての試験群について別途培養し、培養終了時に細胞数を計測し、生育抑制を評価した。

pHはS9 mixの非存在下および存在下の処理群の少なくとも高濃度側2用量、溶媒対照について、浸透圧はS9 mixの非存在下および存在下の処理群の少なくとも最高濃度、溶媒対照について測定した。また検体の沈殿の有無について培地に検体を処理直後および処理終了時に肉眼または顕微鏡で検査した。

用量設定根拠:

結果: 染色体異常の分析結果を表1、培養細胞の状態、培養条件および細胞毒性について表2に示した。

S9 mixの有無に係わらず検体を4時間処理後、染色体異常出現頻度の有意な増加は認められなかった。

細胞分裂の観察結果では溶媒対照に比し、細胞分裂を50%以上抑制する細胞毒性は認められなかった。細胞形態は構造的染色体異常を評価した濃度では細胞の付着に影響は認められなかった。全ての実験で100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度では用量依存性の細胞増殖抑制、顕著な分裂細胞数の減少および/または分裂細胞の質不良、また細胞遺伝学的損傷のために評価が不可能であった。

実験1 (\pm S9 mixで4時間処理後、さらに14時間培養)

S9 mix存在下の溶媒対照ではデータのばらつきが大きかったので、400細胞について観察した。S9 mixの有無に係わらず検体を4時間処理後、染色体異常出現頻度の有意な増加は認められなかった。

実験2 ($-$ S9 mixで、18時間連続処理後、処理終了直後あるいは10時間培養、+S9 mixでは4時間処理後、さらに24時間培養)

$-$ S9 mixで、18時間連続処理後、処理終了直後あるいはさらに10時間培養ではいずれの濃度区とも構造的染色体異常出現頻度の増加は認められなかった。+S9 mixでは4時間処理後、さらに24時間培養では観察した最低濃度の12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で背景溶媒対照データの染色体異常出現頻度(ギャップを除く0-5.5%)をわずかに超える有意でないわずかな増加(7.0%)が認められた。この増加は評価した最低濃度でみられ、用量依存性もないことから毒性学意義はないものと考えられる。

数的染色体異常の増加はいずれの試験でも認められなかった。

pHおよび浸透圧に検体の添加による影響は認められなかった。実験1では、試験終了時に培地中に検体の沈殿が200.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で認められた。

陽性対照物質であるEMSおよびCPPIは、明らかな構造的染色体異常の出現頻度の増加が認められ、また、溶媒対照の構造的染色体異常の出現頻度も背景データの範囲内であった。

したがって、本実験条件下で、検体は代謝活性化系の有無に係わらず、染色体異常誘発性を有さないと判断された。

表1. 染色体異常試験結果

実験No. (処理/培養 時間)	S9 mix	試験区	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	観察 細胞 数	異常を有する細胞数/100細胞								細胞毒性(%)			
					構造的染色体異常*				数的				細胞数	分裂 頻度		
					Gを 含む	Gを含まない			染色体異常			異数 性			倍数 性	核内 倍数性
						合計	Ex	mA	Dis							
実験1 (4/14時間)	無	DMSO	1%	200	6.5	4.0	2.0	0.5	0.0	0.0	1.5	0.0	100.0	100.0		
		検体	12.5	200	4.0	2.5	0.5	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	88.8	92.7		
			25.0	200	7.5	2.5	1.0	0.0	0.0	0.0	3.8	0.0	82.0	86.6		
			50.0	200	1.5	1.5	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	90.4	92.2		
		EMS	500	100	14.0	13.0 \uparrow	9.0 \uparrow	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	64.7		
	有	DMSO	1%	400	8.0	4.5	2.3	0.0	0.0	0.5	1.7	1.2	100.0	100.0		
		検体	12.5	200	4.0	2.5	0.5	0.0	0.0	0.0	1.5	1.0	96.9	109.7		
			25.0	200	8.0	4.0	3.0	0.0	0.0	0.5	1.4	3.3	98.8	89.9		
			50.0	200	6.0	3.5	1.5	0.0	0.0	0.0	1.8	10.1	89.0	99.3		
		CPP	0.5	100	24.0 \uparrow	17.0 \uparrow	12.0 \uparrow	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	83.4		
実験2 (18/0時間)	無	DMSO	1%	200	1.5	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	100.0	100.0		
		検体	12.5	200	2.0	1.5	1.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	94.7	73.3		
			25.0	200	5.0	3.5	3.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	90.2	70.7		
			50.0	200	2.5	2.0	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	88.1	63.9		
		EMS	500	100	21.0 \uparrow	21.0 \uparrow	13.0 \uparrow	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	75.4		
実験2 (18/10時間)	無	DMSO	1%	200	6.0	2.5	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	100.0	100.0		
		検体	50.0	200	6.0	3.0	2.0	0.0	0.0	0.0	5.7	0.0	69.3	113.3		
		EMS	500	100	24.0 \uparrow	24.0 \uparrow	20.0 \uparrow	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	85.7		
実験2 (4/24時間)	有	DMSO	1%	200	7.5	2.5	0.5	0.0	0.0	0.0	3.8	0.0	100.0	100.0		
		検体	12.5	200	12.0	7.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2.4	0.0	81.4	84.5		
			25.0	200	6.0	3.0	1.5	0.0	0.0	0.0	2.9	0.0	101.4	95.0		
			50.0	200	9.0	4.0	2.0	0.5	0.0	0.0	1.5	0.5	89.1	87.0		
		CPP	0.5	100	25.0 \uparrow	20.0 \uparrow	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	113.0		

EMS : Ethyl methanesulfonate CPP : Cyclophosphamide

- : 測定せず

* 構造的染色体異常: G = キヤップ、Ex = 交換、mA = 複数(≥ 5)の異常、Dis=細片化
統計学的方法; Fisher直接確立検定(片側) \uparrow : $p \leq 0.05$ 、 \uparrow : $p \leq 0.01$

表2. 培養細胞の状態、培養条件および細胞毒性

実験 No. 処理/培養 時間	S9 mix	試験区	用量 (μ g/mL)	細胞 形態 ^a	スライド ^c 評価 ^b	pH	浸透圧 mOsm ^c	溶解性/観察 ^d				細胞毒性 (%)	
								溶媒	培地			細胞 数	分裂 頻度
									肉 眼	添加 肉眼	3-4時間 肉眼		
実験 1 (4/14 時間)	無	DMSO	1%	+	E1	7.6	401	-	-	-	-	100.0	100.0
		検体	6.3	+	E1	-	-	S	S	S	S	98.3	-
			12.5	+	E1	-	-	S	S	S	S	88.8	92.7
			25.0	+	E1	-	-	S	S	S	S	82.0	86.6
			50.0	+	E1	-	-	S	S	S	S	90.4	92.2
			100.0	++	N2	-	-	S	S	S	P	13.5	-
			200.0	+++	N3	7.6	386	S	P	P	P	5.6	-
			400.0	+++	N3	7.5	372	S	P	P	P	8.4	-
		EMS	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64.7
	有	DMSO	1%	+	E1	7.5	368	-	-	-	-	100.0	100.0
		検体	6.3	+	E1	-	-	S	S	S	S	109.8	-
			12.5	+	E1	-	-	S	S	S	S	96.9	109.7
			25.0	+	E1	-	-	S	S	S	S	98.8	89.9
			50.0	+	E1	-	-	S	S	S	S	89.0	99.3
			100.0	++	N2	-	-	S	S	S	P	28.2	-
200.0			+++	N3	7.5	382	S	P	P	P	10.4	-	
400.0			+++	N3	7.5	364	S	P	P	P	8.0	-	
CPP	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83.4		
実験 2 (18/0 時間)	無	DMSO	1%	+	E1	7.8	411	-	-	-	-	100.0	100.0
		検体	3.1	+	E1	-	-	S	S	S	S	91.1	-
			6.3	+	E1	-	-	S	S	S	S	94.1	-
			12.5	+	E1	-	-	S	S	S	S	94.7	73.3
			25.0	+	E1	-	-	S	S	S	S	90.2	70.7
			50.0	+	E1	7.8	417	S	S	S	S	88.1	63.9
			100.0	+++	N3	7.9	421	S	S	S	S	29.1	-
		EMS	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	75.4
実験 2 (18/10 時間)	無	DMSO	1%	+	E1	7.8	407	-	-	-	-	100.0	100.0
		検体	12.5	+	E1	-	-	S	S	S	S	96.8	-
			25.0	+	E1	-	-	S	S	S	S	84.6	-
			50.0	+	E2	7.9	406	S	S	S	S	69.3	113.3
			100.0	+++	N1	7.8	426	S	S	S	S	27.7	-
		EMS	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	85.7

表2. 培養細胞の状態、培養条件および細胞毒性（つづき）

実験 2 (4/24 時間)	有	検体	DMSO	1%	+	E1	7.5	405	-	-	-	-	100.0	100.0
							3.1	+	E1	-	-	S	S	S
				6.3	+	E1	-	-	S	S	S	S	99.1	-
				12.5	+	E1	-	-	S	S	S	S	81.4	84.5
				25.0	+	E1	-	-	S	S	S	S	101.4	95.0
				50.0	+	E1	7.5	403	S	S	S	S	89.1	87.0
				100.0	+++	N3	7.6	415	S	S	S	S	8.5	-
		CPP		0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	113.0

- : 測定せず

^a: +=完全に付着（線維芽細胞様細胞）

++=付着軽度減少（少数の円形細胞）

+++ =付着減少（大部分の細胞が円形）

++++=完全に剥離、全ての細胞が円形

^b: E1=評価可能な良質で十分な中期分裂細胞

E2=評価可能中期分裂細胞数減少

N1=中期分裂細胞がないか、ほとんどなく評価不可能

N2=中期分裂細胞がないか、ほとん

どなく、かつ少数の細胞は質不良で評価不可能

N3=完全な細胞死（溶解細胞）

^c: mOsm=milliosmolar

^d: S=溶解

P=沈殿あり

13-3. 小核試験

13-3-1. 経口投与によるマウス骨髄細胞小核試験

(資料23)

試験機関:

報告書作成年:

検体純度:

供試動物: Crl:NMRI系マウス 1群 雄各5匹

試験開始時週齢: 約6-9週

試験開始時平均体重: 約30 g

方法: 検体をコーンオイルに懸濁し500、1000および2000 mg/kg (実投与量51.09、95.15および191.3 mg/mL) の投与量で24時間間隔で2回強制経口投与した。陰性対照としてコーンオイルのみを同様に投与した。陽性対照としては、蒸留水に溶解したシクロホスファミド (CPP) 20 mg/kgおよびピンクリスチン (ピンクリスチン硫酸塩: VCR) 0.15 mg/kgを1回投与した。

最終投与24時間後に、陽性対照は投与24時間後に屠殺して、各動物の両大腿骨髄を採取し、スライドグラス上に塗抹後、エオジンおよびメチレン青で染色 (メイ・グリュンワルド法固定)、蒸留水およびキシレンで洗浄した。さらにギムザ液で染色して、骨髄標本を作製した。

各標本について、2000個の多染性赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球数を計数した。同時に正染性赤血球数および小核を有する正染性赤血球数も計数した。正染性赤血球数に対する多染性赤血球の割合を算出した。

用量設定根拠:

結果: 骨髄標本の観察結果を次表に示す。

全ての投与群で一般状態に異状は認められなかった。

500 mg/kg群でのみ小核を有する多染性赤血球の出現頻度は対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。小さい小核 (小核の直径 < 細胞の直径の1/4) または大きい小核 (小核の直径 \geq 細胞の直径の1/4) を有する正染性または多染性赤血球数は溶媒対照と差がなく背景溶媒対照データ (試験あたり1000個/動物の多染性赤血球を観察したオリーブオイル/コーンオイルを使用した56試験; 小さい小核: 平均2.0‰、範囲1.1-3.3‰、大きい小核: 平均0.0‰、範囲0.0-0.1‰) の範囲内にあり、用量依存性がなく、出現頻度 (1.7‰) は背景溶媒対照データの範囲内 (平均2.0‰、範囲1.1-3.3‰) にあり、毒性学的意義はないと判断された。

一方、陽性対照であるCPPおよびVCR群とも、小核を有する多染性赤血球の出現頻度は溶媒対照と比較して統計学的に有意な明らかな増加が認められた。

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

Fluxapyroxad

いずれの投与群とも赤血球生成の抑制は認められなかった。

以上の結果から、検体は小核を誘発せず、染色体異常誘発性を有しないと判断される。

表. 小核を有する赤血球数

採取時間	薬物	投与量 (mg/kg)	観察 動物数	PCE 総数	MNPCE数(%)			NCE 総数	MNNCE数 (%)
					合計	d<D/4	d≥D/4		
24時間	コーオイル	10mL	5	10000	1.2	1.2	0.0	4511	0.7
	検体	500	5	10000	1.7↑	1.6	0.1	4806	1.0
		1000	5	10000	1.1	1.1	0.0	6070	0.5
		2000	5	10000	1.1	1.1	0.0	5761	0.7
	CPP	20	5	10000	12.8↑	12.8↑	0.0	4140	1.7
	VCR	0.15	5	10000	36.2↑	26.4↑	9.8↑	4241	0.9

PCE : 多染性赤血球

MNPCE : 小核を有する多染性赤血球

NCE : 正染性赤血球

MNNCE : 小核を有する正染性赤血球

統計学的方法 : Wilcoxon検定 (片側) ↑ : p ≤ 0.05、↑ : p ≤ 0.01

13-3-2. 腹腔内投与によるマウス骨髓細胞小核試験

(資料24)

試験機関:

報告書作成年:

検体純度:

供試動物: CrI:NMR1系マウス 1群 雄各5匹

試験開始時週齢: 約6-9週齢

試験開始時平均体重: 27.6 g

方法: 検体をDMSOに溶解し、500、1000および2000 mg/kg (実投与量127.646、259.966および520.467 mg/mL) の投与量で単回腹腔内投与した。陰性対照としてDMSOのみを同様に投与した。陽性対照としては、蒸留水に溶解したシクロホスファミド (CPP) 20 mg/kg およびピンクリスチン (ピンクリスチン硫酸塩: VCR) 0.15 mg/kgを同様に投与した。

投与24時間後に全群の動物を、また48時間後に2000mg/kg群および溶媒対照 (DMSO) 群の動物を屠殺して、各動物の両大腿骨骨髓を採取し、スライドガラス上に塗抹後、エオジンおよびメチレン青で染色 (メイ・グリーンワルド法固定)、蒸留水およびキシレンで洗浄した。さらにギムザ液で染色して、骨髓標本を作製した。

各標本について、2000個の多染性赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球数を計数した。同時に正染性赤血球数および小核を有する正染性赤血球数も計数した。正染性赤血球数に対する多染性赤血球の割合を算出した。

用量設定根拠:

結果: 骨髓標本の観察結果を次表に示す。

全ての検体投与群で投与当日に立毛、一般状態の悪化および円背位が認められた。

いずれの検体投与群とも小核を有する多染性赤血球の出現頻度は対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められなかった。投与群で認められた小核は小さい小核 (小核の直径<細胞の直径の1/4) であった。

一方、陽性対照であるCPPおよびVCR群とも、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に溶媒対照と比較して統計学的に有意な明らかな増加が認められた。

いずれの投与群とも赤血球生成の抑制は認められなかった。

以上の結果から、検体は小核を誘発せず、染色体異常誘発性は有さないと判断される。

表. 小核を有する赤血球数

採取時間	薬物	投与量 (mg/kg)	観察 動物数	PCE 総数	MNPCE数(‰)			NCE 総数	MNNCE数 (‰)
					合計	d < D/4	d ≥ D/4		
24時間	DMSO	4mL	5	10000	0.9	0.9	0.0	3728	0.8
	検体	500	5	10000	1.0	1.0	0.0	3867	0.0
		1000	5	10000	1.0	1.0	0.0	4521	0.4
		2000	5	10000	0.7	0.7	0.0	3964	0.3
	CPP	20	5	10000	16.6 [↑]	16.6 [↑]	0.0	5296	0.8
	VCR	0.15	5	10000	50.9 [↑]	35.7 [↑]	15.2 [↑]	5890	1.7
48時間	DMSO	4mL	5	10000	1.2	1.2	0.0	4067	1.0
	検体	2000	5	10000	0.4	0.4	0.0	3828	0.3

PCE : 多染性赤血球

MNPCE : 小核を有する多染性赤血球

NCE : 正染性赤血球

MNNCE : 小核を有する正染性赤血球

統計学的方法 : Wilcoxon検定 (片側) ↑ : p ≤ 0.05、↑ : p ≤ 0.01

13-4. 不定期DNA合成試験

13-4-1. 経口投与ラットの肝細胞を用いた *in vivo* 不定期DNA合成試験 (資料25)

試験機関：

報告書作成年：

検体純度：

供試動物：CrI:WI(Han)ウイスター系ラット 1群 雄3匹

試験開始時週齢：9-11週齢

試験開始時平均体重：215 g

方法：

投与；検体はコーンオイルに懸濁し、1000および2000 mg/kgの用量で、容量10 mL/kgとして、少なくとも6時間絶食させたラットに単回強制経口投与した。陰性対照としてコーンオイルを同様に投与し、陽性対照として2-アセチルアミノフルオレン(2-AAF) 50 mg/kgをコーンオイルに懸濁して10 mL/kgを単回強制経口投与した。

用量設定根拠；

肝細胞の調製；投与3および14時間後に麻酔下でエチレングリコール-ビス(β -アミノエチルエーテル)-N,N,N',N'-四酢酸(EGTA)、次いでコラーゲナーゼ溶液を用いて灌流した。ついで、肝臓を摘出し、肝細胞を単離し、Williams不完全培地E(WMEI)で洗浄後、遠心分離して、上清を捨て、細胞塊を同培地で再懸濁した。トリパン青で細胞を染色して細胞生存率を求め、生存率が少なくとも70%以上の細胞を試験に用いた。

培養条件；well当り 4×10^5 個の生存細胞(動物当り4-6 well)をwell中のカバースリップに播種し、付着用培地(Williams完全培地E=WMEC)で2時間培養後、未付着細胞を洗浄除去し、培養液を ^3H -チミジン(比放射能約37 MBq/mL=最終濃度約0.37 MBq/mL相当)を1%添加したWMEIに交換し、4時間培養を継続した。ついで、細胞を洗浄後、非標識チミジン含有培地を加えて、さらに12時間培養した。培養は37°C、95% O₂/5% CO₂気中で行った。

UDSの定量；培養終了後、細胞を固定し、オートラジオグラフィーを撮った。少なくともスライド2枚/動物(100細胞/動物)、用量当たり3動物(合計300細胞/用量)を観察し、核銀粒子数および細胞質銀粒子数を計数し、細胞当り正味の銀粒子数(=核銀粒子数-細胞質銀粒子数)、修復細胞(正味銀粒子数が ≥ 5 個の細胞の割合)を求めた。

細胞毒性(生存率)；トリパン青排除法で求め、また細胞形態の変化あるいは細胞成分の減少についても検査した。

結果の判定；正味のグレイン数の平均が用量群の1つで0を超え、併設陰性対照群の値を明確に超え、かつ修復細胞の割合(正味のグレイン数5個以上)が20%以上で用量関連性の増加を示す場合を陽性とした。

結果： 本試験結果の概要を下表に示す。

1000 mg/kg群では一般状態の変化は認められなかったが、2000 mg/kg群では屠殺前の投与3または14時間後に軽度の無気力が認められた。

検体の投与による正味核銀粒子数の増加および細胞毒性ともに認められなかった。

一方、陽性対照として用いた2-AAFでは修復細胞の割合が大きく増加した。

以上の結果から、本検体は不定期DNA合成を誘発しないと判断される。

表1. 100細胞当り平均銀粒子数および修復細胞の割合

肝細胞 調製時期	濃度 (mg/kg)		銀粒子数			修復細胞%
			核	細胞質	正味	正味銀粒子数 ≥5
投与 3時間後	コーンオイル	10mL	4.43±0.48	8.85±0.68	-4.42±0.31	0
	検体	1000	4.15±0.85	7.89±1.48	-3.75±0.66	0
		2000	6.14±1.14	9.92±1.41	-3.77±2.36	3
	2-AAF	50	16.08±0.47	7.80±1.27	8.28±0.82	73
投与 14時間後	コーンオイル	10mL	4.77±0.77	9.21±1.67	-4.44±0.98	0
	検体	1000	6.69±1.85	10.99±2.65	-4.30±1.33	2
		2000	5.58±1.95	8.60±1.90	-3.02±0.19	1
	2-AAF	50	16.87±1.76	8.55±1.31	8.33±0.72	75

2-AAF : 2-アセチルアミノフルオレン

表2. 細胞毒性

肝細胞 調製時期	濃度 (mg/kg)		生存率%	
			平均	対対照比%
投与 3時間後	コーンオイル	10mL	91.8	100.0
	検体	1000	93.0	101.3
		2000	91.8	100.0
	2-AAF	50	86.7	94.4
投与 14時間後	コーンオイル	10mL	85.6	100.0
	検体	1000	85.0	99.4
		2000	90.3	105.6
	2-AAF	50	87.5	100.2

2-AAF : 2-アセチルアミノフルオレン

13-4-2. 静脈内投与ラットの肝細胞を用いた *in vivo* 不定期DNA合成試験 (資料26)

試験機関:

報告書作成年:

検体純度:

供試動物: CrI:WI (Han) ウイスター系ラット 1群 雄3匹

試験開始時週齢: 約9-11週齢

試験開始時平均体重: 241.4 g

方法:

投与: 検体はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、2.5および5.0 mg/kgの用量で、容量2 mL/kgとして、少なくとも6時間絶食させたラットに単回静注投与した。陰性対照としてDMSOを同様に投与し、陽性対照として2-アセチルアミノフルオレン(2-AAF) 50 mg/kgをコーンオイルに懸濁して10mL/kgを単回強制経口投与した。

用量設定根拠:

肝細胞の調製: 投与3および14時間後に麻酔下でエチレングリコール-ビス(β -アミノエチルエーテル)-N,N,N',N'-四酢酸(EGTA)、次いでコラーゲナーゼ溶液を用いて灌流した。ついで、肝臓を摘出し、肝細胞を単離し、Williams不完全培地E(WMEI)で洗浄後、遠心分離して、上清を捨て、細胞塊を同培地で再懸濁した。トリパン青で細胞を染色して細胞生存率を求め、生存率が少なくとも70%以上の細胞を試験に用いた。

培養条件: well当り 4×10^5 個の生存細胞(動物当り4-6 well)をwell中のカバースリップに播種し、付着用培地(Williams完全培地E=WMEC)で2時間培養後、未付着細胞を洗浄除去し、培養液を ^3H -チミジン(比放射能約37 MBq/mL=最終濃度約0.37 MBq/mL相当)を1%添加したWMEIに交換し、4時間培養を継続した。ついで、細胞を洗浄後、非標識チミジン含有培地を加えて、さらに12時間培養した。培養は37°C、95% O₂/5% CO₂ 気中で行った。

UDSの定量: 培養終了後、細胞を固定し、オートラジオグラフィーを撮った。少なくともスライド2枚/動物(100細胞/動物)、用量当たり3動物(合計300細胞/用量)を観察し、核銀粒子数および細胞質銀粒子数を計数し、細胞当り正味の銀粒子数(=核銀粒子数-細胞質銀粒子数)、修復細胞(正味銀粒子数が ≥ 5 個の細胞の割合)を求めた。

細胞毒性(生存率): トリパン青排除法で求め、また細胞形態の変化あるいは細胞成分の減

少についても検査した。

結果の判定：正味のグレイン数の平均が用量群の1つで0を超え、併設陰性対照群の値を明確に超え、かつ修復細胞の割合（正味のグレイン数5個以上）が20%以上で用量関連性の増加を示す場合を陽性とした。

結果： 本試験結果の概要を下表に示す。

2.5 mg/kg群では立毛および円背位、5.0 mg/kg群ではさらに、一般状態の悪化および不規則呼吸が認められた。投与30分後に1例が死亡したため、2例に追加投与し、1例は予備動物とした。

検体の投与による正味核銀粒子数の増加および細胞毒性ともに認められなかった。

一方、陽性対照として用いた2-AAFでは修復細胞の割合が大きく増加した。

以上の結果から、本検体は不定期DNA合成を誘発しないと判断される。

表1. 100細胞当たり平均銀粒子数および修復細胞の割合

肝細胞 調製時期	濃度 (mg/kg)		銀粒子数			修復細胞%
			核	細胞質	正味	正味銀粒子数 ≥5
投与 3時間後	DMSO	2mL	4.35±1.23	9.68±2.71	-5.33±1.49	1
	検体	2.5	3.76±0.46	7.90±0.37	-4.14±0.77	0
		5.0*	4.05±0.44	8.14±1.53	-4.10±1.10	1
	2-AAF	50	17.44±1.65	9.28±0.95	8.16±0.77	65
投与 14時間後	DMSO	2mL	2.86±0.44	6.82±1.09	-3.37±0.67	1
	検体	2.5	2.27±0.23	6.89±1.11	-4.62±0.90	0
		5.0	2.92±0.44	6.94±0.66	-4.02±0.66	1
	2-AAF	50	22.96±1.17	9.49±1.63	13.47±0.70	86

*：投与30分後に1例が死亡したため、2例に追加投与し、1例は予備動物とした。

2-AAF：2-アセチルアミノフルオレン

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。

Fluxapyroxad

表2. 細胞毒性

肝細胞 調製時期	濃度 (mg/kg)		生存率%	
			平均	対対照比%
投与 3時間後	DMSO	2mL	87.0	100.0
		検体	2.5	86.3
	2-AAF	5.0	81.0	93.1
		50	88.0	101.1
投与 14時間後	DMSO	2mL	81.3	100.0
		検体	2.5	84.3
	2-AAF	5.0	80.0	98.4
		50	82.3	101.2

2-AAF : 2-アセチルアミノフルオレン

14. 生体機能に及ぼす影響

のマウスおよびラットにおける毒性薬理試験

(資料 27)

試験機関 :

(GLP 対応)

報告書作成年 :

検体純度 :

用量設定根拠 :

投与液の調製 ; 検体は 0.5w/v%カルボキシメチルセルロース・ナトリウム (以下、CMC-Na とする) 水溶液に懸濁して調製し、調製後 7 日以内に投与した。投与容量は腎機能に対する作用については 25 mL/kg 体重、その他を 10 mL/kg 体重とした。

14-1. 中枢神経系に対する作用

14-1-1. マウスにおける一般状態

供試動物 : CrIj: (CD1) ICR 系マウス 1 群 雄 6 匹

試験開始時週齢 : 5 週齢

試験開始時体重 : 23.1-27.1 g

方法 : Irwin 法

投与 ; 検体を 200、600 および 2000 mg/kg となるように、約 18 時間絶食した動物に単回強制経口投与した。対照群には媒体のみ投与した。投与 3 時間後に給餌を再開した。投与前および投与 0.5、1、2、3、6 ならびに 24 時間後に行動変化、神経症状および中毒症状を評価した。

結果 : 対照群と比較して、全ての測定ポイントで、いずれの Irwin の項目においても対照群と比して検体投与によると思われる変化はみられなかった。

(身づくろい回数、あくび回数、排糞数および排尿数 : Dunnett または Steel 検定 ; 両側、 $p \leq 0.05$ および 0.01)

14-1-2. ラットにおける一般状態

供試動物 : CrI: (CD) SD 系ラット 1 群 5 匹

試験開始時週齢 : 6 週齢

試験開始時体重 : 186.3-206.9 g

方法 : Irwin 法

投与 ; 検体を 200、600 および 2000 mg/kg となるように、約 18 時間絶食した動物に単回強制経口投与した。対照群には媒体のみ投与した。投与 3 時間後に給餌を再開した。投与前および投与 0.5、1、2、3、6 ならびに 24 時間後に行動変化、神経症状および中毒症状を評価した。

結果： 2000 mg/kg 群で投与 6 時間後に軟便または下痢が認められたが、投与 24 時間後には認められず、一過性の変化であった。その他、対照群と比して、全ての測定ポイントで、いずれの Irwin の項目においても対照群と比して検体投与によると思われる変化はみられなかった。

(身づくろい回数、あくび回数、排糞数および排尿数：Dunnett または Steel 検定；両側、 $p \leq 0.05$ および 0.01)

14-1-3. マウスにおける自発運動量測定

供試動物： CrIj: (CD1) ICR 系マウス 1 群 雄 6 匹

試験開始時週齢：5 週齢

試験開始時体重：22.9-29.6 g

方法： 検体を 200、600 および 2000 mg/kg となるように、約 18 時間絶食した動物に単回強制経口投与した。対照群には媒体のみ投与した。投与 3 時間後に給餌を再開した。投与前に 30 分間および投与直後から投与 6 時間後まで継続して、自発運動量測定装置で 30 分毎に自発運動量を測定した。

結果： 対照群と比較して、全ての測定ポイントで検体投与によると思われる有意な変化はみられなかった。

(Dunnett または Steel 検定；両側、 $p \leq 0.05$ および 0.01)

14-1-4. マウスにおける電撃誘発性痙攣

供試動物： CrIj: (CD1) ICR 系マウス 1 群 雄 6 匹

試験開始時週齢：5 週齢

試験開始時体重：22.8-25.7 g

方法： 検体を 200、600 および 2000 mg/kg となるように、約 18 時間絶食した動物に単回強制経口投与した。対照群には媒体のみ投与した。投与 3 時間後に給餌を再開した。投与 1 時間後にマウスの両耳介より小型動物用電撃刺激装置を用いて、10 mA の電流（周波数 100 Hz、パルス幅 0.6 msec）を 0.8 秒間通電し、電撃刺激後に発現する後肢の間代性痙攣、強直性屈曲痙攣、強直性伸展痙攣および死亡の有無を観察した。

結果： 対照群と比して全ての投与群に各痙攣および死亡の発現数に有意な変化はみられなかった。

(Fisher の正確検定；両側、 $p \leq 0.05$)

14-2. 循環器系に対する作用

無麻酔ラットの呼吸数、血圧、心拍数に対する作用

供試動物： CrI: (CD) SD 系ラット 1 群 雄 5 匹

試験開始時週齢：6 週齢

試験開始時体重：167.6-214.1 g

方法： 検体を 200、600 および 2000 mg/kg となるように、約 18 時間絶食した動物に単回強制経口投与した。対照群には媒体のみ投与した。投与 3 時間後に給餌を再開した。投与前、投与 1、2、3 および 6 時間後に血圧および心拍数を測定した。各測定ポイントで測定は 3 回実施し、3 回の平均値を採用した。血圧測定終了後に目視にて 5 秒

間の呼吸数を計測し、測定ポイント毎に計測を3回実施し、平均値を求め、算出した平均値を1分単位に換算した。

結果： 収縮期血圧については、600 mg/kg 群で投与3時間後の測定値が、拡張期血圧については、200 mg/kg 群で投与6時間後の投与前値からの変化値が、いずれも対照群と比べ統計学的に有意な高値を示したが、用量との関連性が認められないことから、検体投与による影響とは考えなかった。平均血圧、心拍数および呼吸数については、対照群と比較して全ての投与群および測定ポイントにおいて、検体投与に関連した有意な変化はみられなかった。

(Dunnett または Steel 検定；両側、 $p \leq 0.05$ および 0.01)

14-3. 腎機能に対する作用

ラットの尿量、尿中電解質および尿浸透圧に対する作用

供試動物： CrI:(CD)SD 系ラット 1群 雄5匹

試験開始時週齢：6週齢

試験開始時体重：192.6-227.7 g

方法： 検体を200、600 および 2000 mg/kg となるように、動物に単回強制経口投与した。対照群には媒体のみ投与した。投与直前に生理食塩液を 25mL/kg 体重の割合で経口投与し、個別に採尿ケージに移し、無給餌および無給水条件下で投与6時間後までの尿を採取し、尿量を測定した。蓄尿を遠心分離(約 400×g, 5分間)し、その上清を採取して Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- および浸透圧を測定した。

結果： 対照群と比較して全ての投与群において、検体投与に関連した有意な変化はみられなかった。

(Dunnett または Steel 検定；両側、 $p \leq 0.05$ および 0.01)

表. 生体機能に及ぼす影響：成績概要

試験項目	動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果概要
中枢神経系 一般状態 [Irwin]	マウス	経口 (CMC-Na)	0 200 600 2000	♂6	—	2000	2000 で作用なし
中枢神経系 一般状態 [Irwin]	ラット			♂5	2000	600	2000 で軟便・下痢 (投与6時間後)
中枢神経系 自発運動量	マウス			♂6	—	2000	2000 で作用なし
中枢神経系 電撃誘発性痙攣				♂6	—	2000	2000 で作用なし
循環器系 呼吸数・血圧 心拍数	無麻酔 ラット			♂5	—	2000	2000 で作用なし
腎機能 尿量・電解質 浸透圧	ラット			♂5	—	2000	2000 で作用なし

15. 免疫毒性

15-1. マウスを用いた免疫毒性試験

(資料 3 4)

試験機関：

(GLP 対応)

報告書作成年：

検体純度：

供試動物： C57BL/6JRj マウス、1 群雄各 8 匹、開始時 48~50 日齢 (体重：21.5~24.0 g)

投与期間： 28 日間 ()

投与方法： 検体を飼料と混合してプレミックスを調製し、0、500、2000 および 6000 ppm の濃度で飼料に混入して 4 週間にわたり自由に摂食させた。陽性対照であるシクロホスファミド (CPA) は、12 mg/kg/day の用量で 4 週間にわたり強制経口投与した。全動物について、投与終了時に 16~20 時間絶食させた。

用量設定根拠：

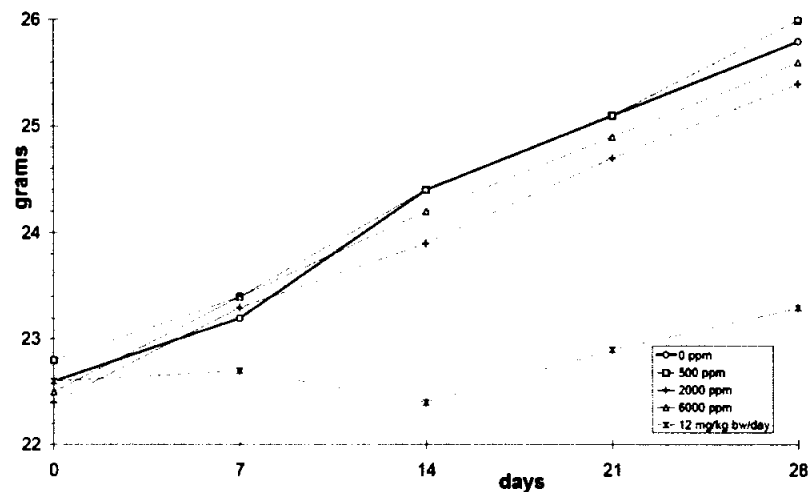
観察・検査項目および結果：

一般状態および死亡率；一般状態および生死を毎日観察した。

死亡動物はなく、投与による影響は認められなかった。

体重変化；投与開始日およびその後は毎週すべての動物の体重を測定した。

全投与群において体重および体重増加量ともに、検体投与の影響は認められなかった。陽性対照群では、体重および体重増加量ともに低値 (投与後 28 日時点で対照群比-9.5%および-77.2%) が認められ、投与の影響と考えられた。



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。

Fluxapyroxad

摂餌量： 全動物の摂餌量を週1回測定した。

全投与群および陽性対照群ともに、検体投与による影響は認められなかった。
用量に関係なく、散発的な餌こぼしが認められた。

検体摂取量： 投与期間中の平均検体摂取量は以下のとおりであった。

投与量 (ppm)	500	2000	6000
検体摂取量 (mg/kg/day)	105.7	450.0	1323.4

飲水量： ケージ毎の飲水量を、目視観察した。

検体投与による影響は認められなかった。

詳細な状態の観察： 投与開始日（投与開始前）およびその後は毎週、全動物を対象として以下の項目の測定を行った。

取り扱い時の異常行動、被毛、皮膚、姿勢、流涎、呼吸、活動/覚醒レベル、
振戦、痙攣、異常動作、異常歩行、流涙、眼瞼閉鎖、眼球突出、検査期間
中の排糞の評価（外観/硬さ）、検査期間中の排尿の評価、瞳孔径

検体投与に関連のある異常は認められなかった。

免疫学的検査：

早朝に、イソフルラン麻酔した動物の眼窩静脈叢または断頭した動物から採血した。

血液学的検査 — EDTA-K₃で抗凝固処理した血液から総リンパ球数を測定した。

全投与群において総リンパ球数に変化はなかった。陽性対照群では総リンパ球数の低下が認められた。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

投与量 (ppm)	500	2000	6000	CPA
総リンパ球数 (10 ⁹ /L)				20↓↓

Kruskal-Wallis + Wilcoxon検定（両側）↓↓ : p<0.01

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の相対値を表す。

リンパ球サブセット — 採取した血液を、それぞれ異なる蛍光色素で標識した以下の各抗体と反応させ、フローサイトメーターで分画した。総リンパ球と各種リンパ球の比率から、各リンパ球の絶対数を算出するとともに、B 細胞/T 細胞比 (B/T 比) およびヘルパーT 細胞/細胞障害性 T 細胞比 (CD4/CD8 比) を算出した。

ハムスター 抗マウス CD3 ϵ 抗体 (FITC 標識)

ラット 抗マウス CD4 抗体 (R-PE 標識)

ラット 抗マウス CD8a 抗体 (PE-Cy5 標識)

マウス 抗マウス NK-1.1 抗体 (R-PE 標識)

ラット 抗マウス CD19 抗体 (PerCP-Cy5.5 標識)

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

投与量 (ppm)		500	2000	6000	CPA
B 細胞	絶対数 (10 ⁹ /L)				9 ↓ ↓
	%				45 ↓ ↓
T 細胞	絶対数 (10 ⁹ /L)				46 ↓ ↓
	%				235 ↑ ↑
NK 細胞	絶対数 (10 ⁹ /L)				31 ↓ ↓
	%	139 ↑ ↑	139 ↑ ↑		157 ↑ ↑
CD4	絶対数 (10 ⁹ /L)				45 ↓ ↓
CD8	絶対数 (10 ⁹ /L)				52 ↓ ↓
B/T 比					20 ↓ ↓

Kruskal-Wallis + Wilcoxon検定 (両側) ↑ ↓ ↓ ↓ : p \leq 0.01

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の相対値を表す。

いずれの投与群でも、総リンパ球数並びに各種リンパ球の絶対数および比率に変化は認められなかった。

NK 細胞の比率は、500 および 2000 ppm において有意に高かったが、用量相関がなく検体投与によるものとは考えられなかった。

陽性対照群では、総リンパ球数および各種リンパ球の絶対数ともに低下がみられた。相対数で見た場合には B 細胞の比率が低下する一方で T 細胞と NK 細胞の比率は増加し、結果として B/T 比は低下した。CD4/CD8 比に変化はなかった。

NK 細胞活性 — Marcusson-Stahl らの方法 (2003) に従って実施した。

溶血液に浸した脾臓を 200 μm のメッシュでふるいにかけ、チューブに採取した。FCS を含む RPMI1640 (完全培地) で 2 回洗浄を行った後、同培地で再懸濁し、細胞数をカウントした後、赤血球を除いた白血球数が 1×10^6 /mL となるように調整した。

YAC (マウスリンパ腫) 細胞を 2×10^4 /mL 調製し、Carboxyfluorescein-succinimidyl-ester で標識した。げっ歯類 IL-2 存在下で、脾臓から抽出した細胞に対し YAC 細胞を 1/50 の割合で添加した。一晩インキュベートした後、Propidium iodide 染色により障害された細胞の数をカウントした。

全投与群および陽性対照群において NK 細胞活性に変化はなかった。

プライマリー T 細胞依存性抗体反応 — 4 週間投与終了の 6 日前、1 群 8 匹全てにヒツジ赤血球 (4×10^8 /mL) の 0.9% 生理食塩水懸濁液 0.5 mL を腹腔内投与して免疫し、投与終了時に採血し、抗 SRBC IgM ELISA を行った。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

投与量 (ppm)	0	500	2000	6000	CPA
SRBC (LU/mL)	3722	4630	3252	2899	147 ↓ ↓

CPA : 陽性対照 (シクロホスファミド、12 mg/kg/day)

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

表中の数値は変動の目安として中央値を表す。

いずれの投与群でも、抗 SRBC IgM 抗体の抗体価に変化はなかった。

陽性対照では、抗体価は顕著に低下した。

肉眼的病理検査 ; 全動物をイソフルラン麻酔下で断頭して屠殺し、剖検を実施した。

全投与群および陽性対照群において異常は認められなかった。

臓器重量 ; 屠殺時に全動物について以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

最終体重、脾臓 (NK 細胞活性測定に使用)、胸腺

いずれの投与群でも各臓器の絶対重量および対体重比ともに変化は認められなかった。陽性対照群では、脾臓並びに胸腺の絶対重量および対体重比の低下が認められた。

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

Fluxapyroxad

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

投与量 (ppm)	500	2000	6000	CPA
最終体重				90 ↓ ↓
脾臓	重量			79 ↓ ↓
	対体重比			87 ↓ ↓
胸腺	重量			40 ↓ ↓
	対体重比			44 ↓ ↓

CPA : 陽性対照 (シクロホスファミド、12 mg/kg/day)

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

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の相対値を表す。

以上の結果から、マウスを用いた 4 週間混餌投与による免疫毒性試験において、いずれの投与群にも免疫機能に対する影響は認められなかったことから、免疫毒性に関する無毒性量は 6000 ppm (1323 mg/kg/day) であると判断された。