

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

16. その他

16-1. ラットを用いた

(資料 28)

試験機関:

(GLP対応)

報告書作成年:

検体純度:

供試動物: CrI:WI(Han)系ラット 1群雌雄各10匹(対照群および高用量群は20匹)

試験開始時週齢; 雌雄 9-10週齢

試験開始時体重; 雄 282.2-323.6 g 雌 184.2-221.3 g

投与期間: 2週間()

試験目的: ラットを用いた亜急性毒性試験(資料8)および反復投与神経毒性試験(資料11)において、

そこで本試験は、

に重点を

置いて検討した。

方法:

試験項目および結果:

一般状態および死亡率; 本試験期間中、一般状態および生死を観察した。

本試験では、死亡例は認められなかった。また、特記すべき一般状態異常も認められなかった。

体重; 本試験期間中、1週間に1度体重を測定した。

本試験では、対照群と検体投与群との間に有意な変化は認められなかった。

3000 ppm 投与群雌において投与後14日に一過的な体重増加抑制(対照群の79%; $p \leq 0.01$)が認められたが、体重への影響は認められず、検体投与に起因するものではないと判断した。

(統計学的解析: Dunnett's test, two-side)

摂餌量および摂水量; 本試験期間中、1週間に1度摂餌量を測定した。また、目視にて、摂水量を毎日観察した。

本試験では、摂水量に明らかな変化は認められなかった。

投与開始後7日で、雌の全検体投与群で摂餌量が大きく減少していたが、14日後および回復期間中の測定では、このような変化は認められなかった。また、雄では対照群と検体投与群との間に大きな変化は認められなかった。

平均検体摂取量; 飼料中の検体濃度および摂餌量から、各群の平均検体摂取量を算出した。表1に算出値を示す。

表1. 平均検体摂取量

投与量 (ppm)		250	1500	3000
平均検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	16	96	192
	雌	19	126	234

臓器重量および肉眼的病理検査; 投与期間終了後、動物をイソフルラン麻酔下で断頭屠殺し、剖検後に臓器重量を測定した。

臓器重量および本試験で認められた肉眼的病理検査異常所見を表 2 および 3 に示す。

表 2. 臓器重量

性別	試験群	雄				雌			
		投与群			回復群	投与群			回復群
	投与量 (ppm)	250	1500	3000	3000	250	1500	3000	3000
	絶対値								
	対体重								
	絶対値								
	対体重								

対照群を 100%とした際の値

統計学的解析：

投与群；Kruskal-Wallis H and Wilcoxon test, two-side

↑↓：p ≤ 0.05、↑↑↓↓：p ≤ 0.01

回復群；Wilcoxon test, two-side

↑↓：p ≤ 0.05、↑↑↓↓：p ≤ 0.01

回復群 3000 ppm 投与群は、対照群回復期との比較

空欄は有意差無し

表 3. 肉眼的病理検査異常所見

性別	試験群	雄					雌						
		投与				回復群	投与群				回復群		
	投与量 (ppm)	対照	250	1500	3000	対照	3000	対照	250	1500	3000	対照	3000
	検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

本試験では、雄の全投与群および雌の 1500・3000 ppm 投与群において、
で有意な増加が認められた。この

は、投与終了後の回復期において、雌では完全に回復しており、雄では有意な増加が認められたが、その増加程度は投与期間中に比べて減少しており、回復傾向にあると考えられる。また、

こ

れらの変化は、投与に起因する反応であると考えられる。

では、雄の 1500 ppm 投与群でのみ、

が認められた。これは投与に起因

する反応と思われるが、用量依存性は認められなかった。回復期間後、雄は対照群と差がなく、雌は絶対値および対体重値の両値で有意な増加が認められたが、投与期間中に変化はなく、肉眼的および組織学的にも異常所見がないので、偶発的で、投与関連性はないと考えられた。また

においては、明らかな肉眼的病理検査異常所見は雌雄とも認められなかった。この他、
も肉眼的病理検査異常として認められたが、雌雄同一性もなく、発生頻度も極めて低いことから、検体投与に起因しないものと判断した。

病理組織学的検査；対象動物の剖検後、 および肉眼的病理検査異常部位を摘出し、固定したのち病理標本を作製、鏡検を実施した。本試験で認められた病理組織学的検査異常所見を表4に示す。

表4. 病理組織学的異常所見

性別 試験群	雄						雌					
	投与				回復群		投与群				回復群	
投与量 (ppm)	対照	250	1500	3000	対照	3000	対照	250	1500	3000	対照	3000
検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

() 本試験では、 が認められた。雌雄ともに、 には用量依存性が認められる（雄は 250 ppm 以上、雌では 250 ppm 以上）。また、この は、投与終了後の回復期で完全に回復していた。したがって、本検体投与後に認められた は検体投与に起因するものであると判断する。

() 本試験では雄の 250 ppm 以上の投与および雌の 3000 ppm 投与で、 が認められた。さらに雄では、それらの個体の幾つかで も認められている。また同様に、回復期を経て、雌では完全に、雄では明らかにその症状が緩和されている。したがって、 で認められた も検体投与に起因するものと考えられる。

(その他) 本試験では、肉眼的病理検査時に異常が認められた の病理組織学的検査を実施し、慢性の を検出した。しかしながら、肉眼的病理検査時と同様に発生頻度も極めて低く、検体投与に起因しないものと判断した。 ; 投与期間終了時およびその後の回復期間終了時に、絶食した動物から、イソフルラン麻酔下において眼窩静脈叢より採血し、以下の血中濃度を により測定した。

の測定結果を表5に示す。

本試験では、投与終了後、雄において が 3000 ppm 投与群でのみ認められた。この際、 に有意な変動は認められない。また、雌では 250 ppm 投与群でのみ低下が認められたが、 には変化がみとめられない。この変化は、用量依存性がなく、検体投与に起因するものではないと判断した。

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

Fluxapyroxad

回復期間終了後はいずれの値も有意な変動は認められなかった。

表 5.

性別 試験群	雄				雌			
	投与群			回復群	投与群			回復群
投与量 (ppm)	250	1500	3000	3000	250	1500	3000	3000
検査動物数	10	10	20	10	10	10	20	10

対照群を 100%とした際の値

統計学的解析:

投与群: Kruskal-Wallis H and Wilcoxon test, two-side

↑↓: $p \leq 0.05$ 、↑↑↓↓: $p \leq 0.01$

回復群: Wilcoxon test, two-side

↑↓: $p \leq 0.05$ 、↑↑↓↓: $p \leq 0.01$

回復群 3000ppm 投与群は、対照群回復期との比較

本試験における結果を表 6 に示す。

表 6.

性別 試験群	雄				雌			
	投与群			回復群	投与群			回復群
投与量 (ppm)	250	1500	3000	3000	250	1500	3000	3000
検査動物数	10	10	20	10	10	10	20	10

対照群を 1とした際の値

統計学的解析: Wilcoxon test+Bonferoni-Holm-Adjustment

↑↓: $p \leq 0.05$ 、↑↑↓↓: $p \leq 0.01$

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

Fluxapyroxad

本試験では、検体投与後に全ての において、
 が認められた。多くは 250 ppm 以上で有意な が用量依存的に認められたが、 は、1500 ppm 以上で有意な上昇が認められた。これら投与期間終了直後の有意な増加は、回復期間を経て、ほとんどのものが対照群と同レベルまで低下したが、雄では が、雌では が対照群よりも有意に高い値を示していた。ただし、3000 ppm 投与終了直後の値よりは減少傾向にあったため、これらは、検体投与に起因するものと考えられる。

本検体を、最大投与量 3000 ppm (雄 : 192 mg/kg/day 雌 : 234 mg/kg/day) とし 2 週間にわたり混餌投与した場合、検体投与に起因する変化として以下のことが明らかとなった。

- 1 :
- 2 :
- 3 :
- 4 :

これらの結果から、本検体投与後の生体反応として以下の現象が考えられる。

本検体は、

以上の結果より、本検体は

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

16-2. ラットを用いた

(資料 29)

試験機関:

(GLP対応)

報告書作成年:

検体純度:

供試動物: CrI:WI (Han)系ラット 1群雌雄各6匹

試験開始時週齢; 雌雄 約6週齢

試験開始時体重; 雄 164.4-192.7 g 雌 140.4-165.7 g

投与期間: 2週間 ()

試験目的: ラットを用いた亜急性毒性試験(資料8)および反復投与神経毒性試験(資料11)において、

が認められた。そこで本試験は、
を目的とし、特に本検体の

を用いて検討した。

方法:

投与方法; 検体を飼料に混入し3000 ppmとして2週間にわたり摂取させた。また本試験では、

とした。

; 投与開始14日後、

を0.5 mL腹腔内投与した。6時間後に、さらに10mg/kg過塩素酸カリウム(KClO₄)または生理的食塩水(0.9% NaCl)を腹腔内投与し、その2分30秒後、頸椎脱臼により動物を屠殺、血液および甲状腺を採取し、放射活性を測定した。

本試験の試験群設定を表1に示す。

表1. 試験群設定

試験群	混餌投与	投与量 (ppm)	腹腔内投与	動物数 (雌雄)
00	非混入	0	0.9% NaCl	各6匹
01			10 mg/kg KClO ₄	各6匹
10	検体	3000	0.9% NaCl	各6匹
11			10 mg/kg KClO ₄	各6匹
20		2000	0.9% NaCl	各6匹
21			10 mg/kg KClO ₄	各6匹
30		1000	0.9% NaCl	各6匹
31			10 mg/kg KClO ₄	各6匹

試験項目および結果:

一般状態観察および死亡率; 本試験期間中、動物の一般状態、毒性徴候および生死を観察した。

本試験では、死亡例は認められず、また明らかな毒性徴候も認められなかった。

体重; 本試験期間中、1週間に1度、体重を測定した。

本試験で、有意差の認められた結果を表に示す。

表 2. 体重および体重増加量

試験群	項目	雄			雌		
		投与後日数					
		0	7	14	0	7	14
10: 検体	体重						
	体重増加						
11: 検体	体重						
	体重増加						
	体重						
	体重増加						
	体重						
	体重増加						
	体重						
	体重増加						

対照群を 100%とした際の値

統計学的解析: Dunnett's test, two-side, $\uparrow \downarrow : p \leq 0.05$, $\uparrow \uparrow \downarrow \downarrow : p \leq 0.01$.

* 数値がマイナスであったため、実測値を記載。統計学的解析は、 $p \leq 0.01$ 。

本試験では、試験群 10、20 および 30 の対照群を試験群 00、試験群 11、21 および 31 の対照群を試験群 01 とし、変動を算出している。

本試験では、検体投与群のうち、投与後 14 日の雄（試験群 11）で有意な体重増加量の減少が認められた。しかしながら、同処理の試験群 10 では有意な変化は認められていないため、検体投与に起因しないものと判断した。したがって、本検体投与は雌雄の体重に対して影響をおよぼさない。これに対し、は、雌雄ともに体重および体重増加量の有意な減少を引き起こした。これはに起因する毒性であると判断する。一方では、雄では有意な変動は認められなかったが、雌の 14 日後（試験群 30）で体重および体重増加量の有意な増加が認められた。しかしながら、同処理（試験群 31）では有意な変化は認められていない。したがって、PB 投与に起因しないものと判断した。

摂餌量および摂水量; 本試験期間中、1 週間に 1 度、摂餌量を測定した。また摂水量を毎日目視にて確認した。

摂水量に明らかな変化は認められなかった。

摂餌量では、検体投与群、、全て雌雄ともに検体
投与に起因する変化は認められなかった。で高値

が認められたが、これは飼料の取りこぼしによるものである。

検体摂取量; 飼料中の濃度分析値および摂餌量から、平均検体摂取量を算出した。結果を表 3 に示す。

表 3. 平均検体摂取量

投与量 (ppm)	検体			
	3000	2000	1000	
平均検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	283	231	89
	雌	247	192*	97

* : 試験群 21 は、投与 14 日後の数値は飼料の取りこぼしが多かったので、これを除いた値

; 本試験では、測定した

お

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

よび重量から、
結果を表 4 に示す。
(雄) ;

を算出した。

(雌) ;

本試験は、
を検討するため実施された。本試験目的のため、
以下
に各投与群での所見をまとめる。

(検体投与群)

本検体投与は、動物の体重や摂餌量に影響をおよぼさず、
は認められなかった。

においても変化

が示唆される。

()

が有意に抑制されていた。

()

は、
を誘起した。

が知られている。本試験で

これらの変化に影響をおよぼさなかった。

以上のように、本検体で認められた所見と

検体の

反応を示すことがわかる。したがって、本
と考えられる。

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

Fluxapyroxad

表 4. (雄)

飼料混入		対照	検体	PTU	PB
	+NaCl	重量 (mg)			
		対対照率 (%)			
	+KClO ₄	重量 (mg)			
		対対照率 (%)			
	+NaCl	カウント			
		対対照率 (%)			
	+KClO ₄	カウント			
		対対照率 (%)			
	+NaCl	カウント			
		対対照率 (%)			
	+KClO ₄	カウント			
		対対照率 (%)			
	+NaCl	カウント			
		対対照率 (%)			
	+KClO ₄	カウント			
		対対照率 (%)			
	+NaCl	カウント			
		対対照率 (%)			
	+KClO ₄	カウント			
		対対照率 (%)			
	+NaCl	実測比			
		対対照率 (%)			
	+KClO ₄	実測比			
		対対照率 (%)			

統計学的解析 : Wilcoxon test, two-side ↑ ↓ : $p \leq 0.05$, ↑ ↑ ↓ ↓ : $p \leq 0.01$

表 4. (雌)

飼料混入		対照	検体	PTU	PB
	+NaCl	重量 (mg)			
		対対照率 (%)			
	+KClO ₄	重量 (mg)			
		対対照率 (%)			
	+NaCl	カウント			
		対対照率 (%)			
	+KClO ₄	カウント			
		対対照率 (%)			
	+NaCl	カウント			
		対対照率 (%)			
	+KClO ₄	カウント			
		対対照率 (%)			
	+NaCl	カウント			
		対対照率 (%)			
	+KClO ₄	カウント			
		対対照率 (%)			
	+NaCl	実測比			
		対対照率 (%)			
	+KClO ₄	実測比			
		対対照率 (%)			

統計学的解析: Wilcoxon test, two-side ↑ ↓ : $p \leq 0.05$, ↑↑ ↓↓ : $p \leq 0.01$

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

Fluxapyroxad

16-3. ラットを用いた

(資料30)

試験機関:

(GLP対応)

報告書作成年:

検体純度:

供試動物: CrI:WI(Han)系ラット 1群雌雄各10匹

試験開始時週齢; 雌雄 約9週齢

試験開始時体重; 雄 270.0-324.7 g 雌 179.8-227.0 g

投与期間: 7、28 および 91 日間 ()

試験目的: 本試験は、ラットに検体を混餌投与した際の、 を検討するために実施した。

により評価した。

方法: 本検体を 250、1500 および 3000 ppm となるように飼料に混入し、7、28 および 91 日間与えた。本試験では、

また表1に、本試験の投与スケジュールを記載する。

表1. 投与スケジュール

試験群	投与前期間	投与期間	回復期間
91日投与群		試験0-91日	
28日投与群	試験0-63日	試験63-91日	試験91-119日
7日投与群	試験0-84日	試験84-91日	

臨床試験項目および結果:

一般状態および死亡率; 本試験期間中、一般状態および生死を観察した。

本試験期間中、死亡動物は認められなかった。

一般状態異常は認められなかったが、下顎切歯にのみ白色化が認められた。

切歯の白色化が認められた個体数を表2に示す。

表2. 切歯の白色化を呈する動物数

性別	雄				雌			
	対照	250	1500	3000	対照	250	1500	3000
投与量 (ppm)								
下顎歯	0	0	1	4	0	0	7	10

本検体の投与による切歯の白色化は、検体投与に起因するものであるが、反復経口投与神経毒性試験(資料11)でも論じたように、組織学的変動を伴わないため毒性徴候とは考えられない。したがって本試験では、歯の白色化に関する更なる試験を実施しなかった。

体重変化; 本試験期間中、1週間に1度、体重を測定した。また各測定時の体重増加量は投与開始日の体重を基に算出した。

対照群に対する体重および体重増加量の変動において認められた有意な変動を表3に示す。表3に示されるように、91日間投与群において3000 ppm群の雌は体重および体重増加量の有意な減少が認められた。また、1500 ppm投与群雌の投与後84/91日に体重のみの有意な減少が認められた。これらは検

体投与に起因するものと考えられる。28日間投与群において投与期間中および回復期間中の体重は対照群と差を認めなかった。しかし、体重増加は雄で試験98日、雌は回復期間中有意に低かった。体重の抑制には用量依存性があることから、3000 ppm群は検体投与による影響と考えられる。7日間投与群で認められた有意な変動は、検体を投与前の時期に認められたものであり、したがって検体投与に起因しないと判断する。

表 3. 体重および体重増加量

群	性別		雄			雌		
	投与量 (ppm)		250	1500	3000	250	1500	3000
91日投与	56日	体重						
	70日	体重						
	77日	体重						
	84日	体重						
		増加						
	91日	体重						
増加								
28日投与	98日	増加						
	105日	増加						
	112日	増加						
7日投与	7日	増加						
	14日	増加						
	21日	増加						
	28日	増加						
	56日	体重						
		増加						
	91日	体重						
		増加						

対照群を100%とした際の値

統計学的解析: Dunnett's test, Two-side ↑↓: $p \leq 0.05$, ↑↑↓↓: $p \leq 0.01$

空欄は有意差なし 増加: 体重増加量

摂餌量、食餌効率および摂水量; 本試験期間中、摂餌量を毎週測定(1日の摂餌量)した。また、測定した摂餌量および体重から、食餌効率を算出した。摂水量に関しては、目視で確認した。

摂餌量について、91日間投与群の3000 ppm投与雌で、対照群と比べて低値の傾向が、試験期間を通して認められた。これは投与に起因するものと考えられる。しかしながら、その他の試験群や雄動物では、明らかな傾向は認められなかった。

食餌効率および摂水量では、検体投与に関連する変化は認められなかった。

検体摂取量; 本試験における摂餌量および飼料中検体濃度から平均検体摂取量を算出した。

結果を表4に示す。

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 4. 平均検体摂取量

性別	雄			雌		
	250	1500	3000	250	1500	3000
平均検体摂取量 (mg/kg/day)	91日投与群					
	13	80	163	17	106	190
	28日投与群					
	12	79	122 (131)	15	87	173 (172)
7日投与群						
	12	61	104	15	79	137

() : 回復期を含む試験群

病理学的検査項目および結果：

肉眼的病理検査；投与期間（または回復期間）終了後、動物をイソフルラン麻酔下において断頭屠殺し、剖検を実施した。

表 5 に、本試験で認められた における肉眼的病理検査異常所見を示す。

表 5. における肉眼的病理検査異常所見

性別	雄				雌			
	対照	250	1500	3000	対照	250	1500	3000
投与量 (ppm)	91日投与群							
	0	0	0	0	0	0	3	10
		0	3	9	0	0	4	8
	28日投与群							
	0	0	8	10	0	0	0	10
	7日投与群							
	0	0	0	5	0	0	0	0

本試験では、各試験群の 1500 および 3000 ppm 投与群で認められた は検体投与の影響と考えられる。

臓器重量；剖検終了後、 を摘出し重量を測定した。また、本試験における対体重値は、麻酔動物の体重より算出した。

表 6 に有意差の認められた結果を示す。

- () 本試験では全試験群の 1500 および 3000 ppm 投与群雄で重量の増加が認められた。この重量増加は、絶対値および対体重値の両項目で認められるため、検体投与に起因する反応であると考えられる。雌においても同様な変化が全試験群の 3000 ppm 投与群および 91 日投与群の 1500 ppm 投与で認められた。また、 は、28 日投与群で設定した回復期が終了した際、完全に（雄）またはほぼ（雌）回復していた。
- () 検体投与に起因するような重量変化は認められなかった。

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

Fluxapyroxad

表 6. 肝臓および甲状腺重量

性別	雄			雌		
投与量 (ppm)	250	1500	3000	250	1500	3000
91 日投与群						
体重						
絶対値						
対体重値						
対体重値						
28 日投与群						
絶対値						
対体重値						
絶対値						
対体重値						
7 日投与群						
体重						
絶対値						
対体重値						
絶対値						
対体重値						

対照群を 100%とした際の値

統計学的解析: Kruskal-Wallis H and Wilcoxon test, two-side

↑ ↓ : $p \leq 0.05$, ↑ ↑ ↓ ↓ : $p \leq 0.01$ 空欄は有意差なし

病理組織学的検査；剖検および重量測定後、以下の組織を摘出し、HE 染色および免疫組織化学染色病理標本を作製、鏡検を実施した。なお、標本には
の鏡検はしなかった。

本試験では、 に検体投与に起因する病理組織学的検査異常所見が認められた。これら異常所見を表 7 に示す。

本試験では、

の検査を実施した。

本試験における結果を表 8 に示す。

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 7. における病理組織学的検査異常所見

性別	雄				雌			
	対照	250	1500	3000	対照	250	1500	3000
投与量 (ppm)								
91 日投与群								
検査臓器数	10	10	10	10	10	10	10	10
28 日投与群								
検査臓器数	10	10	10	10	10	10	10	10
7 日投与群								
検査臓器数	10	10	10	10	10	10	10	10

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

16-4. ラットを用いた

(資料 3 1)

試験機関:

(GLP対応)

報告書作成年:

検体純度:

供試動物: Crl:WI(Han)系ラット 1群雌雄各10匹

試験開始時週齢; 雌雄 約9週齢

試験開始時体重; 雄 253.6-284.8 g 雌 179.2-207.0 g

投与期間: 7、28 および 91 日間 ()

試験目的: 本試験は、ラットに検体を混餌投与した際の、 を検討するために、資料 3 0 の試験を補足する試験として実施した。

により評価した。

方法: 本検体を 50 ppm となるように飼料に混入し、7、28 および 91 日間与えた。本試験では、

また表 1 に、本試験の投与スケジュールを記載する。

表 1. 投与スケジュール

試験群	投与前期間	投与期間
91 日投与群		試験 0-91 日
28 日投与群	試験 0-63 日	試験 63-91 日
7 日投与群	試験 0-84 日	試験 84-91 日

臨床試験項目および結果:

一般状態および死亡率; 本試験期間中、一般状態および生死を観察した。

本試験期間中、死亡動物は認められず、また検体投与に起因する一般状態異常も認められなかった。

体重変化; 本試験期間中、1 週間に 1 度、体重を測定した。また各測定時の体重増加量は投与開始日の体重を基に算出した。

本試験では、検体投与に起因する体重変化は認められなかった。

摂餌量および摂水量; 本試験期間中、摂餌量を毎週 (1 日の摂餌量) 測定した。

摂水量に関しては、目視で確認した。

いずれの検査項目についても、検体投与に起因する変化は認められなかった。

検体摂取量; 本試験における摂餌量および飼料中検体濃度から平均検体摂取量を算出した。

結果を表 2 に示す。

表 2. 平均検体摂取量

50 ppm 投与	性別	7 日投与群	28 日投与群	91 日投与群
平均検体摂取量 (ppm)	雄	2.5	2.5	3.0
	雌	2.9	3.1	3.5

病理学的検査項目および結果:

肉眼的病理検査; 投与期間終了後、動物をイソフルラン麻酔下において断頭屠殺し、剖検を実施した。

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

Fluxapyroxad

本試験では、検体投与に起因する肉眼的病理検査異常所見は認められなかった。

臓器重量；剖検終了後、
を摘出し重量を測定した。また、本試験における対体重値は、麻酔動物の体重より算出した。

本試験では、統計学的有意な変化は認められなかった。

(統計学的解析：Wilcoxon test, one-side)

病理組織学的解析；剖検および重量測定後、以下の組織を摘出し、HE 染色および免疫組織化学染色病理標本を作製、鏡検を実施した。なお、
の鏡検はしなかった。

本試験では、検体投与に起因する病理組織学的検査異常所見は認められなかった。

本試験における結果を、表 3 に示す。

表 3.

性別	投与量 (ppm)			
91 日投与群				
雄	対照			
	50			
雌	対照			
	50			
28 日投与群				
雄	対照			
	50			
雌	対照			
	50			
7 日投与群				
雄	対照			
	50			
雌	対照			
	50			

統計学的解析：Wilcoxon test, one-side ↑ : $p \leq 0.05$ 、↑↑ : $p \leq 0.01$

本試験では、雄動物に
は認められなかった。これに対し雌動物
では、28 日投与群でのみ有意な
が認められた。しかしながら、
この
は非常に軽微なものであり、また
毒性学的意義はないものと判断した。

以上の結果より、本検体は 50 ppm では
と判断する。

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

Fluxapyroxad

16-4. ラットを用いた

(資料32)

試験機関:

(GLP対応)

報告書作成年:

検体純度:

供試動物: CrI:WI(Han)系ラット 1群雌雄各10匹

試験開始時週齢; 雄 約9週齢 雌 約8週齢

試験開始時体重; 雄 244.0-318.0 g 雌 173.4-218.0 g

投与期間: 1、3、7および14日間 ()

試験目的: 本試験は、ラットに検体を混餌投与した際の、 を検討するために実施した。

方法: 本検体を50、250、1500および3000 ppmとなるように飼料に混入し、1、3、7および14日間与えた。本試験では、

また表1に、本試験の投与スケジュールを記載する。

表1. 投与スケジュール

試験群	投与前期間	投与期間
14日投与群		試験0-14日
7日投与群	試験0-7日	試験7-14日
3日投与群	試験0-11日	試験11-14日
1日投与群	試験0-13日	試験13-14日

臨床試験項目および結果:

一般状態および死亡率; 本試験期間中、一般状態および生死を観察した。

本試験期間中、死亡動物は認められず、また検体投与に起因する一般状態異常所見も認められなかった。

体重変化; 本試験期間中、1週間に1度、体重を測定した。また各測定時の体重増加量は投与開始日の体重を基に算出した。

本試験では、検体投与に起因する体重および体重増加量の変化は認められなかった。

(統計学的解析: Dunnett's test, two-side)

摂餌量および摂水量; 本試験期間中、摂餌量を毎週(1日の摂餌量)測定した。

摂水量に関しては、目視で確認した。

検体投与による影響は、摂水量では認められなかった。

本試験では、雌雄ともに3000 ppm投与により、各試験群で摂餌量の減少傾向が認められた。これは検体投与に起因するものと考えられる。

検体摂取量; 本試験における摂餌量および飼料中検体濃度から平均検体摂取量を算出した。

結果を表2に示す。

表 2. 平均検体摂取量

性別	雄				雌			
投与量 (ppm)	50	250	1500	3000	50	250	1500	3000
平均検体摂取量 (mg/kg/day)	14日投与群							
	4.0	17	106	201	3.5	20	104	214
	7日投与群							
	3.3	16	100	183	3.5	17	92	195
	3日投与群							
	3.0	16	93	176	3.2	15	82	186
1日投与群								
	3.0	15	86	150	3.6	17	91	146

病理学的検査項目および結果：

肉眼的病理検査；投与期間終了後、動物をイソフルラン麻酔下において断頭屠殺し、剖検を実施した。

本試験における肝臓での肉眼的病理検査異常所見を表3に示す。

表 3. における肉眼的病理検査異常所見

性別	雄					雌				
投与量 (ppm)	対照	50	250	1500	3000	対照	50	250	1500	3000
14日投与群										
7日投与群										
3日投与群										
1日投与										

本試験では、3、7および14日投与群の1500・3000 ppm処理で、
雄に認められた。これは検体投与に起因すると考えられる。以外には、
検体投与に起因する異常所見は他臓器でも認められなかった。

臓器重量；剖検終了後、
を摘出し重量を測定した。また、本試験における対体重値は、麻酔動物の体重より算出した。

表4に有意差の認められた結果を示す。

本試験では、3、7および14日投与群の1500・3000 ppm処理、14日投与群の250 ppm処理で肝重量の有意な増加が認められた。この増加は、
の絶対値および対体重値の両項目で認められるものであるため、毒性学的意義があり、検体投与に起因する異常であると判断する。

その他、有意差のある変化が散見されたが、いずれも用量依存性が認められず、検体投与に起因しないものとする。

の有意な増加が3、7および14日投与群の雄ですべての用量で認められたが、これらの変化は投与に直接関連しているとは考えられなかった。

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

表 4. 臓器重量

性別	雄				雌				
	投与量 (ppm)	50	250	1500	3000	50	250	1500	3000
14日投与群									
絶対値									
対体重									
絶対値									
対体重									
7日投与群									
絶対値									
対体重									
絶対値									
対体重									
3日投与群									
絶対値									
対体重									
絶対値									
対体重									
1日投与群									
対体重									

対照群を100%とした際の値

統計学的解析: Kruskal-Wallis H and Wilcoxon, two-side

↑ ↓ : $p \leq 0.05$ ↑↑ ↓↓ : $p \leq 0.01$ 空欄は有意差なし

病理組織学的検査；剖検および重量測定後、以下の組織を摘出し、HE染色および免疫組織化学染色病理標本を作製、鏡検を実施した。なお、鏡検はしなかった。

本試験では、
本検体 3000 ppm の投与により、雄（7 および 14 日投与群）および雌（3、7 および 14 日投与群）動物で
投与では、同様に
が雄（7 および 14 日投与群）および雌（14 日投与群）動物で認められた。これに対し、1 日投与群や 50 ppm 投与用量では検体投与に起因するような異常所見は認められなかった。

本試験では、

の検査を実施した。

表 6.

性別	投与量 (ppm)			
14 日投与群				
雄	対照			
	50			
	250			
	1500			
	3000			
雌	対照			
	50			
	250			
	1500			
	3000			
7 日投与群				
雄	対照			
	50			
	250			
	1500			
	3000			
雌	対照			
	50			
	250			
	1500			
	3000			
3 日投与群				
雄	対照			
	50			
	250			
	1500			
	3000			
雌	対照			
	50			
	250			
	1500			
	3000			
1 日投与群				
雄	対照			
	50			
	250			
	1500			
	3000			
雌	対照			
	50			
	250			
	1500			
	3000			

統計学的解析: Wilcoxon test, one-side ↑ : $p \leq 0.05$, ↑↑ : $p \leq 0.01$

以上の結果より、本検体は が明らかとなっ
 た。また、本検体は が明らかとなっている（資料 28）。
 が明らかとなっている（資料 28）。これは、本試験結果と矛盾しないものである。

2. 代謝物

1. 土壌中代謝物

1-1. 代謝物のラットにおける急性経口毒性試験 (資料 IM-1)

試験機関：
(GLP対応)
報告書作成年：

検体純度：

供試動物： ウィスターCrI:WI (Han)系ラット 1群雌6匹

試験開始時週齢： 約10週齢

試験開始時体重： 172-183 g

雌選定理由： 雄が雌より感受性が強いと思われる示唆がなかったため、雌を選定した。

試験期間： 14日間観察

投与方法： 毒性等級法

検体をオリーブオイルに懸濁し、容量5 mL/kgで1回強制経口投与した。投与前に16時間以上絶食した。

まず、雌3匹を用いて、2000 mg/kgを投与した結果、死亡を認めなかったため、さらに、3匹に同一用量を投与した。

観察・検査項目： 中毒症状および生死を14日間観察した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について、肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与経路	経口
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌 >2000
死亡開始時間および終了時間	死亡例なし
症状発現時間および消失時間	投与後4時間から発現 投与後2日に消失
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌 <2000

中毒症状として、最初に投与した1例で投与後4-5時間に一般状態の抑制、呼吸困難および立毛、2例で投与1日に脱糞の減少が認められた。2回目に投与した動物には中毒症状は認められなかった。死亡例は認められなかった。
剖検で、特記すべき変化は認められなかった。

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

Fluxapyroxad

1-2. 代謝物 のラットを用いた 90 日間反復経口投与毒性試験

(資料 IM-7)

試験機関：

(GLP 対応)

報告書作成年：

検体純度：

供試動物：Wistar 系 CrI:WI (Han) ラット、1 群雌雄各 10 匹、開始時 42±1 日齢

投与期間：3 カ月間()

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、検体摂取量がそれぞれ 0、100、300 および 1000 mg/kg/day となるように濃度を調製した混餌を 3 カ月間にわたって随時摂食させた。第 1 週の混餌濃度は背景データの体重(雄 178.0 g、雌 135.0 g)および摂餌量(雄 20.0 g、雌 12.0 g)に基づいて算出した。2 週以降は前週の体重および摂餌量に基づいて毎週調製した。対照群の動物には基礎飼料(粉餌)のみ給餌した。

投与量設定根拠：限界用量の 1000 mg/kg を最高用量として選定し、以下 300 および 100 mg/kg を選定した。

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
流涙	眼瞼閉鎖	眼球突出	糞(外観/硬さ)	尿
				瞳孔径

検体の投与による一般状態の変化および死亡例は認められなかったが、1000 mg/kg 群の雄 1/10 例が投与 91 および 92 日に自然発生と思われる角膜混濁が認められた。

体重変化；投与期間中全動物の体重を毎週測定した。

体重および体重増加に投与関連性の変化は認められなかった。300 mg/kg 群雄の体重および体重増加は対照群に比べ低かったが、用量との相関は無く投与による影響とは考えられなかった。

摂餌量および食餌効率；ケージごとの摂餌量を毎週 1 回測定し、食餌効率も算出した。

摂餌量の日変動が対照群を含むすべての群で認められたが、対照群と投与群間の差に一定の傾向はなく、有意差も認められなかった。したがって、投与との関連性は考えられなかった。

1: KALEIDIS で実施した病理報告書は原文 296 頁以降を参照。

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

飲水量：飲水量について目視検査を毎日行った。

飲水量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以下の通りであった。

検体摂取量		投与量 (mg/kg)		
		100	300	1000
mg/kg/day	雄	94.6	285.7	953.6
	雌	98.8	295.1	983.1

機能観察総合検査 (FOB)；全動物を対象として、投与終了時に、以下の項目について FOB 検査を行った。

1) ホームケージ観察

姿勢 振戦 痙攣 異常行動 歩行異常 その他の異常

2) オープンフィールド (50 cm × 50 cm、高さ 25 cm) 観察

ケージから取り出し時の行動 被毛 皮膚 流涎 鼻漏
 流涙 眼/瞳孔径 姿勢 眼瞼閉鎖 呼吸 振戦 痙攣
 異常行動 歩行異常 活動/覚醒レベル 糞 (糞塊数/外観/硬さ/2分)
 尿 (量/色) /2分 立ち上がり回数/2分

3) 感覚運動検査/反射

接近反応 触覚反応 視覚 (視覚性置き直し反応) 瞳孔反射 耳介反射
 聴覚 (驚愕反応) 運動協調性 (立ち直り反応) 取り扱い時の行動
 発声 痛覚反応 (テイルピンチ) 前肢握力 後肢握力 着地開脚幅
 その他所見

ホームケージおよび オープンフィールド観察、感覚運動/反射検査において、検体投与に関連する変化は認められなかった。

自発運動量の測定；全動物を対象として、FOB 検査と同じ日 (試験終了時) に自発運動量を 60 分間 (5分 × 12セッション) 測定した。

100 mg/kg 群雄の運動量においてセッション 10 で有意な減少が認められたが、用量依存性はなく、総運動量にも有意な変化がないことから、偶発的で、投与に関連性はないと考えられた。

自発運動量

セッション	性別・投与量 (mg/kg)					
	雄			雌		
	100	300	1000	100	300	1000
10	4.2↓					
1~12	80	82	95	101	94	110

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

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率 (%) を示したものである。

血液学的検査：投与終了時に、少なくとも 16 時間絶食させた全動物を対象として、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次表に示す。

検査項目	性別・投与量 (ppm)					
	雄			雌		
	100	300	1000	100	300	1000
好酸球数					89 ↓	89 ↓
PTT					106 ↑	

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。

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率 (%) を示したものと

300 mg/kg 群の雌で PTT の延長 (34.6 秒) が対照群 (32.6 秒) に比し認められたが、用量依存性がなく、平均値は背景対照データの範囲 (26.3~37.9 秒) 内にあるので、偶発的であると考えられた。

300 および 1000 mg/kg 群の雌で好酸球数の軽度減少 (0.08 giga/L) が対照群 (0.09 giga/L) に比し認められたが、平均値は背景対照データの範囲 (0.06~0.12 giga/L) 内にあった。さらに、WBC の変化を伴っていなかったため、偶発的であると考えられた。

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)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CREA)、グルコース (Glu)、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次表に示す。

検査項目	性別・投与量 (mg/kg)					
	雄			雌		
	100	300	1000	100	300	1000
TG			158 ↑			

統計学的方法：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群平均値の対照群に対する変動率 (%) を示したものと

1000 mg/kg 群雄で TG の増加が認められたが、血液生化学的検査で認められた唯一の変化であり、肝臓に用量依存性のある組織学的変化が認められないことから、毒性学的意義のない変化と考えられた。

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

尿検査；血液学的検査と同時期に、各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次表に示す。

検査項目	性別・投与量 (mg/kg)							
	雄				雌			
	0	100	300	1000	0	100	300	1000
尿量 (mL)					2.3	2.2	1.2↓	2.2
比重 (g/L)					1063	1071	1093↑	1064
濃黄色尿	0/10	0/10	1/10	7/10				

統計学的方法：Fisher 直接確率検定(片側) ↑↓：p≤0.01

300 mg/kg 群の雌で尿量の減少に伴い比重の増加が認められたが、用量依存性がなく、投与関連性はないと考えられた。1000 mg/kg 群の 7/10 例および 300 mg/kg 群の 1/10 例で濃黄色尿が認められたが、検体あるいはその代謝物の排泄のためと考えられ、他に変化もないことから悪影響とは考えられなかった。

眼科学的検査；投与開始前に全群の全動物を、投与 91 日に 1000 mg/kg 群と対照群の全動物を検査した。

投与関連性の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を対象として、麻酔下で断頭によって屠殺、放血後、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	胸腺	甲状腺		

次表に統計学的有意差の認められた項目を示す。

臓器	性別・投与量 (ppm)					
	雄			雌		
	100	300	1000	100	300	1000
最終体重	98	94	100	100	98	97
胸腺	重量	79↓				
	対体重比		85↓			

Kruskal-Wallis H 検定および Wilcoxon 検定 (両側)：↓：p≤0.01

表中の数字は変動の目安として群平均値の対照群に対する変動率(%)を表したものである。

300 mg/kg 群の雄の胸腺重量にのみ有意な減少が認められたが、用量依存性もなく、病理組織学的変化もないことから、偶発的で投与関連性はないと考えられた。

肉眼的病理検査；試験終了時の全生存動物および途中死亡動物について、剖検を行った。

投与関連性のある所見は認められなかった。

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

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

および 1000 mg/kg 群の雌雄について全組織をヘマトキシリン・エオジンで染色して病理標本を作製し、鏡検した。

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	肝臓	腎臓	脾臓	副腎
膵臓	精巣	精巣上体	前立腺/精囊	凝固腺	卵巣	子宮	卵管
腔	唾液腺(下顎腺、舌下腺)			皮膚	雌の乳腺	食道	
胃(前胃、腺胃)	十二指腸	空腸(パイエル板を含む)	回腸	盲腸	結腸		
直腸	膀胱	リンパ節(腸間膜/下顎)	骨髄(大腿骨)				
坐骨神経	脊髄(頸髄、胸髄、腰髄)			眼(視神経を含む)	肉眼的異常病変		

認められた所見はこの系統のラットに通常認められる所見であり、投与関連性のある所見は認められなかった。

以上、Wistar 系ラットに本剤を 3 ヶ月間混餌経口投与した結果、最高設定用量の 1000 mg/kg の投与でも検体の投与に起因する毒性影響は認められなかった。したがって、無毒性量は 1000 mg/kg (雄 953.6 mg/kg/day、雌 983.1 mg/kg/day) であると判断する。

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

Fluxapyroxad

1-4. 代謝物 の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 IM-2)

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 法) およびプレインキュベーション法 (矢作、松島法) 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 μ g/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 μ g/プレート (TA1535, TA100, TA1537, TA98, WP2uvrA)

実験 2：+S9 mix 標準プレート法 (実験 1 で +S9 mix TA100 で実験に失敗したので再試験した)

濃度：0、20、100、500、2500、5000 μ g/プレート (TA100)

実験 3： \pm S9 mix プレインキュベーション法

濃度：0、312.5、625、1250、2500、5000 μ g/プレート (TA1535, TA100, TA1537, TA98, WP2uvrA)

実験 4： \pm S9 mix プレインキュベーション法

濃度：0、10、50、250、1250、2500 μ g/プレート (TA1535)

結果： 標準プレート法では約 2500 μ g/プレート、プレインキュベーション法では約 1250 μ g/プレート以上から his⁺または trp⁺変異体数の軽度減少が、菌株および濃度によるが観察された。検体の沈殿はすべての濃度で認められなかった。

検体は標準プレート法およびプレインキュベーション法共に S9 mix 非存在下および存在下に係らず変異体数の増加を認めなかった。

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-amino-acridine chloride monohydrate)、4-NQO (4-nitroquinoline-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、検体は代謝活性化に係らず、復帰突然変異誘発性を有しないと判断する。

実験1および2. 標準プレート法

(塩基対置換型)

濃度 μg/プレート	S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート												
		WP2 uvrA				TA1535				TA100				
対照 (DMSO)	-	32	33	35	33	14	25	16	18	127	104	108	113	
検体	20	-	23	36	29	29	20	21	14	18	91	104	112	102
	100	-	35	35	44	38	23	20	23	22	110	108	105	108
	500	-	29	28	35	31	15	18	17	17	79	97	104	93
	2500	-	37	28	33	33	19	22	17	19	75	87	83	82
	5000	-	25	32	27	28	7	9	13	10	77	53	30	53
対照 (DMSO)	+	48	37	30	38	14	21	13	16	91	132	114	112	
検体	20	+	40	39	32	37	18	17	10	15	114	98	104	105
	100	+	29	35	36	33	12	17	22	17	105	117	123	115
	500	+	32	37	33	34	14	22	18	18	88	100	95	94
	2500	+	32	27	29	29	20	25	21	22	97	85	88	90
	5000	+	26	27	14	22	21	10	18	16	87	91	75	84
陽性 対照 **	2-AA 2.5	+					123	126	79	109	764	768	847	793
	2-AA 60	+	176	213	204	198								
	MNNG 5	-					681	856	748	762	557	577	567	567
	AAC 100	-												
	NOPD 10	-												
	4-NQO 5.0	-	992	852	867	904								

(フレームシフト型)

濃度 μg/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	8	12	10	32	27	22	27	
検体	20	-	4	11	9	8	25	31	34	30
	100	-	6	9	10	8	24	27	18	23
	500	-	12	11	11	11	23	23	29	25
	2500	-	9	5	2	5	31	24	29	28
	5000	-	7	2	5	5	19	13	20	17
対照 (DMSO)	+	6	10	9	8	37	31	36	35	
検体	20	+	3	10	11	8	30	38	41	36
	100	+	8	9	6	8	23	38	34	32
	500	+	12	8	11	10	31	41	32	35
	2500	+	12	5	4	7	30	36	27	31
	5000	+	11	6	2	6	17	22	24	21
陽性 対照 **	2-AA 2.5	+	194	188	183	188	512	601	664	592
	2-AA 60	+								
	MNNG 5	-								
	AAC 100	-	335	401	328	355				
	NOPD 10	-					461	460	498	473
	4-NQO 5.0	-								

** : 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

実験3. プレインキュベーション法

(塩基対置換型)

濃度 μg/プレート	S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート												
		WP2 uvrA				TA1535				TA100				
対照 (DMSO)	-	29	28	37	31	15	12	15	14	120	99	97	105	
検体	312.5	-	31	25	33	30	18	29	24	24	75	104	109	96
	625	-	39	35	26	33	19	15	26	20	98	86	98	94
	1250	-	40	39	30	36	24	20	15	20	75	85	59	73
	2500	-	27	24	26	26	15*	10*	14*	13	22*	19*	19*	20
	5000	-	0*	0*	0*		0*	0*	0*		0*	0*	0*	
対照 (DMSO)	+	45	51	47	48	15	18	16	16	95	85	101	94	
検体	312.5	+	43	52	47	47	10	26	25	20	89	84	92	88
	625	+	48	40	44	44	13	15	16	15	98	100	107	102
	1250	+	41	40	35	39	14*	14*	11*	13	36*	44*	25*	35
	2500	+	23	27	25	25	0*	0*	0*		21*	15*	19*	18
	5000	+	12*	17*	21*	17	0*	0*	0*		0*	0*	0*	
陽性 対照 **	2-AA 2.5	+					114	128	150	131	995	851	930	925
	2-AA 60	+	559	598	785	647								
	MNNG 5	-					665	589	537	597	114 2	124 7	106 5	115 1
	AAC 100	-												
	NOPD 10	-												
	4-NQO 5.0	-	558	537	529	541								

(フレームシフト型)

濃度 μg/プレート	S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート								
		TA1537				TA98				
対照 (DMSO)	-	6	9	6	7	25	22	22	23	
検体	312.5	-	6	7	11	8	21	20	28	23
	625	-	8	11	9	9	22	16	25	21
	1250	-	12	5	11	9	18	15	18	17
	2500	-	10*	5*	5*	7	2*	3*	1*	2
	5000	-	0*	0*	0*		0*	0*	0*	
対照 (DMSO)	+	7	7	9	8	33	38	31	34	
検体	312.5	+	7	8	12	9	32	35	31	33
	625	+	5	9	8	7	29	32	34	32
	1250	+	7*	11*	5*	8	28*	24*	21*	24
	2500	+	5*	3*	4*	4	5*	8*	6*	6
	5000	+	0*	0*	0*		0*	0*	0*	
陽性 対照 **	2-AA 2.5	+	152	114	127	131	670	665	638	658
	2-AA 60	+								
	MNNG 5	-								
	AAC 100	-	335	360	370	355				
	NOPD 10	-					556	498	521	525
	4-NQO 5.0	-								

(太字は3反復の平均値を示す)

*: 菌叢抑制。

** : 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

実験4. プレインキュベーション法

(塩基対置換型)

濃度 μg/プレート	S9 Mix	復帰変異コロニー数 /プレート			
		TA1535			
対照 (DMSO)	-	16	13	18	16
検体	10	15	18	21	18
	50	14	14	11	13
	250	16	18	15	16
	1250	12	16	15	14
	2500	17*	12*	9*	13
対照 (DMSO)	+	14	18	15	16
検体	10	13	11	19	14
	50	15	12	16	14
	250	14	16	11	14
	1250	8*	8*	6*	7
	2500	0*	0*	0*	
陽性 対照 **	2-AA 2.5	111	135	128	125
	MNNG 5	663	670	621	651

(太字は3反復の平均値を示す)

* : 菌叢抑制。

** : 2-AA ; 2-aminoanthracene

MNNG ; N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

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

1-3. 代謝物 のウサギを用いた催奇形性試験

(資料 IM-8)

試験機関：

(GLP 対応)

報告書作成年：

検体純度：

供試動物：ニュージーランドホワイトウサギ [CrI:KBL(NZW)]、妊娠ウサギ投与群 31 羽、対照群 32 羽

妊娠 1 日週齢： 約 14~16 週齢

妊娠 1 日体重： 2333-3302 g

投与期間：23 日間()

投与方法：検体を直接 1%カルボキシメチルセルロース (CMC)に懸濁し、0、40、100 および 250 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、対照群の動物には溶媒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。

用量設定根拠：

観察・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 1、4、6、9、11、14、16、19、21、23、25、28 および 29 日に、摂餌量は妊娠 2 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。

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

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、残りの胎児の頭部を含む全胎児の骨格異常の有無を検査した。

試験結果：結果の概要を以下の表に示す。

母動物（表 1）；

（死亡/切迫屠殺）誤投与後、対照群、40 および 250 mg/kg 群でそれぞれ 2、1 および 1 例を屠殺した。40 mg/kg 群で流産（妊娠 21 日）が 1 例、100 mg/kg 群の 1 例が何ら症状を示すことなく死亡発見（妊娠 14 日）された。さらに 1 例は妊娠 29 日にケージに血液が認められ、他の 1 例は後肢骨折（妊娠 14 日）のために切迫屠殺した。これらの死亡/切迫屠殺例に投与関連性はみられなかった。

（体重、摂餌量）摂餌量の有意な減少が 40 および 100 mg/kg 群の妊娠 5～6 日、40 mg/kg 群の妊娠 7～8 日に認められたが、偶発的で、用量依存性も認められなかった。体重および体重増加は対照群に比し有意な差は認められなかった。

カーカス重量および補正体重増加〔最終体重－（妊娠子宮重量+妊娠 6 日の体重）〕はすべての群で同等であった。

（剖検所見）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）妊娠率が 72（対照群）～90%（100 mg/kg 群）の範囲にあったが、試験終了時に着床痕を有する雌数は 21～26 羽/群で評価に十分な動物数が得られた。すべての着床所見は対照群と同等であり、検体投与の影響は認められなかった。対照群の 1 例は早期吸収痕が 1 つのみで、生存胎児がいなかった。

（妊娠子宮重量）対照群と同等で、有意な差は認められなかった。

表 1 母動物の成績 (空欄は発生なし、異常なしまたは対照群と差なし)

投与量 (0 mg/kg/day)		対照 (0)	40	100	250
1 群当り雌動物数		32	31	31	31
不妊雌動物数		9	4	3	5
妊娠雌動物数 (%)		23 (72)	27 (87)	28 (90)	26 (84)
死亡数	誤投与後死亡	2	1		1
	死亡発見/切迫屠殺			2	
	流産後屠殺		1		
終了時妊娠腹数		21	25	26	25
全胚吸収腹数		1			
生存胎児を有する腹数		20	25	26	25
一般状態/ケージに血液				1	
体重 ^a	妊娠 29 日		96	97	99
体重増加 ^a	妊娠 1~6 日		67	67	63
	妊娠 6~28 日		104	103	105
	妊娠 1~29 日		95	94	94
摂餌量 ^a	妊娠 1~6 日		81	91	91
	妊娠 6~28 日		93	97	97
	妊娠 1~29 日		92	96	96
剖検所見	無所見動物数 (%)	27 (84)	29 (94)	26 (84)	30 (97)
	肺: 点状出血			1	
	肺葉: 左内側下欠損	1		1	
	胆嚢: 二裂	1			1
	胃: 空	1		1	
	途中死亡例の着床に特殊所見 流産例の着床に特殊所見		1	2	
妊娠子宮重量 (g)		475.7	458.0	448.8	453.6
カーカス重量 (g) ^b		3272.6	3138.9	3201.7	3251.5
補正体重増加 (g) ^c		243.4	295.9	303.5	296.5
着床所見 ^d	黄体数 (総数)	10.1 (213)	9.9 (248)	9.7 (252)	9.3 (232)
	着床数 (総数)	9.4 (197)	9.2 (229)	8.7 (226)	8.6 (216)
	着床前胚死亡率 (%)	8.4	8.9	11.1	7.3
	着床後胚損失数 (率%)	13 (10.3)	17 (8.7)	19 (7.9)	16 (8.2)
	総胚吸収数 (%)	0.6 (10.3)	0.7 (8.7)	0.7 (7.9)	0.6 (8.2)
	早期胚吸収数 (%)	0.2 (6.2)	0.5 (6.7)	0.6 (6.3)	0.4 (5.4)
	後期胚吸収数 (%)	0.4 (4.1)	0.2 (2.0)	0.2 (1.5)	0.2 (2.8)
	死亡胎児総数 全胚吸収の腹数		1		

^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率 (%) 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。() 内は総数または発生率%

統計学的方法: 有意差なし。

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

胎児動物（表 2）；

（胎児数、性比、胎児体重、胎盤重量）対照群と比較して有意差はなく、変動の範囲内にあった。

（胎児の異常）表 2 に示すように奇形が認められたが、個別の奇形に用量依存性はなく、投与関連性はないと考えられた。唯一、有意差の認められた異常は骨格変異のみで、250 mg/kg 群で過剰 13 肋骨（軟骨あり）が認められた。この所見は腹あたり胎児の発生率で有意で背景データを上回っていたが、腹の発生率見た場合には有意差を認めず、むしろ対照群の発生率よりも低かった。また、これらの発生率に用量依存性は認められなかった。このような骨化過程における軽微な変化はこの系統の妊娠 29 日の胎児には頻繁に認められるものである。

過剰 13 肋骨（軟骨あり）の発生率

投与量 (0 mg/kg/日)	本試験				背景データ*
	対照 (0)	40	100	250	
胎児の発生率 (%)	54.4	67.0	62.3	74.5	40.7 (0.0~60.4)
腹の発生率 (%)	100	96	92	96	67.5 (0.0~97.6)
腹あたり胎児の平均発生率 (%)	53.5	68.0	60.1	72.9 ↑	38.7 (0.0~59.7)

*: 実施した 5 試験 114 腹、943 胎児のデータ。

したがって、この所見に対する投与関連性はないと考えられる。その他の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。

表 2 胎児の成績

投与量 (0 mg/kg/day)		対照 (0)	40	100	250
生存胎児を有する雌数		20	25	26	25
生存胎児数 [腹当たり (総数)]		9.2 (184)	8.5 (212)	8.0 (207)	8.0 (200)
雄		4.8 (97)	4.2 (105)	4.6 (120)	4.6 (114)
雌		4.3 (87)	4.3 (107)	3.3 (87)	3.4 (86)
性比% (雄/雄+雌)		52.7	49.5	58.0	57.0
胎盤重量 (g) (雌雄の平均値)		5.3	5.2	5.2	5.5
生存胎児体重 (g) 合計		37.9	37.3	38.5	39.3
雄		38.7	37.4	38.7	39.1
雌		37.8	36.1	37.9	38.9
検査胎児 (腹) 数		184 (20)	212 (25)	207 (26)	200 (25)
外表異常	奇形: 胎児 (腹) 数		1 (1)	2 (2)	3 (3)
	腹当り平均発生率 (%)		0.4	0.6	1.2
	臍帯ヘルニア		1 (1)		2 (2)
	頭部複数奇形			1 (1)	
	眼瞼開存			1 (1)	1 (1)
	変異 (肢過屈曲):				
	胎児 (腹) 数		1 (1)		1 (1)
	腹当り平均発生率 (%)		0.5		0.5
	分類不能所見 (羊水過多):				
	胎児数 (腹数)		1 (1)		
腹当り平均発生率 (%)		0.7			
内臓異常	奇形: 胎児 (腹) 数	2 (2)	7 (6)	5 (4)	2 (2)
	腹当り平均発生率 (%)	1.1	4.3	2.1	0.8
	心臓/大動脈多重奇形			1 (1)	
	頭部内臓多重奇形			1 (1)	
	側脳室癒合			1 (1)	
	大動脈弓閉鎖		1 (1)		1 (1)
	大動脈起始異常	1 (1)			
	鎖骨下動脈欠損	1 (1)			
	動脈幹遺残		1 (1)		
	食道背方大動脈弓		1 (1)		
	筋性部心室中隔欠損		2 (2)		1 (1)
	巨心		1 (1)		
	横隔膜ヘルニア		1 (1)	2 (1)	
	脾臓小型				1 (1)
	腎臓位置異常		2 (2)		1 (1)
	腎臓欠損		1 (1)		
	尿管水腫		1 (1)		
	尿管欠損		1 (1)		
	変異: 胎児 (腹) 数	5 (4)	6 (5)	10 (7)	4 (4)
	腹当り平均発生率 (%)	2.7	6.4	6.4	1.9
	脳室拡張		2 (1)	2 (1)	
	頸動脈狭窄	1 (1)			
	頸動脈洞枝位置異常	2 (2)	1 (1)	4 (3)	3 (3)
肺動脈幹狭窄			1 (1)		
大動脈弓拡張		1 (1)	1 (1)		
肺欠損 (左肺下葉)	2 (1)	2 (2)	3 (3)	1 (1)	

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。

表 2 (つづき) 胎児の成績

投与量 (0 mg/kg/day)		対照 (0)	40	100	250
生存胎児を有する雌数		20	25	26	25
検査胎児(腹)数		184 (20)	212 (25)	207 (26)	200 (25)
内臓異常	分類不能所見：胎児(腹)数	4 (4)	5 (4)	1 (1)	2 (2)
	腹当り平均発生率 (%)	1.8	3.8	0.4	0.5
骨格異常	奇形：胎児(腹)数	8 (5)	8 (7)	8 (8)	7 (6)
	腹当り平均発生率 (%)	3.4	4.6	5.4	3.3
	頭頂間骨小型	2 (2)	1 (1)		
	頭頂開骨形態異常	3 (3)	1 (1)	2 (2)	2 (1)
	頭蓋骨癒合		1 (1)	1 (1)	
	重度奇形脊柱/肋骨	1 (1)	1 (1)	4 (4)	
	頸椎過剰			1 (1)	
	腰椎欠損			1 (1)	1 (1)
	重度奇形胸骨	1 (1)	2 (2)		2 (2)
	胸骨分節重度癒合 (bony plate) /軟骨未変化		3 (2)	1 (1)	
	胸骨分節重度癒合 (bony plate) /軟骨変化				1 (1)
	胸骨裂 (軟骨分離)				1 (1)
	分岐肋骨/軟骨あり				1 (1)
	癒合肋骨/軟骨あり	1 (1)			
	変異：胎児(腹)数	180 (20)	208 (25)	200 (26)	197 (25)
腹当り平均発生率 (%)	98.3	97.9	97.1	98.4	
過剰 13 肋骨/軟骨あり	98 (20)	142 (24)	129 (24)	149 (24)	
腹当り平均発生率 (%)	53.5	68.0	60.1	72.9 ↑	
分類不能所見：胎児(腹)数	29 (10)	25 (15)	26 (15)	14 (9)	
腹当り平均発生率 (%)	14.1	13.0	14.6	8.2	

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)：外表および内臓異常；Wilcoxon 検定 (片側)：腹当り平均奇形/変異発生率 ↑：p ≤ 0.05

以上の結果より、本剤を妊娠ウサギに投与 (妊娠 6~28 日) したとき、最高用量の 250 mg/kg 群でも投与関連性の影響は認められなかった。

従って、無毒性量 (NOEL) は母動物および胎児に対して 250 mg/kg/day であると判断される。催奇形性は 250 mg/kg/day でも認められなかった。

1-5. 代謝物 のチャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた遺伝子突然変異試験 (HPRT 試験)
(資料 1M-9)

試験機関:

(GLP 対応)

報告書作成年:

検体純度:

試験方法: 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 2 回の実験を行なった。評価は濃度-反応性をみるために複数濃度について行った。

溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。予備試験において 2000 $\mu\text{g/mL}$ で pH の変化がみられたので、DMSO に溶解した検体の原液はあらかじめ培地で希釈した後、2N NaOH を用いて必要により生理値に調整した。

用量設定根拠:

この結果から最高濃度として 2000 $\mu\text{g/mL}$ をまず選定し、以下の実験を 2 反復で行った。

実験 1 (\pm S9 mix で 4 時間処理) : 0、250、500、1000、2000 $\mu\text{g/mL}$

実験 2 (-S9 mix で 24 時間処理、+S9 mix で 4 時間処理) : 0、250、500、1000、2000 $\mu\text{g/mL}$

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 $\mu\text{g/mL}$] および陰性 (溶媒) 対照も同様に試験した。

細胞ストックを播種し ($3\sim 5 \times 10^5$ 個/フラスコ)、HAT 培地で 3~4 日間培養し、自然 HPRT 欠損突然変異体を除いた。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 時間培養後、試験に用いた。付着期間後、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 3×10^5 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。

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

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 および浸透圧の変化について S9 mix の非存在下および存在下の処理群の 2 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。

試験結果：細胞毒性および突然変異頻度を表 1~2、培養細胞の状態および培養条件について表 3 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 ($0.64 \sim 6.71/10^6$ 細胞) は溶媒対照 ($1.94 \sim 6.44/10^6$ 細胞) に近い値であり、背景溶媒対照データ (-S9 mix: $0.00 \sim 15.95/10^6$ 細胞、+S9 mix: $0.00 \sim 12.62/10^6$ 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。

S9 mix の非存在下および存在下にかかわらず、両試験とも細胞密度およびコロニー形成率 1 の抑制は認められず、細胞形態にも悪影響は認められなかった。また、検体の処理による浸透圧、pH への影響、検体の沈殿は認められなかった。

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. 試験結果-実験 1 (±S9 mix で 4 時間処理)

濃度 (μg/mL) (処理時間)	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	-	5.58	95.2	100.0	89.8	100.0	2.50	2.83
検体 (4 時間)	250	5.20	90.0	94.5	89.4	99.6	2.78	3.12
	500	7.06	98.7	92.2	94.3	105.0	4.17	4.39
	1000	7.10	96.8	101.7	90.8	101.1	0.56	0.64
	2000	7.19	90.9	95.5	86.9	96.8	2.50	2.85
陽性対照 EMS 300	-	6.47	91.7	96.3	72.5	80.7	55.84	77.13
溶媒対照 1% DMSO	+	4.23	90.4	100.0	87.1	100.0	5.56	6.44
検体 (4 時間)	250	5.76	83.6	92.5	85.2	97.8	2.23	2.63
	500	5.63	93.7	103.7	80.2	92.1	1.39	1.76
	1000	6.11	99.3	109.8	86.6	99.4	1.95	2.27
	2000	6.01	100.9	111.6	82.8	95.1	1.95	2.34
陽性対照 MCA 10.0	+	53.0	85.5	94.6	75.8	87.0	57.23	75.49

^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

DMSO: ジメチルスルホキシド

EMS: エチルメタンサルホネート

MCA: 3-メチルコラントレン

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	-	8.49	97.9	100.0	78.9	100.0	2.23	2.82
検体 (24 時間)	250	8.18	98.4	100.5	87.3	110.6	3.06	3.30
	500	9.18	96.3	98.4	87.8	111.3	1.39	1.52
	1000	8.96	96.3	98.4	96.7	122.6	6.39	6.71
	2000	8.50	64.8	66.2	96.5	122.3	0.84	0.89
陽性対照 EMS 300	-	7.07	78.9	80.6	65.4	82.9	239.44	367.17
溶媒対照 1% DMSO	+	3.78	97.8	100.0	91.6	100.0	1.67	1.94
検体 (4 時間)	250	6.04	96.0	98.2	79.5	86.8	3.89	4.92
	500	6.00	101.9	104.2	93.4	102.0	1.39	1.51
	1000	6.14	102.1	104.4	95.9	104.7	1.67	1.73
	2000	6.47	99.2	101.4	91.3	99.7	4.17	4.51
陽性対照 MCA 10.0	+	5.22	98.9	101.1	91.9	100.3	43.34	47.14

^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

DMSO: ジメチルスルホキシド

EMS: エチルメタンサルホネート

MCA: 3-メチルコラントレン

表 3 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/スライ ドへの 付着 ^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
溶媒対照 1% DMSO	-	+	7.7	399				
検体 (4 時間)	250	-	+		S	S	S	S
	500	-	+		S	S	S	S
	1000	-	+	7.8	471	S	S	S
	2000	-	+	7.9	490	S	S	S
溶媒対照 1% DMSO	+	+	7.4	374				
検体 (4 時間)	250	+	+		S	S	S	S
	500	+	+		S	S	S	S
	1000	+	+	7.5	449	S	S	S
	2000	+	+	7.8	515	S	S	S
溶媒対照 1% DMSO	-	+	7.2	372				
検体 (24 時間)	250	-	+		S	S	S	S
	500	-	+		S	S	S	S
	1000	-	+	7.2	399	S	S	S
	2000	-	+	7.2	414	S	S	S
溶媒対照 1% DMSO	+	+	7.0	341				
検体 (4 時間)	250	+	+		S	S	S	S
	500	+	+		S	S	S	S
	1000	+	+	7.2	352	S	S	S
	2000	+	+	7.1	367	S	S	S

空欄：測定せず

^a: +=完全に付着 (線維芽細胞様細胞)

^b: mOsm=milliosmolar

^c: S=溶解

1-6. 代謝物 のチャイニーズハムスターV79 細胞を用いた *in vitro* 染色体異常誘発性試験
(資料 IM-10)

試験機関:

(GLP 対応)

報告書作成年:

検体純度:

試験方法: チャイニーズハムスターV79 細胞を用いて、代謝活性化系の存在下(+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。

用量設定根拠:

10%牛胎児血清含有培地で培養し、調製した単細胞懸濁液 ($3\sim 8 \times 10^4$ 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 $1 \mu\text{g/mL}$ を処理した。

実験濃度 ($\mu\text{g/mL}$) 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 (4 時間処理後、さらに 14 時間培養後染色体標本作製):

0、125、250、**500**、**1000**、**2000** $\mu\text{g/mL}$

実験 2 -S9 mix (18 時間処理、処理直後染色体標本作製)

0、**250**、**500**、**1000**、**2000** $\mu\text{g/mL}$

-S9 mix (18 時間処理、10 時間培養後染色体標本作製)

0、1000、2000 $\mu\text{g/mL}$

+S9 mix (4 時間処理、24 時間培養後標本作製)

0、**250**、**500**、**1000**、**2000** $\mu\text{g/mL}$

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

実験 2 において-S9 mix (18 時間処理、10 時間培養後染色体標本を作製) では分裂細胞の質が悪く、染色体異常について評価できなかったため、同一条件で実験 3 を行った。

実験 3 -S9 mix (18 時間処理、さらに 10 時間培養後染色体標本を作製) :

0、1000、2000 $\mu\text{g/mL}$

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 $\mu\text{g/mL}$ を、+S9 mix ではシクロホスファミド (CPP) 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 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濃度合計 200 個、陽性対照群では各濃度合計 100 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 および浸透圧の変化について、 \pm S9 mix の非存在下および存在下の処理群の 2 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。

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。

実験 2 の-S9 mix (18 時間処理、処理直後染色体標本を作製) において、ギャップを含む染色体異常出現頻度の有意な増加が 250 および 1000 $\mu\text{g/mL}$ (それぞれ 10.5 および 9.5%) で溶媒対照群に比して認められたが、これらの値は背景データ (ギャップを含む染色体異常出現頻度 0.5~10.5%) の範囲内にあり、生物学的意義はないものと考えられた。また、ギャップを除く染色体異常出現頻度に有意な差は認められなかった。

その他の実験では S9 mix の有無に係らず、いずれも溶媒対照群に比し有意な差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実験 2 の-S9 mix 18 時間処理直後標本作成 (2000 $\mu\text{g/mL}$ で溶媒対照に比し 37.9%) のみであった。細胞増殖抑制も認められず、細胞形態にも異常は認められなかった。検体の添加による浸透圧等処理条件への影響はなかった。

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、*in vitro* で V79 細胞に対して染色体異常誘発性はないと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 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 CPP 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。

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	3.5	2.0	1.5				0.5		100.0	100.0
		検体	500	200	3.0	1.0	0.5				1.0		90.0	99.5
			1000	200	3.5	3.0	2.0				1.0		85.4	109.8
			2000	200	2.0	1.5	1.0						96.1	96.2
		EMS	500	100	22.0 \uparrow	17.0 \uparrow	8.0 \uparrow						-	92.9
	有	DMSO	1%	200	3.5	1.5	0.5				0.5		100.0	100.0
		検体	500	200	5.5	3.5	1.5						91.3	76.3
			1000	200	3.5	2.0	1.5				1.0		84.7	103.2
			2000	200	3.5	1.5	1.5				0.5		86.5	90.0
		CPP	0.5	100	19.0 \uparrow	18.0 \uparrow	7.7 \uparrow						-	106.4
実験 2 (18/0 時間)	無	DMSO	1%	200	4.0	2.5				0.5	0.5		100.0	100.0
		検体	250	200	10.5 \uparrow	4.0	1.0				0.5		104.6	100.5
			500	200	7.5	1.0				0.5	1.0		98.5	85.2
			1000	200	9.5 \uparrow	2.5	1.5			0.5	0.5		102.5	78.0
		EMS	500	100	23.0 \uparrow	21.0 \uparrow	14.0 \uparrow						-	78.6
実験 2 (4/24 時間)	有	DMSO	1%	200	0.5								100.0	100.0
		検体	500	200	3.5	2.5	2.0						98.5	149.5
			1000	200	3.0	2.5	0.5						98.7	172.6
			2000	200	1.5	1.0	0.5				1.5		102.4	145.7
		CPP	0.5	100	15.0 \uparrow	14.0 \uparrow	7.0 \uparrow						-	159.1
実験 3 (18/10 時間)	無	DMSO	1%	200	8.5	2.0	1.0				1.5		100.0	100.0
		検体	2000	200	9.0	5.0	2.0			0.5	1.5		89.5	149.3
		EMS	500	100	32.0 \uparrow	32.0 \uparrow	21.0 \uparrow	1.0					-	79.9

DMSO : ジメチルスルホキシド EMS : エチルメタンスルホネート

CPP : シクロホスファミド - : 測定せず

(空白) : 0.0

* 構造的染色体異常: G = キャンプ、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/スライドへの付着 ^a	スライドの評価 ^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	添加時 肉眼	3~4時間 肉眼	顕鏡		
実験 1 (4/14 時間)	無	DMSO	1%	+	E1	7.9	401	-	-	-	-	100.0	100.0
		検体	125	+	E1	-	-	S	S	S	S	99.4	-
			250	+	E1	-	-	S	S	S	S	96.8	-
			500	+	E1	-	-	S	S	S	S	90.0	99.5
			1000	+	E1	7.9	430	S	S	S	S	85.4	109.8
			2000	+	E1	7.9	421	S	S	S	S	96.1	96.2
	EMS	500	+	E1	-	-	-	-	-	-	-	92.9	
	有	DMSO	1%	+	E1	7.8	390	-	-	-	-	100.0	100.0
		検体	125	+	E1	-	-	S	S	S	S	95.4	-
			250	+	E1	-	-	S	S	S	S	93.4	-
			500	+	E1	-	-	S	S	S	S	91.3	76.3
			1000	+	E1	7.9	403	S	S	S	S	84.7	103.2
2000			+	E1	7.8	379	S	S	S	S	86.5	90.0	
CPP	0.5	+	E1	-	-	-	-	-	-	-	106.4		
実験 2 (18/0 時間)	無	DMSO	1%	+	E1	7.4	416	-	-	-	-	100.0	100.0
		検体	250	+	E1	-	-	S	S	S	S	104.6	100.5
			500	+	E1	-	-	S	S	S	S	98.5	85.2
			1000	+	E3	7.5	423	S	S	S	S	102.5	78.0
			2000	+	N2	7.5	399	S	S	S	S	111.0	37.9
		EMS	500	+	E1	-	-	-	-	-	-	-	78.6
実験 2 (18/10 時間)	無	DMSO	1%	+	N*	7.5	435	-	-	-	-	100.0	-
		検体	1000	+	N*	7.6	416	S	S	S	S	80.7	-
			2000	+	N*	7.6	427	S	S	S	S	75.3	-
		EMS	500	+	N*	-	-	-	-	-	-	-	-
実験 2 (4/24 時間)	有	DMSO	1%	+	E1	7.3	348	-	-	-	-	100.0	100.0
		検体	250	+	E1	-	-	S	S	S	S	85.9	-
			500	+	E1	-	-	S	S	S	S	98.5	149.5
			1000	+	E1	7.4	365	S	S	S	S	98.7	172.6
			2000	+	E1	7.4	372	S	S	S	S	102.4	145.7
		CPP	0.5	+	E1	-	-	-	-	-	-	-	159.1
実験 3 (18/10 時間)	無	DMSO	1%	+	E1	7.8	387	-	-	-	-	100.0	100.0
		検体	1000	+	E1	7.7	405	S	S	S	S	85.6	-
			2000	+	E1	7.8	404	S	S	S	S	89.5	149.3
		EMS	500	+	E1	-	-	-	-	-	-	-	79.9

-: 測定せず

^a: +=完全に付着 (線維芽細胞様細胞)

^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=評価可能中期分裂細胞数減少、一部は質不良

*: 分裂細胞の質が悪く、評価が不可能であった。

N2: 評価可能分裂細胞がない、またはごく少数、かつ一部は質不良

^c: mOsm=milliosmolar

^d: S=溶解

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
(資料 IM-11)

1-7. 代謝物 のマウスにおける小核試験

試験機関:

(GLP 対応)

報告書作成年:

検体純度:

供試動物: CrI:NMRI 系マウス (5~8 週齢、投与前日平均体重約 28.1 g)、1 群雄各 5 匹

方 法: 検体をコーンオイルに懸濁し 500、1000 および 2000 mg/kg の投与量で単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 (経口投与) およびビンクリスチン (VCR) 0.15 mg/kg (腹腔内投与) を単回投与した。

最終投与 24 時間後にすべての群の動物を、また投与 48 時間後に 2000 mg/kg 群および溶媒対照群の動物を屠殺して、各動物の両大腿骨骨髓を採取し、スライドグラス上にキシレンで固定後、エオジンおよびメチレンブルーで染色後、蒸留水で洗浄した。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。

全ての群で死亡および一般状態に異常は認められなかった。

検体投与群における小核を有する多染性赤血球の出現頻度は屠殺時期に係らず対照群と比較して統計学的に有意な増加を認めなかった。小核を有する正染性赤血球数も溶媒対照と差がなかった。

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。

以上の結果から、本試験条件下において、検体は *in vivo* で骨髓多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断される。

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

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	MNCE 数 (%)
					合計	d<D/4	d≥D/4		
24 時間	コーンオイル	10mL	5	10000	1.2	1.2	0.0	3663	0.3
	検体	500	5	10000	1.0	1.0	0.0	5607	0.7
		1000	5	10000	0.9	0.8	0.1	5328	1.1
		2000	5	10000	0.8	0.7	0.1	4328	0.7
	CPP	20	5	10000	14.4↑	14.4↑	0.0	4090	1.2
	VCR	0.15	5	10000	60.5↑	41.3↑	19.2↑	5077	0.4
48 時間	コーンオイル	10 mL	5	10000	0.8	0.8	0.0	3670	0.5
	検体	2000	5	10000	1.3	1.2	0.1	5550	0.9

CPP : シクロホスファミド

VCR : ビンクリスチン

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

MNCE : 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

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

2. 土壌中代謝物

2-1. 代謝物 のラットを用いた急性経口毒性試験 (資料 IM-3)

試験機関:

(GLP 対応)

報告書作成年:

検体純度:

供試動物: Cri:WI (Han) Wistar 系ラット 1 群 雌 6 匹

試験開始時週齢: 10 週齢

試験開始時体重: 158-175 g

雌選定理由: 雄が雌より感受性が高いと思われる示唆がなかったため、雌を選定した。

試験期間: 14 日間観察 ()

方法: 毒性等級法

検体をオリーブオイルに懸濁し、容量 5 mL/kg で 1 回強制経口投与した。投与前に 16 時間絶食した。

まず、雌 3 匹を用いて、2000 mg/kg を投与した結果、死亡を認めなかったため、さらに、3 匹に同一用量を投与した。

観察および検査項目: 中毒症状および生死を試験期間中観察した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について、肉眼的病理検査を行った。

結果:

投与経路	経 口
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌 >2000
死亡開始時間および終了時間	死亡例なし
症状発現時間および消失時間	投与後 2 時間から発現 投与後 5 時間以降に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌 <2000

中毒症状として、最初に投与した 2/3 例で投与後 2~5 時間に一般状態の悪化、呼吸困難および立毛が認められた。2 回目に投与した動物には中毒症状は認められなかった。死亡例は認められなかった。

剖検で、特記すべき変化は認められなかった。

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

Fluxapyroxad

2-2. 代謝物 のラットを用いた 90 日間反復経口投与毒性試験

(資料 IM-12)

試験機関：

(GLP 対応)

報告書作成年：

検体純度：

供試動物：Wistar 系 CrI:WI(Han) ラット、1 群雌雄各 10 匹、開始時 42±1 日齢

投与期間：3 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、検体摂取量がそれぞれ 0、100、300 および 1000 mg/kg/day となるように濃度を調製した混餌を 3 ヶ月間にわたって随時摂食させた。第 1 週の混餌濃度は背景データの体重および摂餌量(体重；雄 190.0 g、雌 140.0 g；摂餌量雄：18.0 g、雌 12.0 g)に基づいて算出した。2 週以降は前週の体重および摂餌量に基づいて毎週調製した。対照群の動物には基礎飼料(粉餌)のみ給餌した。

投与量設定根拠：

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
流涙	眼瞼閉鎖	眼球突出	糞(外観/硬さ)	尿
				瞳孔径

検体の投与による一般状態の変化および死亡例は認められなかった。

体重変化；投与期間中全動物の体重を毎週測定した。

体重および体重増加に投与関連性の変化は認められなかった。対照群雄の投与 42 日の体重に異常値が認められたため、欠測値とした。

摂餌量および食餌効率；ケージごとの摂餌量を毎週 1 回測定し、食餌効率も算出した。摂餌量に投与関連性の変化は認められなかった。食餌効率は散発的に有意な変化が認めら

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

れたが、摂餌量あるいは体重と全く関連が認められなかった。したがって、偶発的で投与との関連は考えられなかった。

飲水量：ケージごとに飲水量を毎週測定した。

飲水量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以下の通りであった。

検体摂取量		投与量 (mg/kg)		
		100	300	1000
mg/kg/day	雄	95.1	285.3	958.4
	雌	98.0	299.5	982.7

機能観察総合検査 (FOB)；全動物を対象として、投与終了時に、以下の項目について FOB 検査を行った。

1) ホームケージ観察

姿勢 振戦 痙攣 異常行動 歩行異常 その他の異常

2) オープンフィールド (50 cm × 50 cm、高さ 25 cm) 観察

ケージから取り出し時の行動 被毛 皮膚 流涎 鼻漏
流涙 眼/瞳孔径 姿勢 眼瞼閉鎖 呼吸 振戦 痙攣
異常行動 歩行異常 活動/覚醒レベル 糞 (糞塊数/外観/硬さ/2分)
尿 (量/色) /2分 立ち上がり回数/2分

3) 感覚運動検査/反射

接近反応 触覚反応 視覚 (視覚性置き直し反応) 瞳孔反射 耳介反射
聴覚 (驚愕反応) 運動協調性 (立ち直り反応) 取り扱い時の行動
発声 痛覚反応 (テイルピンチ) 前肢握力 後肢握力 着地開脚幅
その他所見

ホームケージおよび オープンフィールド観察、感覚運動/反射検査において、検体投与に関連する変化は認められなかった。

自発運動量の測定；全動物を対象として、投与期間の終了時に自発運動量を 60 分間 (5 分 × 12 セッション) 測定した。

各セッションで有意な変化は認められず、総運動量にも有意な変化は認められなかった。

血液学的検査；投与終了時に、少なくとも 16 時間絶食させた全動物を対象として、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。

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

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)

検体投与に関連する変化は認められなかった。

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グルタ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)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CREA)、グルコース (Glu)、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次表に示す。

検査項目	性別・投与量 (mg/kg)					
	雄			雌		
	100	300	1000	100	300	1000
Cl			99↓			
TRIG				152↑	143↑	
BUN			115↑			

統計学的方法：Kruskal-Wallis+Wilcoxon 検定 (両側) ↓： $p \leq 0.05$ ↑： $p \leq 0.01$
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率 (%) を示したもの

1000 mg/kg 群雄で Cl の減少が認められたが、他の電解質に変化はなく、Cl の値 (102.0 mmol/L) は背景データの範囲 (101.1~107.4 mmol/L) 内であり偶発的な変化と考えられた。また、同群雄の BUN の増加 (6.93 mmol/L) が認められ、背景データ (4.97~6.62 mmol/L) をわずかに上回っていたが、蛋白あるいはクレアチニンに変化がなく、病理組織学的関連性もなく、毒性学的意義のない変化と考えられた。

100 および 300 mg/kg 群の雌で TRIG の増加が認められたが、用量相関もなく、偶発的な変化と考えられた。

尿検査；血液学的検査と同時期に、各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

有意な変化はなく、検体投与に関連する変化は認められなかった。

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

Fluxapyroxad

眼科学的検査；投与開始前に全群の全動物を、投与 91 日に 1000 mg/kg 群と対照群の全動物を検査した。

検体投与関連性の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を対象として、麻酔下で断頭によって屠殺、放血後、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 胸腺 甲状腺

次表に統計学的有意差の認められた項目を示す。

臓器		性別・投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		100	300	1000	100	300	1000
最終体重		96	99	98	97	98	97
副腎	重量	92	83↓	98			
	対体重比	97	85↓	100			
胸腺	重量	84	95	78↓			

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

表中の数字は変動の目安として群平均値の対照群に対する変動率 (%) を表したものである。

雄において 300 mg/kg 群の副腎 (重量および対体重比) および 1000 mg/kg 群の胸腺重量の有意な減少が認められたが用量相関性あるいは病理組織学的変化もなく、また、胸腺は対体重比に有意な減少もないことから、偶発的で投与との関連はないと考えられた。

その他に有意な変化は認められなかった。

肉眼的病理検査；試験終了時の全生存動物および途中死亡動物について、剖検を行った。

投与関連性のある所見は認められなかった。

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、対照群および 1000 mg/kg 群の雌雄について、全組織をヘマトキシリン・エオジンで染色して病理標本を作製し、鏡検した。

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 肝臓 腎臓 脾臓 副腎
膵臓 精巣 精巣上体 前立腺/精囊 卵巣 子宮 卵管腔
唾液腺 (下顎腺、舌下腺) 皮膚 雌の乳腺 食道 胃 (前胃、腺胃)
十二指腸 空腸 (パイエル板を含む) 回腸 盲腸 結腸 直腸
膀胱 リンパ節 (腸間膜/腋窩) 骨髓 (大腿骨) 坐骨神経
脊髄 (頸髄、胸髄、腰髄) 眼 (視神経を含む) 肉眼的異常病変

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

認められた所見は対照群にも通常認められる所見であり、投与と関連のある変化は認められなかった。

以上、Wistar 系ラットに本剤を 3 ヶ月間混餌経口投与した結果、最高設定用量の 1000 mg/kg の投与でも検体の投与に起因する悪影響は認められなかった。したがって、無毒性量は 1000 mg/kg (実投与量；雄 958.4 mg/kg、雌 982.7 mg/kg) であると判断する。

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

Fluxapyroxad

2-4. 代謝物の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 IM-4)

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、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、WP2uvrA)

実験2： \pm S9 mix プレインキュベーション法

濃度：0、312.5、625、1250、2500、5000 μg /プレート (TA1535、TA100、TA1537、TA98、WP2uvrA)

結果： 標準プレート法では his+ 変異体数の減少、プレインキュベーション法では his+ または trp+ 変異体数の減少が、菌株および濃度によるが観察された。検体の沈殿はすべての濃度で認められなかった。

検体は標準プレート法およびプレインキュベーション法共に S9 mix の非存在下および存在下に係らず変異体数の増加を認めなかった。

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-amino-acridine chloride monohydrate)、4-NQO (4-nitroquinoline-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)

濃度 μg/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											TA100	
		WP2 uvrA				TA1535								
対照 (DMSO)	-	40	41	51	44	18	17	16	17	120	105	145	123	
検体	20	30	42	40	37	19	20	13	17	130	119	116	122	
	100	38	33	38	36	24	19	15	19	117	84	101	101	
	500	47	32	41	40	18	25	15	19	129	132	114	125	
	2500	31	49	58	46	15	24	17	19	121	129	124	125	
	5000	36	33	31	33	22	12	13	16	104	103	124	110	
対照 (DMSO)	+	47	53	55	52	16	19	15	17	122	122	138	127	
検体	20	38	63	50	50	23	20	19	21	129	124	138	130	
	100	51	58	56	55	12	15	13	13	127	145	147	140	
	500	50	41	65	52	13	19	20	17	145	127	140	137	
	2500	45	60	53	53	16	20	14	17	137	120	93	117	
	5000	38	46	37	40	14	22	20	19	126	114	119	120	
陽性 対照 **	2-AA 2.5	+				217	182	190	196	1159	970	1056	1062	
	2-AA 60	+	369	364	378	370								
	MNNG 5	-					656	670	893	740	589	640	503	577
	AAC 100	-												
	NOPD 10	-												
	4-NQO 5.0	-	891	888	832	870								
濃度 μg/プレート	S9 Mix	フレームシフト型												
		TA1537				TA98								
対照 (DMSO)	-	8	8	11	9	34	40	36	37					
検体	20	10	7	9	9	37	34	42	34					
	100	8	3	5	5	28	27	28	28					
	500	9	8	7	8	35	29	27	30					
	2500	10	6	9	8	27	48	35	37					
	5000	6	6	8	7	28	27	23	26					
対照 (DMSO)	+	8	10	11	10	44	47	45	45					
検体	20	11	9	15	12	40	51	54	48					
	100	12	9	12	11	53	45	46	48					
	500	11	10	17	13	41	48	57	49					
	2500	7	7	7	7	32	32	33	32					
	5000	6	7	10	8	30	27	23	27					
陽性 対照 **	2-AA 2.5	+	170	144	129	148	602	870	937	803				
	2-AA 60	+												
	MNNG 5	-												
	AAC 100	-	305	317	319	314								
	NOPD 10	-					530	470	520	507				
	4-NQO 5.0	-												

** : 2-AA: 2-aminoanthracene NOPD: 4-nitro-o-phenylenediamine
MNNG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
AAC: 9-aminoacridine 4-NQO: 4-nitroquinoline-N-oxide

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

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)

濃度 μg/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)	-	27	41	45	38	14	18	15	16	118	93	105	105	
検体	312.5	-	59	44	58	54	22	19	16	19	101	122	88	104
	625	-	57	39	48	48	13	21	18	17	103	93	80	92
	1250	-	50	52	47	50	15	10	19	15	118	95	111	108
	2500	-	35	42	30	36	12	15	13	13	86	81	89	85
	5000	-	0*	0*	0*		0*	0*	0*		0*	0*	0*	
対照 (DMSO)	+	37	43	44	41	13	16	20	16	122	104	105	110	
検体	312.5	+	36	35	34	35	12	17	14	14	84	92	110	95
	625	+	30	38	41	36	18	17	14	16	100	104	90	98
	1250	+	35	43	36	38	18	16	14	16	103	110	79	97
	2500	+	30	29	27	29	15	13	11	13	70	66	72	69
	5000	+	14*	16*	14*	15	6*	8*	2*	5	0*	0*	0*	
陽性 対照 **	2-AA 2.5	+					152	120	166	146	616	718	719	684
	2-AA 60	+	209	241	236	229								
	MNNG 5	-					973	992	907	957	1120	1002	1007	1043
	AAC 100	-												
	NOPD 10	-												
	4-NQO 5.0	-	588	558	585	577								
濃度 μg/プレート	S9 Mix	フレームシフト型												
		TA1537				TA98								
対照 (DMSO)	-	9	12	7	9	26	23	38	29					
検体	312.5	-	6	7	9	7	29	26	30	28				
	625	-	9	7	5	7	31	26	22	26				
	1250	-	7	11	7	8	26	22	29	26				
	2500	-	8	4	11	8	17	16	21	18				
	5000	-	0*	0*	0*		0*	0*	0*					
対照 (DMSO)	+	8	11	10	10	33	38	38	36					
検体	312.5	+	7	10	9	9	31	29	43	34				
	625	+	12	8	8	9	32	35	31	33				
	1250	+	10	5	8	8	36	30	33	33				
	2500	+	3	7	7	6	24	25	20	23				
	5000	+	0*	0*	0*		0*	0*	0*					
陽性 対照 **	2-AA 2.5	+	130	117	120	122	536	592	509	546				
	2-AA 60	+												
	MNNG 5	-												
	AAC 100	-	332	360	319	337								
	NOPD 10	-					739	725	700	721				
	4-NQO 5.0	-												

* : 菌叢抑制

** : 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

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

2-3. 代謝物 のウサギを用いた催奇形性試験

(資料 IM-13)

試験機関 :

(GLP 対応)

報告書作成年 :

検体純度 :

供試動物 : ニュージーランドホワイトウサギ [CrI:KBL(NZW)]、約 14~16 週齢、

妊娠ウサギ 100 および 300 mg/kg 群各 25 羽、1000 mg/kg 群 35 羽、対照群 60 羽

妊娠 1 日週齢 : 約 14~16 週齢

妊娠 1 日体重 : 2430-3463 g

投与期間 : 23 日間(

)

コホート 5 として、生存胎児を有する腹数を十分に確保する目的で、対照群および高用量群に各 10 羽を設定した。なお、対照群の 2 例が妊娠 6 および 8 日に死亡したので同一バッチのウサギに置き換えた。

投与方法 : 検体を直接 1%カルボキシメチルセルロース(CMC)に懸濁し、0、100、300 および 1000 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、対照群の動物には溶媒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)

観察・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 1、4、6、9、11、14、16、19、21、23、25、28 および 29 日に、摂餌量は妊娠 2 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、残りの胎児の頭部を含む全胎児の骨格異常の有無を検査した。

試験結果：結果の概要を以下の表に示す。

母動物（表 1）：

（一般状態/死亡）：誤投与による死亡が対照群および 1000 mg/kg 群でそれぞれ 3 および 2 例認められた。100 mg/kg 群の 1 例（妊娠 9 日）および 1000 mg/kg 群の 1 例（妊娠 17 日）が何ら症状を示すことなく、300 mg/kg 群の 1 例妊娠 9～20 日に脱糞がなく、妊娠 20 日に死亡発見された。これらの死亡は投与に関連性がないと考えられた。

1000 mg/kg 群で死亡例が有意に多く、流産および死亡/切迫殺例の多くは摂餌量が非常に少なく、一般状態不良、脱糞減少/なし、下痢、低体温等を示し、投与による影響と考えられた。

（体重、摂餌量）：1000 mg/kg 群で摂餌量の有意な減少が妊娠 13～22 日に認められ、投与期間（妊娠 6～28 日）の平均摂餌量は対照群に比し、88%と少なく、妊娠期間中の摂餌量は有意に減少していた（対照群の 89%）。1000 mg/kg 群の体重に有意差は認められなかったが、体重増加は妊娠 14～16 および 28～29 日に有意に抑制され、妊娠期間中の総体重増加量は対照群に比し 79%で有意に抑制された。300 および 100 mg/kg 群の体重および体重増加量は対照群と同等であった。

カーカス重量および補正体重増加〔最終体重－（妊娠子宮重量+妊娠 6 日の体重）〕はすべての群で対照群と同等であった。

（剖検所見）：すべての群で表 1 に示す通り所見が認められた。ほとんどの場合、剖検所見は一般状態の変化と一致していたため 1000 mg/kg 群の所見は投与関連性があると考えられた。

（着床所見）：妊娠率が 68 (300 群)～83% (1000 mg/kg 群) の範囲にあったが、試験終了時に着床痕を有する雌数は 17～41 羽/群で評価に十分な動物数が得られた。すべての着床所見は対照群と同程度であり、検体投与の影響は認められなかった。

（妊娠子宮重量）：対照群と同等で、有意差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

表 1 母動物の成績 (空欄は発生なし、異常なしまたは対照群と差なし)

投与量 (mg/kg/day)		対照 (0)	100	300	1000
1 群当り雌動物数		60	25	25	35
不妊雌動物数		14	6	8	6
妊娠雌動物数 (%)		46 (77)	19 (76)	17 (68)	29 (83)
死亡数	誤投与後死亡	3			2
	流産後屠殺	2	1		5
	死亡発見/切迫屠殺		1	1	5
	合計	5	2	1	12 [†]
終了時妊娠腹数 (%)		41 (68)	17 (68)	17 (68)	18 (51)
全胚吸収腹数					
生存胎児を有する腹数		41	17	17	18
一般状態	一般状態不良	1			3
	低体温	1			2
	ケージに血液	1	1		1
	脱糞なし/減少	2		1	3/1
	側臥位				2
	下痢				1
体重 ^a	妊娠 29 日	100	98	101	96
体重増加 ^a	妊娠 1~6 日	100	86	71	75
	妊娠 6~28 日	100	101	119	86
	妊娠 1~29 日	100	98	110	79 [‡]
摂餌量 ^a	妊娠 1~6 日	100	97	89	95
	妊娠 6~28 日	100	96	104	88
	妊娠 1~29 日	100	96	101	89 [‡]
剖検所見	無所見動物数 (%)	55 (92)	22 (88)	24 (96)	20 (57)
	誤投与後所見 (胸腔体液/検体/飼料残存)	3			2
	肝臓: 蒼白				1
	胃: 乾燥し固い飼料残存			1	
	胃: 糜爛				1
	胃: 潰瘍		1		2
	胃: 胃壁多量出血				1
	胃: 空				1
	水様便				3
	小腸/直腸: 糞なし		1		5
	小腸: 膨張				1
	死亡/切迫乳動物の着床に特殊所見	1	1		4
	流産動物の着床に特殊所見	2	1		5
子宮: 異常粘膜				1	
妊娠子宮重量 (g)		474.8	466.2	488.9	404.4
カーカス重量 (g) ^b		3275.7	3197.5	3283.1	3201.6
補正体重増加 (g) ^c		168.6	181.2	298.3	132.7

^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率 (%) 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)

統計学的方法: ↓ ↑ p ≤ 0.05, †‡: p ≤ 0.01

Dunnnett 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;

Fisher 直接確率検定 (片側): 死亡率、妊娠雌数

表 1(続き) 母動物の成績 (空欄は発生なし、異常なしまたは対照群と差なし)

投与量 (mg/kg/day)		対照 (0)	100	300	1000
1 群当り雌動物数		60	25	25	35
不妊雌動物数		14	6	8	6
終了時妊娠腹数 (%)		41 (68)	17 (68)	17 (68)	18 (51)
着床 所見 ^d	黄体数 (総数)	10 (409)	11.0 (187)	10.5 (179)	9.5 (171)
	着床数 (総数)	9.0 (371)	9.9 (169)	9.8 (166)	8.6 (154)
	着床前胚死亡率 (%)	9.4	9.6	8.8	10
	着床後胚損失率 (%)	5.7	10.6	7.9	10.1
	総胚吸収数 (%)	0.5 (5.7)	0.9 (10.6)	0.8 (7.9)	0.9 (10.1)
	早期胚吸収数 (%)	0.3 (3.9)	0.6 (6.9)	0.6 (6.1)	0.5 (5.7)
	後期胚吸収数 (%)	0.2 (1.7)	0.4 (3.7)	0.2 (1.8)	0.4 (4.4)
	死亡胎児総数				
全胚吸収の腹数					

^d: 腹当たり。()内は総数または発生率%

統計学的方法: Dunnett 検定(両側): 着床所見。 有意差なし。

胎児動物 (表 2):

(胎児数、性比、胎児体重、胎盤重量): 対照群と比較して有意差はなく、変動の範囲内にあった。

(胎児の異常): 外表および内臓異常ともに投与関連性のある所見は認められなかった。骨格奇形の有意な増加が 300 mg/kg 群(奇形胎児を有する総腹数および腹当たり奇形胎児発生率、重度奇形脊柱/肋骨を有する腹数および腹当たり胎児発生率)並びに 1000 mg/kg 群(変形頭頂間骨を有する腹当たり胎児発生率)で認められたが、明確な用量との関連がなく、また背景データの範囲内にあり、投与による変化ではないと考えられた。

骨格変異として、頸椎中心不完全骨化(腹当たり胎児発生率)、胸骨分節不完全骨化(腹当たり胎児発生率)および過剰 13 肋骨/軟骨あり(腹当たり胎児発生率)、距骨/軟骨あり(腹当たり胎児発生率)の投与群における有意な増加が認められたが、いずれもこの系統によく認められる所見であり、可逆性あるいは基本骨格に大きく影響することのない骨化遅延または軽微な骨化の乱れであった。明確な用量依存性もなく、背景データの未処置動物にも比較的高頻度で見られることから、投与との関連性はないと考えられた。

申請者注)

その他の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。

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 胎児の成績 (空欄は発生なし、異常なしまたは対照群と差なし)

投与量 (mg/kg/day)	対照 (0)	100	300	1000	背景 [†] -% 平均(最小-最大)	
生存胎児を有する雌数	41	17	17	18	-	
生存胎児数[腹当たり(総数)]	351 (8.6)	153 (9.0)	152 (8.9)	138 (7.7)		
雄	177 (4.3)	8.2 (48)	77 (4.5)	72 (4.0)		
雌	174 (4.2)	71 (4.2)	75 (4.4)	66 (3.7)		
性比 % (雄/雄+雌)	50.4	53.6	50.7	52.2		
胎盤重量 (g) (雌雄の平均値)	5.3	4.9	5.2	5.0		
生存胎児体重 (g) 合計	38.7	36.1	38.4	36.4		
雄	39.2	36.2	38.8	36.7		
雌	38.1	36.0	37.8	35.9		
検査胎児(腹)数	351[41]	153[17]	152[17]	138[18]	767[93]	
外表異常	奇形: 胎児数(腹数)	4(3)	1(1)	2(2)		
	腹当り平均発生率 (%)	1.4	0.6	1.5		
	胃壁破裂	1[1]				
	臍帯ヘルニア			1[1]		
	口蓋裂	2[1]				
	眼瞼開存			1[1]		
	肢異常回転	1[1]	1[1]	1[1]		
	短尾	1[1]				
	変異(肢過屈曲): 胎児数(腹数)	2(2)				
	腹当り平均発生率 (%)	0.9				
内臓異常	分類不能所見: 胎児数(腹数)	5(4)	1(1)		3(1)	
	腹当り平均発生率 (%)	1.5	0.6		2.8	
	奇形: 胎児数(腹数)	2(2)	2(1)		2(2)	
	腹当り平均発生率 (%)	0.5	1.1		1.4	
	横隔膜ヘルニア	1[1]	1[1]			
	肝臓変形	1[1]				
	腎臓位置異常		1[1]		1[1]	
	小腸短小				1[1]	
	変異: 胎児数(腹数)	12(9)	8(6)	6(6)	4(4)	
	腹当り平均発生率 (%)	3.3	6.4	3.6	3.0	
脳室拡張			1[1]			
頸動脈洞枝位置異常	2[2]		3[3]	1[1]		
腕頭動脈短小	1[1]	1[1]				
鎖骨下動脈狭窄				1[1]		
大動脈狭窄	1[1]					
肺動脈幹狭窄	1[1]					
肺欠損(左肺下葉)	8[6]	7[5]	1[1]	3[3]		
腎盂拡張			1[1]			
分類不能所見: 胎児数(腹数)	1(1)	1(1)				
腹当り平均発生率 (%)	0.3	0.5				

胎児の外表、内臓および骨格異常検査の各所見の xx[yy]は以上を有する胎児数[腹数]を示す。

統計学的方内の数値は法: 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): 外表および内臓異常、腹当たり奇形発生率; Wilcoxon 検定(片側): 腹当たり平均奇形/変異発生率 †: p ≤ 0.05 ††: p ≤ 0.01

表 2 胎児の成績 (空欄は発生なし、異常なしまたは対照群と差なし)

投与量 (mg/kg/day)	対照 (0)	100	300	1000	背景データ % 平均(最小-最大)	
検査胎児(腹)数	351[41]	153[17]	152[17]	138[18]	767[93]	
骨格異常	奇形：胎児数(発生率%)	3(0.9)	3(2.0)	6(3.9)	4(2.9)	3.4(1.7-5.2)
	腹数(発生率%)	3(7.3)	3(18)	5↑(29)	4(22)	20.4(10.7-33.3)
	腹当り平均発生率(%)	1.1	1.7	4.5↑	2.4	3.1(1.8-4.6)
	小型頭頂間骨		1[1]			
	変形頭頂間骨：胎児数(発生率%)	1(0.3)	1(0.7)	1(0.7)	3(2.2)	0.4(0.0-1.6)
	腹数(発生率%)	1(2.4)	1(5.9)	1(5.9)	3(17)	3.2(0.0-15.0)
	腹当り平均発生率(%)	0.2	0.6	0.4	1.9↑	0.2(0.0-1.2)
	変形口蓋骨		1[1]			
	頭頂間骨欠損			1[1]		
	重度奇形脊柱/肋骨：胎児数(発生率%)			4(2.6)	1(0.7)	0.1(0.0-0.4)
	腹数(発生率%)			4↑(24)	1(5.6)	1.1(0.0-3.6)
	腹当り平均発生率(%)			2.9↑	0.5	0.1(0.0-0.4)
	尾椎癒合(変形軟骨)	1[1]				
	重度変形胸骨	1[1]				
	変異：胎児数(発生率%)	345(98)	148(97)	146(96)	137(99)	94.1(88.1-97.8)
	腹数(発生率%)	41(100)	17(100)	17(100)	18(100)	100.0
	腹当り平均発生率(%)	98.5	97.0	95.7	99.4	93.1(86.6-98.3)
	頸椎中心不完全骨化：胎児数(発生率%)	123(35)	62(41)	55(36)	72(52)	8.6(0.0-27.7)
	腹数(発生率%)	36(88)	14(82)	12(71)	16(89)	29.0(0.0-90.0)
	腹当り平均発生率(%)	35.0	37.0	31.2	50.5↑	8.4(0.0-29.0)
胸骨分節不完全骨化：胎児数(発生率%)	122(35)	49(32)	68(45)	65(47)	15.6(0.0-22.8)	
腹数(発生率%)	37(90)	13(76)	17(100)	15(83)	46.2(0.0-70.0)	
腹当り平均発生率(%)	33.2	29.3	45.8↑	43.7	15.2(0.0-22.6)	
過剰 13 肋骨/軟骨あり：胎児数(発生率%)	21260	106(69)	82(54)	112(81)	34.7(0.0-53.3)	
腹数(発生率%)	40(98)	17(100)	15(88)	18(100)	61.3(0.0-100.0)	
腹当り平均発生率(%)	59.7	72.4↑	52.2	81.3↑	32.6(0.0-53.5)	
距骨不完全骨化/軟骨あり：胎児数(発生率%)	11(3.1)	12(7.8)	7(4.6)	11(8.0)	2.3(0.0-8.2)	
腹数(発生率%)	5(12)	5(29)	4(24)	7↑(39)	12.9(0.0-45.0)	
腹当り平均発生率(%)	2.2	6.3↑	3.1	6.7↑	1.9(0.0-7.4)	
分類不能：胎児数(発生率%)	42(12)	9(5.9)	20(13)	16(12)	19.6(15.8-22.7)	
腹数(発生率%)	24(59)	5(29)	11(65)	9(50)	64.5(50.0-75.0)	
腹当り平均発生率(%)	11.5	4.9	14.3	9.2	19.9(14.1-23.9)	
肋骨軟骨部胸骨に未結合：胎児数(発生率%)	23(6.6)	2(1.3)	15(9.9)	10(7.2)	8.5(4.8-14.4)	
腹数(発生率%)	12(29)	1(5.9)	10↑(59)	4(22)	40.9(28.6-58.3)	
腹当り平均発生率(%)	6.5	1.1	10.4	5.2	8.6(4.6-14.0)	

胎児の外観、内臓および骨格異常検査の各所見の xx[yy]は以上を有する胎児数[腹数]を示す。

統計学的方法：Fisher 直接確率検定 (片側)：腹当たり奇形発生率; Wilcoxon 検定 (片側)：腹当たり平均奇形/変異発生率 ↑：p≤0.05 ↑↑：p≤0.01

以上の結果より、本剤を妊娠ウサギに投与 (妊娠 6~28 日) したとき、各投与群で認められた毒性所見を次表に示す。

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

投与群 (mg/kg)	親動物	児動物
1000	<ul style="list-style-type: none">・ 流産/死亡例の増加・ 一部に一般状態不良、脱糞なし/減少、下痢、低体温・ 摂餌量の減少・ 体重増加の抑制・ 一部に胃潰瘍/糜爛、水様便、腸に糞なし	毒性所見なし
≤300	毒性所見なし	毒性所見なし

1000 mg/kg 群で流産/死亡例の増加が認められ、一部動物で一般状態不良、下痢、低体温等が認められ、胃潰瘍/糜爛、水様便等の剖検所見と一致していた。摂餌量が減少し、脱糞なし/減少、腸に糞なしがみられ、体重増加の抑制を伴っていた。胎児には最高用量の 1000 mg/kg/day でも投与関連性の影響は認められなかった。

従って、無毒性量 (NOAEL) は母動物に対して 300 mg/kg/day、胎児に対して 1000 mg/kg/day であると判断される。催奇形性は 1000 mg/kg/day でも認められなかった。

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

Fluxapyroxad

2-5. 代謝物 のチャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた遺伝子突然変異試験 (HPRT 試験)
(資料 IM-14)

試験機関:

(GLP 対応)

報告書作成年:

検体純度:

試験方法: チャイニーズハムスター卵巣細胞由来の培養細胞 (CHO-K3 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 実験を各 2 反復で行なった。評価は濃度-反応性をみるために複数濃度について行った。

溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。予備試験において 1650 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で pH の変化がみられたので、DMSO に溶解した検体の原液はあらかじめ培地で希釈した後、2N NaOH を用いて生理値 (pH 6.3~7.2) に調整した。

用量設定根拠:

この結果から最高濃度として 1650 $\mu\text{g}/\text{mL}$ をまず選定し、以下の実験を 2 反復で行った。

実験 1 (-S9 mix で 4 時間処理) : 0, 500, 750, 1000, 1500, 1650 $\mu\text{g}/\text{mL}$
(+S9 mix で 4 時間処理) : 0, 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1650 $\mu\text{g}/\text{mL}$

実験 2 (-S9 mix で 24 時間処理) : 0, 500, 750, 1000, 1500, 1650 $\mu\text{g}/\text{mL}$
(+S9 mix で 4 時間処理) : 0, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1650 $\mu\text{g}/\text{mL}$

実験において、+S9 mix の最低濃度 (1100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で強い細胞毒性が認められたので、さらに、実験 3 を行った。

実験 3 (+S9 mix で 4 時間処理) : 0, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1650 $\mu\text{g}/\text{mL}$
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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、S9 mix の存在下では 3-メチルコラントレン (MCA) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$] 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いた細胞ストックを播種し (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

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

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 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 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 6~7 日後、コロニーを固定・染色して計測した。

検体処理後の細胞毒性 (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 時間の附着時間経過後、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 および浸透圧の変化について S9 mix の非存在下および存在下の処理群の 2 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。

試験結果：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 3 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 ($0.00 \sim 6.94/10^6$ 細胞) は溶媒対照 ($0.29 \sim 3.18/10^6$ 細胞) に近い値であり、背景溶媒対照データ (-S9 mix: $0.00 \sim 14.73/10^6$ 細胞、+S9 mix: $0.00 \sim 10.24/10^6$ 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。

実験 1 では+S9 mix $1650 \mu\text{g}/\text{mL}$ で、実験 2 および 3 では+S9 mix $1200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で、対照群を 100%とした場合の相対コロニー形成率 1 が 20%を下回り、明らかな細胞毒性が示された。-S9 mix では実験 1、2 ともに細胞毒性は認められなかった。

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。全ての実験で、試験終了時の培地中に検体の沈殿は認められなかった。

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. 試験結果-実験 1 (±S9 mix で 4 時間処理)

濃度 (µg/mL) (処理時間)	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	-	4.39	77.2	100.0	95.7	100.0	3.06	3.18	
検体 (4 時間)	500	-	6.76	75.9	98.3	90.4	94.5	1.11	1.23
	750	-	7.12	80.4	104.1	88.0	92.0	0.28	0.31
	1000	-	7.22	84.5	109.5	93.2	97.4	1.67	1.81
	1500	-	7.12	72.8	94.3	92.3	96.4	0.00	0.00
	1650	-	6.98	72.0	93.3	86.4	90.3	0.56	0.65
陽性対照 EMS 300	-	6.92	83.3	107.9	90.3	94.4	63.61	70.99	
溶媒対照 1% DMSO	+	6.04	79.5	100.0	83.2	100.0	1.95	2.20	
検体 (4 時間)	125	+	6.07	82.9	104.3	80.3	96.5	3.34	4.15
	250	+	6.48	77.7	97.7	77.1	92.7	3.34	4.32
	500	+	6.27	80.2	100.9	80.4	96.6	0.56	0.68
	750	+	6.29	82.6	103.9	85.0	102.2	1.39	1.65
	1000	+	6.19	77.9	98.0	86.2	103.6	0.84	0.97
	1250	+	6.42	80.3	101.0	89.2	107.2	0.56	0.62
	1500	+	6.76	80.0	100.6	85.5	102.8	1.67	1.95
	1650	+	1.84	0.0	0.0	82.3	98.9	3.06	3.90
陽性対照 MCA 10.0	+	6.25	81.2	102.1	79.5	95.6	70.84	89.13	

^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

DMSO: ジメチルスルホキシド

EMS: エチルメタンサルホネート

MCA: 3-メチルコラントレン

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	-	6.22	89.8	100.0	99.7	100.0	1.39	1.33	
検体 (24 時間)	500	-	6.51	92.7	103.2	92.7	93.0	5.00	5.38
	750	-	6.33	84.7	94.3	90.7	91.0	2.22	2.45
	1000	-	7.20	91.6	102.0	92.8	93.1	0.00	0.00
	1500	-	7.02	98.8	110.0	96.3	96.6	6.12	6.35
	1650	-	7.39	95.4	106.2	96.2	96.5	2.23	2.31
陽性対照 EMS 300	-	4.61	78.1	87.0	88.6	88.9	304.72	342.36	
溶媒対照 1% DMSO	+	3.27	99.4	100.0	102.3	100.0	0.28	0.29	
検体 (4 時間)	1100	+	3.26	23.8	23.9	103.8	101.5	2.78	2.64
	1200	+	3.56	17.2	17.3	112.8	110.3	2.78	2.44
	1300	+	2.99	13.4	13.5	95.2	93.1	6.39	6.94
	1400	+	2.42	12.2	12.3	101.9	99.6	0.00	0.00
	1500	+	2.65	4.9	4.9	95.8	93.6	2.22	2.32
	1600	+	3.02	3.6	3.6	100.3	98.0	0.28	0.29
	1650	+	3.16	5.4	5.4	93.0	90.9	2.50	2.76
陽性対照 MCA 10.0	+	6.65	105.6	106.2	98.7	96.5	30.28	30.72	

^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

DMSO: ジメチルスルホキシド

EMS: エチルメタンサルホネート

MCA: 3-メチルコラントレン

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 3. 試験結果-試験 3 (+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 突然変異頻度 (10 ⁶ 個当り)		
			コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		補正前	補正後 ^a	
			絶対値	相対値	絶対値	相対値			
溶媒対照 1% DMSO	+	5.56	98.2	100.0	92.8	100.0	2.23	2.38	
検体 (4 時間)	400	+	4.46	93.7	95.4	89.2	96.1	0.28	0.32
	600	+	5.42	70.9	72.2	89.5	96.4	0.56	0.68
	800	+	4.95	74.1	75.5	85.2	91.8	2.23	2.60
	1000	+	4.44	21.1	21.5	82.6	89.0	1.95	2.21
	1200	+	4.49	13.9	14.2	80.5	86.7	0.28	0.36
	1400	+	4.03	5.8	5.9	-	-	-	-
1650	+	3.79	1.8	1.8	-	-	-	-	
陽性対照 MCA 10.0	+	5.49	102.7	104.6	82.7	89.1	57.50	69.48	

^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、培養を継続できなかった。

DMSO: ジメチルスルホキシド

EMS: エチルメタンサルホネート

MCA: 3-メチルコラントレン

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/スライ ドへの 付着 ^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
溶媒対照 1% DMSO	-	+	7.4	302					
検体 (4 時間)	500	-	+		S	S	S	S	
	750	-	+		S	S	S	S	
	1000	-	+		S	S	S	S	
	1500	-	++	7.4	278	S	S	S	S
	1650	-	+++	7.3	387	S	S	S	S
溶媒対照 1% DMSO	+	+	7.1	255					
検体 (4 時間)	125	+	+		S	S	S	S	
	250	+	+		S	S	S	S	
	500	+	+		S	S	S	S	
	750	+	+		S	S	S	S	
	1000	+	+		S	S	S	S	
	1250	+	+		S	S	S	S	
	1500	+	+	7.1	256	S	S	S	S
1650	+	++	7.1	354	S	S	S	S	
溶媒対照 1% DMSO	-	+	7.4	260					
検体 (24 時間)	500	-	+		S	S	S	S	
	750	-	+		S	S	S	S	
	1000	-	+		S	S	S	S	
	1500	-	+	7.4	349	S	S	S	S
	1650	-	+	7.4	364	S	S	S	S
溶媒対照 1% DMSO	+	+	7.1	235					
検体 (4 時間)	1100	+	+		S	S	S	S	
	1200	+	+		S	S	S	S	
	1300	+	+		S	S	S	S	
	1400	+	+		S	S	S	S	
	1500	+	+		S	S	S	S	
	1600	+	++	7.0	344	S	S	S	S
	1650	+	++	7.1	358	S	S	S	S
溶媒対照 1% DMSO	+	+	7.1	267					
検体 (4 時間)	400	+	+		S	S	S	S	
	600	+	+		S	S	S	S	
	800	+	+		S	S	S	S	
	1000	+	+		S	S	S	S	
	1200	+	+		S	S	S	S	
	1400	+	+	7.1	360	S	S	S	S
	1650	+	++	7.1	367	S	S	S	S

空欄：測定せず

^a: +=完全に付着 (線維芽細胞様細胞)

+++ = 付着減少 (大部分の細胞が円形)

^b: mOsm=milliosmolar

^c: S=溶解

++ = 付着軽度減少 (少数の円形細胞)

++++ = 完全に剥離、全ての細胞が円形

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

2-6. 代謝物 のチャイニーズハムスターV79 細胞を用いた *in vitro* 染色体異常誘発性試験

(資料 IM-15)

試験機関:

(GLP 対応)

報告書作成年:

検体純度:

試験方法: チャイニーズハムスターV79 細胞を用いて、代謝活性化系の存在下 (+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。

用量設定根拠:

これらの結果か

ら 1600 µg/mL を最高濃度として選定し、実験を行った。

10%牛胎児血清含有培地で培養し、調製した単細胞懸濁液 ($3\sim 8 \times 10^4$ 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、標本を作製した。

-S9 mix で 18 時間血清添加培地で連続培養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、標本を作製した。なお、細胞採取 2~3 時間前にコルセミド 1 µg/mL を処理した。

詳細な実験条件および細胞の処理濃度 (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 時間培養後染色体標本を作製):

濃度: 0、100、200、400、**800**、1600 µg/mL

実験 2 (-S9 mix で 4 時間処理後、さらに 14 時間培養後染色体標本を作製):

濃度: 0、200、400、600、**800**、1200、1600 µg/mL

実験 3 (-S9 mix で 18 時間処理、処理直後染色体標本作製) :

濃度 : 0、100、200、400、800、1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$

(-S9 mix で 18 時間処理、さらに 10 時間培養後染色体標本作製) :

濃度 : 0、400、800、1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$

(+S9 mix で 4 時間処理、さらに 24 時間培養後標本作製) :

濃度 : 0、100、200、400、800、1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$

実験 4 : 実験 3 は技術的誤りによる細胞損傷のために評価できなかったので、実験 4 を同一濃度で繰り返した。

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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濃度あたり合計 200 個、陽性対照群では合計 100 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 および浸透圧の変化について、 \pm S9 mix の非存在下および存在下の処理群の 2 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。

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。

実験 1 では -S9 mix (4 時間処理、処理 18 時間後染色体標本作製) において、構造的染色体異常出現頻度の有意な増加は認められなかったが、背景値 (0.0~5.5%) を超えるギャップを含まない染色体異常頻度の増加傾向が 800 および 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で認められた。+S9 mix (4 時間処理、処理 18 時間後染色体標本作製) ではギャップを含むおよび含まない染色体異常出現頻度の有意な増加が 400 および 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で認められたが、いずれも明確な用量相関はなく、生物学的に意義のない変動と考えられた。

実験 2 では -S9 mix (4 時間処理、処理 18 時間後染色体標本作製) でギャップを含む染色体異常出現頻度の有意な増加が認められたが、ギャップを含まない染色体異常出現頻度の有意な増加は認められず、いずれも実験 1 の結果を再現していなかった。

実験 3 は技術的誤りによる細胞損傷のために評価できなかったので、実験 4 を同一濃度で繰り返した。

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

Fluxapyroxad

実験 4 では-S9 mix (18 時間処理、処理直後に染色体標本作成、および 18 時間処理、処理 10 時間後染色体標本作製) において、構造的染色体異常出現頻度の有意な増加は認められなかった。+S9 mix (4 時間処理、処理 24 時間後染色体標本作製) ではギャップを含む染色体異常出現頻度の有意な増加が 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で認められたが、ギャップを含まない染色体異常出現頻度の有意な増加は認められなかった。400 および 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でギャップを含まない染色体異常出現頻度の有意な増加が認められたが、1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では認められず、用量との関連はなかった。

また、実験 1, 2 および 4 において数的染色体異常出現頻度の有意な増加は認められなかった。

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、*in vitro* で V79 細胞に対して染色体異常誘発性はないと判断された。

検体の処理開始時、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上でわずかに pH が低下 (6.5~7.2) したが、処理終了時には pH および浸透圧に影響はなく、すべての実験条件下で細胞増殖および細胞分裂の抑制は認められなかった。また、構造的染色体異常を評価したすべての濃度で細胞形態に影響は認められなかった。

陽性対照物質である EMS および CPP 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。

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	6.5	4.5	2.5				1.0		7.4	100.0
		検体	400	200	10.0	4.5	2.5				1.5		9.0	121.8
			800	200	12.0	8.5	6.0				1.0		9.8	133.3
			1600	200	12.5	6.5	4.0	0.5			1.5		10.0	136.1
		EMS	500	100	20.0 \uparrow	18.0 \uparrow	9.0 \uparrow						8.4	113.6
	有	DMSO	1%	200	3.0	0.5					0.5		11.6	100.0
		検体	400	200	10.0 \uparrow	5.0 \uparrow	1.5				1.5	1.0	10.9	93.5
			800	200	7.0	2.5	1.0				0.5	1.5	11.2	96.1
			1600	200	10.5 \uparrow	4.5 \uparrow	2.0	0.5			1.0		11.1	95.3
		CPP	0.5	100	25.0 \uparrow	16.0 \uparrow	8.0 \uparrow						7.6	65.5
実験 2 (4/14 時間)	無	DMSO	1%	200	2.5	0.5					0.5	0.5	8.4	100.0
		検体	800	200	5.5	2.5	1.0				0.5	1.0	8.6	102.4
			1200	200	5.5	1.5	0.5				3.3	1.0	7.6	90.5
			1600	200	9.5 \uparrow	3.0	2.0				1.0	0.5	7.5	89.3
		EMS	500	100	25.0 \uparrow	16.0 \uparrow	9.0 \uparrow						6.5	76.8
実験 4 (18/0 時間)	無	DMSO	1%	200	4.0	1.0	0.5						5.4	100.0
		検体	400	200	2.0	1.0					0.5		7.2	133.3
			800	200	3.0	1.0							6.8	125.9
			1600	200	3.5	2.5					1.0		7.0	129.6
		EMS	500	100	18.0 \uparrow	16.0 \uparrow	11.0 \uparrow						6.5	120.4
実験 4 (18/10 時間)	無	DMSO	1%	200	6.0	4.0	1.5			1.0	0.5		13.9	100.0
		検体	1600	200	7.0	3.5	0.5				1.0		16.8	121.3
		EMS	500	100	32.0 \uparrow	28.0 \uparrow	21.0 \uparrow						9.1	65.3
実験 4 (4/24 時間)	有	DMSO	1%	200	5.0					0.5	1.0		14.3	100.0
		検体	400	200	7.0	3.0 \uparrow	1.0			0.5	1.5		12.3	86.3
			800	200	9.0	3.5 \uparrow	0.5			1.0	1.5		14.2	99.3
			1600	200	12.5 \uparrow	1.5			0.5		1.5		14.7	103.2
		CPP	0.5	100	23.0 \uparrow	21.0 \uparrow	7.0 \uparrow						14.5	101.4

DMSO : ジメチルスルホキシド EMS : エチルメタンサルホネート
 CPP : シクロホスファミド - : 測定せず (空白) : 0.0

* 構造的染色体異常: G = キャンプ、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) $\uparrow p \leq 0.05$, $\uparrow\uparrow p \leq 0.01$

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/スライドへの付着 ^a	スライドの評価 ^b	pH ^c	浸透圧 mOsm ^d	溶解性/観察				細胞毒性 (%)	
								溶媒 肉眼	培地			細胞数	分裂頻度
									添加時 肉眼	処理終了時 ^e 肉眼 顕鏡			
実験 1 (4/14 時間)	無	DMSO	1%	+	E1	7.8	393	-	-	-	-	100.0	100.0
		検体	100	+	E1	-	-	S	S	S	S	107.5	*
			200	+	E1	-	-	S	S	S	S	104.4	*
			400	+	E1	-	-	S	S	S	S	98.0	121.8
			800	+	E1	7.8	369	S	S	S	S	92.5	133.3
			1600	+	E1	7.6	376	S	S	S	S	99.6	136.1
	有	DMSO	1%	+	E1	7.6	414	-	-	-	-	100.0	100.0
		検体	100	+	E1	-	-	S	S	S	S	95.6	*
			200	+	E1	-	-	S	S	S	S	96.3	*
			400	+	E1	-	-	S	S	S	S	94.9	93.5
			800	+	E1	7.5	367	S	S	S	S	89.4	96.1
			1600	+	E1	7.2	384	S	S	S	S	101.8	95.3
実験 2 (4/14 時間)	無	DMSO	1%	+	E1	7.6	413	-	-	-	-	100.0	100.0
		検体	200	+	E1	-	-	S	S	S	S	93.1	*
			400	+	E1	-	-	S	S	S	S	98.5	*
			600	+	E1	-	-	S	S	S	S	86.2	*
			800	+	E1	-	-	S	S	S	S	86.7	102.4
			1200	+	E1	7.5	394	S	S	S	S	89.7	90.5
			1600	+	E1	7.5	393	S	S	S	S	90.1	89.3
実験 4 (18/0 時間)	無	DMSO	1%	+	E1	7.8	394	-	-	-	-	100.0	100.0
		検体	100	+	E1	-	-	S	S	S	S	80.7	*
			200	+	E1	-	-	S	S	S	S	70.7	*
			400	+	E1	-	-	S	S	S	S	81.4	133.3
			800	+	E1	7.7	385	S	S	S	S	81.0	125.9
			1600	+	E1	7.6	399	S	S	S	S	64.8	129.6
実験 4 (18/10 時間)	無	DMSO	1%	+	E1	7.6	431	-	-	-	-	100.0	100.0
		検体	400	+	E1	-	-	S	S	S	S	98.9	*
			800	+	E1	7.6	409	S	S	S	S	103.7	*
			1600	+	E1	7.4	429	S	S	S	S	106.9	121.3
実験 4 (4/24 時間)	有	DMSO	1%	+	E1	7.4	407	-	-	-	-	100.0	100.0
		検体	100	+	E1	-	-	S	S	S	S	101.1	*
			200	+	E1	-	-	S	S	S	S	99.6	*
			400	+	E1	-	-	S	S	S	S	93.2	86.3
			800	+	E1	7.3	396	S	S	S	S	96.4	99.3
			1600	+	E1	7.2	381	S	S	S	S	85.6	103.2

- : 測定せず * : 検査せずまたは検査できなかった。 S : 溶解

実験 3 は技術的誤りによる細胞損傷のために評価できなかったため表に含めなかった。

^a : +=完全に付着 (線維芽細胞様細胞)

^b : E1=評価可能な良質で十分な中期分裂細胞

^c : pH は処理終了時

^d : mOsm=milliosmolar

^e : 4 時間処理区は処理 3~4 時間後、18 時間処理区は 16~18 時間後に観察。

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
(資料 IM-16)

2-7. 代謝物 のマウス骨髓細胞を用いた小核試験

試験機関:

(GLP 対応)

報告書作成年:

検体純度:

供試動物: CrI:NMRI 系マウス (5~8 週齢、投与前日平均体重約 28.0 g)、1 群雄各 5 匹

方 法: 検体を DMSO に懸濁し 375、750 および 1500 mg/kg の投与量で単回強制経口投与した。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 (経口投与) およびビンクリスチン (VCR) 0.15 mg/kg (腹腔内投与) を単回投与した。

最終投与 24 時間後にすべての群の動物を、また投与 48 時間後に 1500 mg/kg 群および溶媒対照群の動物を屠殺して、各動物の両大腿骨骨髓を採取し、スライドグラス上にキシレンで固定後、エオジンおよびメチレンブルーで染色後、蒸留水で洗浄した。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。

全ての群で死亡および一般状態に異常は認められなかった。

小核を有する多染性赤血球の出現頻度は屠殺時期に係らず対照群と比較して統計学的に有意な増加を認めなかった。小核を有する正染性赤血球数も溶媒対照と差がなかった。

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。

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、本試験条件下において、検体は *in vivo* で骨髓多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断される。

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

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	10mL	5	10000	1.8	1.8	0.0	3865	0.5
	検体	375	5	10000	0.9	0.9	0.0	3692	0.5
		750	5	10000	1.4	1.4	0.0	4842	1.4
		1500	5	10000	1.3	1.3	0.0	4789	0.2
		CPP	20	5	10000	14.4↑	14.4↑	0.0	4090
	VCR	0.15	5	10000	60.5↑	41.3↑	19.2↑	5077	0.4
48 時間	DMSO	10mL	5	10000	0.8	0.8	0.0	3822	0.5
	検体	1500	5	10000	1.3	1.3	0.0	4530	0.2

CPP : シクロホスファミド

VCR : ビンクリスチン

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) ↑ : $p \leq 0.01$

3. 植物中代謝物

3-1. 代謝物 のラットを用いた急性経口毒性試験

(資料 IM-5)

試験機関 :

(GLP 対応)

報告書作成年 :

検体純度 :

供試動物 : CrI:WI (Han) Wistar 系ラット 1 群雌 6 匹

試験開始時週齢 : 約 10-11 週齢

試験開始時体重 : 176-187 g

試験期間 : 14 日間観察 ()

方法 : 毒性等級法

検体をオリーブオイルに懸濁し、容量 5 mL/kg で 1 回強制経口投与した。投与前に 16 時間絶食した。

まず、雌 3 匹を用いて、2000 mg/kg を投与した結果、死亡を認めなかったため、さらに、3 匹に同一用量を投与した。

観察および検査項目 : 中毒症状および生死を 1 試験期間中観察した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について、肉眼的病理検査を行った。

結 果 :

投与経路	経 口
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌 >2000
死亡開始時間および終了時間	死亡例なし
症状発現時間および消失時間	投与直後から発現 投与 4 日後に消失
死亡の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌 2000

中毒症状として、初回投与の 1/3 例で投与直後に流涎、投与直後～3 日後まで一般状態の抑制、呼吸困難および立毛が認められた。2 回目投与の 2/3 例で投与 3 時間後に下痢、別の 1/3 例で投与 2-3 日に一般状態の抑制、立毛、脱水症状および脱糞減少が見られ、また下痢を伴っていた。

剖検で、特記すべき変化は認められなかった。

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

Fluxapyroxad

3-2. 代謝物 のラットを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験

(資料 IM-17)

試験機関¹ :

(GLP 対応)

報告書作成年 :

検体純度 :

供試動物 : Wistar 系 CrI:WI (Han) ラット、1 群雌雄各 10 匹、開始時 42±1 日齢

投与期間 : 28 日間 ()

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、検体摂取量がそれぞれ 0、50、200 および 1000 mg/kg/day となるように濃度を調製した混餌を 28 日間にわたって随時摂食させた。第 1 週の混餌濃度は背景データの体重および摂餌量(体重; 雄 178.0g、雌 135.0g; 摂餌量; 雄 20.0g、雌 12.0g)に基づいて算出した。2 週以降は前週の体重および摂餌量に基づいて毎週調製した。1000mg/kg 群の雄は絶えず餌の掻きこぼしがあったため、対照群の摂餌量に基づいて算出した。対照群の動物には基礎飼料(粉餌)のみ給餌した。

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
流涙	眼瞼閉鎖	眼球突出	糞(外観/硬さ)	尿
				瞳孔径

検体の投与による一般状態の変化および死亡例は認められなかった。

体重変化; 投与期間中全動物の体重を毎週測定した。

対照群に比し有意差の認められた時期について次表に示す。

体重は 1000mg/kg 群の雌雄で投与 21 および 28 日に有意に抑制された。

体重増加量は、1000mg/kg 群の雄では投与期間中有意に抑制され、雌では投与 14 日から投与終了まで有意に抑制された。これらの体重および体重増加の抑制は摂餌量の減少に伴う二次的影響と考えられた。

検査項目	測定時期 (投与後)	性別・投与量 (mg/kg)					
		雄			雌		
		50	200	1000	100	300	1000
体重	21日			95↓			93↓
	28日			92↓			91↓
体重増加	7日			86↓			
	14日			88↓			77↓
	21日			84↓			70↓
	28日			78↓			63↓

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

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率 (%) を表したものの

摂餌量および食餌効率; ケージごとの摂餌量を毎週1回測定し、食餌効率も算出した。

1000mg/kg 群において、雄では投与期間中継続的に餌の掻きこぼしがあり、信頼できる摂餌量を記録できなかった。したがって、摂餌量を算出できなかった。雌の摂餌量は相当増加が認められたが、雄と同様に掻きこぼしがあり、実増加を反映しているとは考えられなかった。これは毒性に関連した所見というより忌避によるものであると考えられた。

飲水量: 飲水量の変化を毎日目視検査で観察した。

飲水量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以下の通りであった。

検体摂取量		投与量 (mg/kg)		
		50	200	1000
mg/kg/day	雄	47.1	189.3	算出不可能
	雌	51.4	208.2	(1477.8) ^a

^a: 参考値。掻きこぼしにより摂餌量が正確に測定できていないため、実際より高い値となっている可能性が考えられる。

機能観察総合検査 (FOB); 全動物を対象として、投与終了時に、以下の項目について FOB 検査を行った。

1) ホームケージ観察

姿勢 振戦 痙攣 異常行動 歩行異常 その他の異常

2) オープンフィールド (50 cm × 50 cm、高さ 25 cm) 観察

ケージから取り出し時の行動 被毛 皮膚 流涎 鼻漏
 流涙 眼/瞳孔径 姿勢 眼瞼閉鎖 呼吸 振戦 痙攣
 異常行動 歩行異常 活動/覚醒レベル 糞 (糞塊数/外観/硬さ/2分)
 尿 (量/色) /2分 立ち上がり回数/2分

3) 感覚運動検査／反射

接近反応 触覚反応 視覚(視覚性置き直し反応) 瞳孔反射 耳介反射
 聴覚(驚愕反応) 運動協調性(立ち直り反応) 取り扱い時の行動
 発声 痛覚反応(テイルピンチ) 前肢握力 後肢握力 着地開脚幅
 その他所見

ホームケージおよび オープンフィールド観察、感覚運動／反射検査において、検体投与に関連する変化は認められなかった。

自発運動量の測定；全動物を対象として、投与 27 日に自発運動量を 60 分間 (5 分 x 12 セッション) 測定した。

対照群に比し有意差の認められたセッションについて次表に示す。

検査項目	性別・投与量 (mg/kg)					
	雄			雌		
	50	200	1000	50	200	1000
セッション 9		20 ↓	26 ↓			

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

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率 (%) を示したもの

200 および 1000mg/kg 群の雄でセッション 9 の値のみ有意に減少していたが、総運動量に影響が認められないので、偶発的で投与関連性はないと考えられた。

血液学的検査；投与終了時に、少なくとも 16 時間絶食させた全動物を対象として、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次表に示す。

検査項目	性別・投与量 (mg/kg)						背景データ	
	雄			雌			雄	雌
	50	200	1000	50	200	1000		
Hb (mmol/L)		103 ↑ (9.3)	103 ↑ (9.3)				(8.7~9.5)	
MCV (fL)	103 ↑ (51.5)	104 ↑ (52.0)	103 ↑ (51.7)				(49.2~53.7)	
MCH (fmol)	104 ↑ (1.13)	105 ↑ (1.14)	104 ↑ (1.13)				(1.12~1.19)	
単球%		65 ↓	65 ↓					
単球数		58 ↓	50 ↓					
PTT (秒)						92 ↓ (32.6)		(31.0~35.5)

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

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率 (%) を示したもの

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

雄の投与群で表のように Hb、MCV および MCH の有意な増加、雌で PTT の短縮が認められたが、用量関連性がなく軽微な変化であり、背景データの範囲内にあることから、投与関連性はないと考えられた。また、200 および 1000mg/kg 群の雄で単球数および単球比率の有意な減少が認められたが、WBC および他の白血球分画にも変化が認められないので、偶発的で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グルタ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)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CREA)、グルコース (Glu)、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)、胆汁酸

統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

検査項目	性別・投与量 (mg/kg)						背景データ	
	雄			雌			雄	雌
	50	200	1000	50	200	1000		
Cl (mmol/L)						99 ↓ (101.0)		(100.5~104.6)
TG (mmol/L)						212 ↑ (0.70)		(0.29~0.84)
T. Bil (μmol/L)		83 ↓ (2.08)	79 ↓ (1.99)		70 ↓ (1.55)	67 ↓ (1.50)	(1.73~2.78)	
胆汁酸 (μmol/L)			33 ↓ (8)	69 ↓ (27)		38 ↓ (15)		(18~35)

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

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率 (%) を示したもの

100mg/kg 群の雌雄で胆汁酸の減少、200 および 1000 mg/kg 群雌で T. Bil の減少が認められた。雄の T. Bil の変化はいずれも背景データの範囲内にあり、偶発的と考えられた。50mg/kg 群雌の胆汁酸の減少は、用量相関性がなかった。1000mg/kg 群の雌の Cl の減少、TG の増加は背景データの範囲内にあり、偶発的で投与関連性はないと考えられた。

尿検査：血液学的検査と同時期に、各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次表に示す。

検査項目	性別・投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	0	50	200	1000	0	50	200	1000
尿量 (mL)	4.8	4.4	4.8	3.6↓				
比重 (g/L)	1053	1057	1051	1065↑				
尿沈渣/結晶 ≤2 =3	8 2	9 1	9 1	6 4	10 0	9 1	8 1	2↓ 8

↑: 結晶≤2: 多、=3: 甚

統計学的方法: Kruskal-Wallis+Wilcoxon 検定 (両側): 尿量、比重

Fisher 直接確立検定 (両側): 結晶 ↓: p≤0.05, ↑↓: p≤0.01

矢印のない数値は有意差なし

尿沈渣において、主にシュウ酸塩結晶の発生頻度が 1000mg/kg 群の雌で有意に高く、雄では有意差は無いが高い傾向にあった。個体別に見たとき、結晶の多い動物の pH は対照群より高い傾向にあった。

尿量および比重に用量依存性は認められないが、1000mg/kg 群の雄で尿量の減少および比重の増加が認められたが、尿の濃縮による比重の増加であり、悪影響とは考えられなかった。

眼科学的検査: 投与開始前に全動物を、投与 27 日に 1000mg/kg 群と対照群の全動物を検査した。

検体投与関連性の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を対象として、麻酔下で断頭によって屠殺、放血後、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 前立腺
 精囊(凝固腺を含む) 卵巣 子宮(頸部を含む) 脾臓 脳
 心臓 胸腺 甲状腺

次表に統計学的有意差の認められた項目を示す。

臓器	性別・投与量 (ppm)					
	雄			雌		
	50	200	1000	50	200	1000
最終体重	103	99	92↓	99	98	91↓
心臓 重量			91↓			
脳 対体重比			109↑			109↑
肝臓 重量			108↑			110↑
肝臓 対体重比			118↑			122↑
腎臓 対体重比			108↑			
副腎 対体重比			121↑			
胸腺 重量						80↓
精巣 対体重比			111↑			
卵巣 重量						78↓

Kruskal-Wallis H 検定および Wilcoxon 検定 (両側): ↓: p≤0.05 ↑↓: p≤0.01

表中の数字は変動の目安として群平均値の対照群に対する変動率(%)を表したものである。

1000mg/kg 群の雌雄とも軽度な肝臓重量の増加が認められた。

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

その他に表のように有意な臓器の重量あるいは対体重比の変動が認められたが、これらの変動は最終体重の低下に起因していると考えられた。さらに、病理組織学的に関連する所見も認められないため、投与関連性はないと考えられた。

肉眼的病理検査：試験終了時の全動物について、剖検を行った。

投与関連性のある所見は認められなかった。

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、対照群および 1000 mg/kg 群の雌雄については全組織を、50 および 200mg/kg 群は肝臓のみ、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。

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	肝臓	腎臓	脾臓	副腎	
膵臓	精巣	精巣上体	前立腺/精囊	卵巣	子宮	卵管腔		
唾液腺(下顎腺、舌下腺)		皮膚		雌の乳腺	食道	胃(前胃、腺胃)		
十二指腸	空腸(パイエル板を含む)			回腸	盲腸	結腸		
直腸	膀胱	リンパ節(腸間膜/腋窩)		骨髓(大腿骨)	坐骨神経			
脊髓(頸髄、胸髄、腰髄)				眼(視神経を含む)	肉眼的異常病変			

投与関連性の所見は肝臓にのみ認められ、1000mg/kg 群の雌雄で軽度の小葉中心性肝細胞肥大が認められた。甲状腺で軽度の瀰漫性濾胞細胞肥大が 1000mg/kg 群の雄 1/10 例に認められた。この所見は対照群でも時々認められ、また、本試験で甲状腺重量への影響も認められていないので、おそらく偶発的と考えられるが、肝細胞肥大と関連している可能性もあることから投与関連性を完全には否定できないと思われる。その他に認められた所見は投与群および/または対照群ともに認められ、偶発的で、この系統および齢のラットで通常認められる範囲内の所見であった。

病理組織学的所見(各群 10 例中の所見発生例数)

所見		性別・投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		0	50	200	1000	0	50	200	1000
肝臓	小葉中心性肝細胞肥大				8				4
甲状腺	瀰漫性濾胞細胞肥大				1				

以上、Wistar系ラットに本剤を28日間混餌経口投与した結果、各投与群で認められた毒性所見を次表に示す。

投与群 (mg/kg)	雄	雌
1000	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重/体重増加抑制 ・ 胆汁酸の減少 ・ 肝臓重量の増加 ・ 小葉中心性肝細胞肥大 ・ 甲状腺瀰漫性濾胞細胞肥大 	<ul style="list-style-type: none"> ・ T. Bil の減少
≤200	毒性所見なし	

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

1000mg/kg の雌雄で体重増加の抑制、胆汁酸の減少、肝臓重量の増加および小葉中心性肝細胞肥大が認められた。さらに、雌では T. Bil の減少が認められた。1000mg/kg 群の雄 1/10 例に認められた甲状腺の軽度瀰漫性濾胞細胞肥大はおそらく偶発的と考えられるが、肝細胞肥大と関連している可能性もあることから投与関連性を完全には無視できないと思われる。1000 mg/kg 群雌雄で認められた尿沈渣中の結晶の増加または増加傾向はおそらく尿中の pH の変化により誘発されたものと考えられるが、少なくとも尿生化学的パラメータや腎臓、膀胱などの病理組織学的変化が認められない事から、毒性学的意義のない変化であると考えられた。200 mg/kg 群雌で認められた T. Bil の減少については、1000 mg/kg 群とは異なり肝臓など関連する組織における器質学的変化を伴っておらず、毒性学的意義のない変化であると考えられた。

その他に投与関連性の影響は認められなかった。したがって、無毒性量は 200mg/ kg (実投与量；雄 189.3 mg/kg、雌 208.2mg/kg) であると判断する。

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

Fluxapyroxad

3-4. 代謝物 の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 IM-6)

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ネズミチフス菌 *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 法) およびプレインキュベーション法 (矢作、松島法) 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 等に基づく最高用量の 5000 μg /プレートとし、純度を考慮して 5500 μg /プレートとした。試験は \pm S9 mix 標準プレート法およびプレインキュベーション法とも濃度を 0、22、110、550、2750、5500 μg /プレートとし 3 反復で行った。

結果: TA1537 株では標準プレート法で 2750 μg /プレート以上、プレインキュベーション法では +S9 mix 5500 μg /プレートで his+ 変異体数の軽度減少が観察された。検体の沈殿はすべての濃度で認められなかった。

検体は標準プレート法およびプレインキュベーション法共に S9 mix 非存在下および存在下に係らず変異体数の増加を認めなかった。

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-amino-acridine chloride monohydrate)、4-NQO (4-nitroquinoline -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、検体は代謝活性化系の有無に係らず、復帰突然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)

濃度 μg /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 <i>uvrA</i>				TA1535				TA100			
対照 (DMSO)	-	52	31	40	41	11	14	13	13	100	88	98	95
検体	22	58	36	52	49	16	18	12	15	93	99	99	97
	110	48	44	38	43	12	16	15	14	101	108	97	102
	550	37	50	45	44	14	14	12	13	114	95	112	107
	2750	41	55	48	48	13	12	16	14	79	90	103	91
	5500	34	32	39	35	14	14	16	14	96	99	97	97
対照 (DMSO)	+	47	54	44	48	12	15	14	14	98	105	97	100
検体	22	42	42	50	45	11	11	14	12	102	90	102	98
	110	35	35	33	34	15	16	22	18	120	90	116	109
	550	51	46	48	48	11	9	12	11	113	96	114	108
	2750	41	42	47	43	14	11	12	12	116	128	113	119
	5500	39	46	41	42	16	15	10	14	118	99	108	108
陽性 対照 *	2-AA 2.5	+				120	150	182	151	609	629	531	623
	2-AA 60	+	167	202	268	212							
	MNNG 5	-				702	761	666	710	774	622	763	720
	AAC 100	-											
	NOPD 10	-											
	4-NQO 5.0	-	1113	1128	1037	1093							
濃度 μg /プレート	S9 Mix	フレームシフト型											
		TA1537				TA98							
対照 (DMSO)	-	12	11	7	10	24	30	26	27				
検体	22	8	12	9	10	36	29	28	31				
	110	8	6	8	7	25	38	20	28				
	550	8	10	9	9	17	22	18	19				
	2750	6	7	3	5	19	24	28	24				
	5500	5	2	3	3	23	25	24	24				
対照 (DMSO)	+	11	7	11	10	37	36	29	34				
検体	22	12	8	12	11	31	28	40	33				
	110	8	18	7	11	34	28	31	31				
	550	10	10	9	10	37	31	36	35				
	2750	9	5	6	7	30	34	33	32				
	5500	7	4	8	6	46	31	30	36				
陽性 対照 *	2-AA 2.5	+	207	198	133	179	881	890	926	899			
	2-AA 60	+											
	MNNG 5	-											
	AAC 100	-	331	353	372	353							
	NOPD 10	-					700	694	750	715			
	4-NQO 5.0	-											

* : 2-AA: 2-aminoanthracene NOPD: 4-nitro-o-phenylenediamine
 MNNG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
 AAC: 9-aminoacridine 4-NQO: 4-nitroquinoline-N-oxide

実験 2. プ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)

濃度 μg/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)	-	39	49	45	44	12	14	15	14	83	86	81	83	
検体	22	50	41	43	45	7	16	11	11	80	77	76	78	
	110	36	55	29	40	9	11	16	12	86	106	81	91	
	550	39	42	34	38	16	19	20	18	92	87	87	89	
	2750	41	43	39	41	16	12	14	14	84	86	79	83	
	5500	42	34	47	41	12	12	12	12	90	80	89	86	
対照 (DMSO)	+	23	38	31	31	16	18	15	16	81	84	82	82	
検体	22	28	26	38	31	22	23	24	23	76	79	78	78	
	110	28	44	34	35	25	29	28	27	76	79	78	78	
	550	33	24	38	32	25	24	23	24	91	87	98	92	
	2750	29	30	36	32	24	23	20	22	89	86	91	89	
	5500	36	39	35	37	20	19	21	20	98	95	97	97	
陽性 対照 *	2-AA 2.5	+				86	84	82	84	503	562	501	522	
	2-AA 60	+	156	159	153	156								
	MNNG 5	-					1551	1680	1441	1557	808	768	832	803
	AAC 100	-												
	NOPD 10	-												
	4-NQO 5.0	-	843	831	835	836								
濃度 μg/プレート	S9 Mix	フレームシフト型												
		TA1537				TA98								
対照 (DMSO)	-	6	8	7	7	19	23	21	21					
検体	22	5	7	7	6	14	16	15	15					
	110	7	10	8	8	20	22	21	21					
	550	11	5	5	7	28	22	25	25					
	2750	7	6	7	7	21	17	20	19					
	5500	8	5	8	7	27	23	22	24					
対照 (DMSO)	+	11	8	13	11	27	31	29	29					
検体	22	11	12	7	10	30	26	22	26					
	110	11	11	8	10	33	25	26	28					
	550	10	12	15	12	31	32	29	31					
	2750	9	10	11	10	36	30	31	32					
	5500	9	5	8	7	29	28	26	28					
陽性 対照 *	2-AA 2.5	+	71	82	75	76	496	577	564	546				
	2-AA 60	+												
	MNNG 5	-												
	AAC 100	-	236	245	234	238								
	NOPD 10	-					614	617	649	627				
	4-NQO 5.0	-												

* : 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

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

3-3. 代謝物 のウサギを用いた催奇形性試験

(資料 IM-18)

試験機関 :

(GLP 対応)

報告書作成年 :

検体純度 :

供試動物 : ニュージーランドホワイト種 [CrI : KBL (NZW)] 妊娠ウサギ 1 群 31-32 羽

妊娠 1 日時週齢 : 16-21 週齢

妊娠 1 日時体重 : 2732-4812 g

投与期間 : 23 日間 ()

投与方法 : 検体を Tween 80 添加 1%カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液に懸濁し、0、10、30 および 100 mg/kg/day の投与レベルで妊娠 6 日目^{*} から妊娠 28 日目までの 23 日間、毎日 1 回強制経口投与した。なお、対照群には、Tween 80 添加 1%CMC 水溶液のみを同様に投与した。

^{*} : 交配日を妊娠 0 日として起算した。

用量設定根拠 :

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、1、4、6、9、11、14、16、19、21、23、25、28 および 29 日に、摂餌量は妊娠 2 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、残りの胎児の頭部を含む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）：

（一般状態、死亡）：高用量群（100 mg/kg/day）において、流産および無排便などの検体投与に関連した臨床所見が認められた。妊娠ウサギにおいて、摂餌量および体重増加量の著しい低下が流産の原因となることが知られている。その他の胃のびらんや下痢などの母動物のストレスが、低栄養状態によって生じた母動物のホメオスタシスに対する悪影響をさらに増悪化させたと考えられる。したがって、高用量群における流産の増加は母動物毒性の一部であり、発生毒性ではないと考えられた。

流産は全投与群で認められたが、ウサギでは珍しくなく、用量相関性がないことから、10 および 30 mg/kg/day 群については投与に関連しないと考えられた。

（体重、摂餌量）：高用量群（100 mg/kg/day）では摂餌量の著しい減少を伴う体重増加量の低下が認められた。妊娠期間を通じた総体重増加量は対照群と比較して約 35%であり、補正体重増加量の減少の割合も対照群の約 2 倍であった。30 mg/kg/day 群では妊娠 4-6 日の体重増加量が統計学的に有意に高値であったが、投与開始前であり、生物学的にも意義がない変化であった。

（剖検所見）：表 1 に示す通り胃のびらん／潰瘍および水様便などの所見が認められた。1000 mg/kg 群の剖検所見は一般状態や摂餌量の変化と一致していたため投与関連性があると考えられた。

（妊娠子宮重量）：対照群と同等で、有意差は認められなかった。

以下、報告書に記載がないため申請者が追記した。

（着床所見）：100 mg/kg/day 群で後期吸収胚数の統計学的に有意な増加が認められたが、後期吸収胚率や総吸収胚数には統計学的有意差がないことから、生物学的に意義のない偶発的な変化と考えられた。

表 1. 母動物の成績

投与量 (mg/kg/day)	対照 (0)	10	30	100	
1 群当り雌動物数	32	31	31	31	
妊娠動物数 (妊娠率%)	29 (91)	28 (90)	30 (97)	28 (90)	
途中死亡動物数	2	1	0	1	
流産動物数	1	3	1	5	
一般状態: 無排便	1	1	0	6	
平均体重	群間で有意差なし				
体重増加量 (g)	妊娠 4-6 日	32.4	20.6	75.1↑	55.5
	妊娠 11-14 日	101.4	92.3	81.5	56.3↓
	妊娠 14-16 日	46.9	54.7	46.1	-17.0↓
	妊娠 16-19 日	67.0	23.2	46.1	2.1↓
	妊娠 6-28 日	352.2	408.3	342.9	227.5↓
摂餌量 (g/animal/day)	妊娠 14-15 日	156.5	151.4	146.0	106.4↓
	妊娠 15-16 日	150.2	143.9	139.9	85.1↓
	妊娠 16-17 日	152.5	133.8	145.3	84.5↓
	妊娠 17-18 日	153.4	144.5	145.1	83.0↓
	妊娠 18-19 日	155.1	142.3	150.2	93.5↓
	妊娠 19-20 日	157.4	144.9	147.8	94.4↓
	妊娠 20-21 日	150.5	145.6	153.3	111.4↓
着床所見	検査母動物数	26	24	29	22
	黄体数	10.8	11.0	11.8	11.4
	着床数	9.5	9.5	10.8	10.2
	着床前損失率 (%)	11.2	13.5	9.0	10.3
	着床後損失率 (%)	6.4	6.5	11.0	10.7
	総吸収胚数 (率)	0.6 (6.4)	0.7 (6.5)	1.0 (11.0)	1.2 (10.7)
	早期吸収胚数 (率)	0.4 (4.0)	0.4 (3.5)	0.6 (7.1)	0.4 (3.5)
	後期吸収胚数 (率)	0.2 (2.4)	0.3 (3.0)	0.4 (3.8)	0.8↑ (7.2)
	死亡胎児数	0	0	0	0
	全胚吸収母動物数	0	0	0	0
妊娠子宮重量 (g)	491.9	500.0	525.9	473.4	
カーカス重量 (g)	3648.8	3733.5	3643.2	3496.6	
補正 (正味) 体重増加量 (g)	-101.1	-67.6	-145.5	-198.0	
肉眼的病理所見:	胃のびらん	0	1	0	2
	水様性便	0	2	0	4

体重増加量および摂餌量は生存妊娠動物のみの平均値。

着床前損失率 (%) = (黄体数 - 着床数) / 黄体数 × 100

着床後損失率 (%) = (着床数 - 生存胎児数) / 着床数 × 100

カーカス重量 = 最終体重 - 妊娠子宮重量

補正 (正味) 体重増加量 = 最終体重 - (妊娠子宮重量 + 妊娠 6 日体重)

統計学的方法

Dunnett 検定 (両側): 体重、体重増加量、摂餌量、妊娠子宮重量、カーカス重量、補正体重増加量、黄体数、着床数、着床前損失率、着床後損失率、吸収胚数、吸収胚率

Fisher の直接確率検定: 死亡率、妊娠率

↑ ↓: p ≤ 0.05、↑ ↓: p ≤ 0.01

胎児動物 (表 2) ;

(胎児数、性比、胎児体重、胎盤重量) ; いずれの投与群においても検体投与の影響は認められなかった。

(胎児の異常) ; 腹あたりの外表奇形発現胎児率が高用量群で背景対照データの範囲をわずかに上回ったが、個々の所見はいずれも背景データの範囲内であり同系統のウサギで一般的に認められるもので、用量との相関も認められないことから、投与に関連しないと考えられた。

腹あたりの内臓奇形発現胎児率が高用量群で背景対照データの範囲をわずかに上回ったが、個々の所見はいずれも背景データの範囲内であり用量相関性も認められないことから、投与に関連しないと考えられた。

腹あたりの骨格奇形発現胎児率が高用量群で統計学的に有意に増加したが、背景対照データの範囲内であったことから、偶発的で投与に関連しない変化と考えられた。

骨格変異のうち頭蓋骨分離と距骨不完全骨化の発現率については、統計学的に有意に増加し、背景対照データの範囲外であった。これらの所見は可逆性がある、または基本構造に大きく影響しない骨化の遅延または軽微な骨化の乱れであると考えられ、用量との相関もなく、妊娠 29 日のウサギ胎児には比較的よく認められる所見であることから、毒性学的に意義がないものと考えられる。

背景データとの比較

項目	対照 (0)	10	30	100	背景対照 平均% (範囲)
外表奇形発現胎児率/腹	0.0	0.0	0.7	1.8↑	1.0 (0.0-1.4)
内臓奇形発現胎児率/腹	0.3	1.3	1.6	2.7↑	1.2 (0.5-2.4)
鎖骨下動静脈欠損 胎児率/腹	0.0	0.0	1.6↑	0.5	0.1 (0.0-0.6)
骨格奇形発現胎児率/腹	1.4	3.4	1.4	4.5↑	2.7 (1.1-4.6)
頭蓋骨分離 腹数 (%)	0	4↑ (17)	3 (10)	1 (4.5)	1.9 (0.0-5.0)
胎児率/腹	0.0	1.8↑	1.9↑	0.6	0.2 (0.0-0.4)
距骨不完全骨化 腹数 (%)	0	4↑ (17)	3 (10)	3 (14)	16 (0.0-45.0)
胎児率/腹	0.0	2.1↑	1.5↑	1.8↑	2.5 (0.0-7.4)

Fisher の直接確率検定 (片側) : 異常胎児を有する腹数

Wilcoxon 検定 (片側) : 腹あたりの異常胎児率

↑ : $p \leq 0.05$

以上より、本剤を妊娠ウサギに投与した場合、100 mg/kg/day では臨床および剖検所見、摂餌量および体重増加量の低下、ならびにそれに関連する流産の増加が認められたことから、母動物における無毒性量は 30 mg/kg/day であった。毒性学的に意義のある胎児所見は認められなかったことから、胎児における無毒性量は 100 mg/kg/day であった。また、催奇形性は最高投与量の 100 mg/kg でも認められなかった。

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

Fluxapyroxad

表 2. 胎児の成績

投与量 (mg/kg/day)		対照 (0)	10	30	100
生存胎児を有する腹数		26	24	29	22
平均生存胎児数	雌雄合計	8.9	8.8	9.7	9.0
	雄	4.6	4.0	5.0	4.7
	雌	4.3	4.8	4.8	4.3
性比 (雄%)		51.3	45.0	51.1	52.0
体重 (g)	全生存胎児	37.0	38.5	37.2	34.9
	雄	37.4	38.3	37.4	35.6
	雌	36.3	37.9	37.2	34.3
胎盤重量 (g)	全生存胎児	5.0	5.3	5.1	4.6
	雄	5.2	5.3	5.1	4.7
	雌	4.8	5.2	5.1	4.5
外表異常	検査胎児 (腹) 数	232 (26)	211 (24)	282 (29)	198 (22)
	奇形胎児総数 (腹数)			1 (1)	3 (3)
	腹あたり平均発生率 (%)			0.7	1.8↑
	腹壁破裂			1 (1)	1 (1)
	回転異常四肢				2 (2)
	変異胎児総数 (腹数) 児%		1 (1)	1 (1)	1 (1)
	足の過屈曲		0.6	0.6	0.6
内臓異常	検査胎児 (腹) 数	232 (26)	211 (24)	282 (29)	198 (22)
	奇形胎児総数 (腹数)	1 (1)	3 (3)	3 (3)	5 (4)
	腹あたり平均発生率 (%)	0.3	1.3	1.6	2.7↑
	鎖骨下動脈欠損			3 (3)	1 (1)
	腹あたり平均発生率 (%)			1.6↑	0.5
	頸動脈欠損				2 (1)
	心/大血管の多発奇形		1 (1)		
	小心		1 (1)		
	小肺	1 (1)			
	横隔膜ヘルニア	1 (1)		1 (1)	1 (1)
	腎の位置異常		1 (1)		1 (1)
	尿管短				1 (1)
	尿管癒合		1 (1)		
	変異胎児総数 (腹数)	5 (4)	3 (3)	8 (6)	8 (5)
	腹あたり平均発生率 (%)	2.2	1.4	3.4	3.7
脳の囊状拡張			1 (1)		
頸動脈洞枝の位置異常	3 (2)	1 (1)	1 (1)	5 (3)	
肺葉欠損	2 (2)	2 (2)	6 (5)	3 (2)	

各胎児所見の表中の数値は所見がみられた胎児数 (腹数) を示す。空欄は発生なし。

統計学的方法

Dunnnett 検定 (両側) : 生存胎児数、胎児体重、胎盤重量

Fisher の直接確率検定 (片側) : 異常胎児を有する腹数

Wilcoxon 検定 (片側) : 腹あたりの異常胎児率

↑ ↓ : $p \leq 0.05$

表 2. 胎児の成績 (つづき)

投与量 (mg/kg/day)		対照 (0)	10	30	100
骨 格 異 常	検査胎児 (腹) 数	232 (26)	211 (24)	282 (29)	198 (22)
	奇形胎児総数 (腹数)	4 (3)	7 (7)	3 (3)	9 (7)
	腹あたり平均発生率 (%)	1.4	3.4	1.4	4.5↑
	頭頂間骨変形	2 (2)	2 (2)	1 (1)	5 (4)
	頭頂間骨小		1 (1)		
	頭頂間骨分離		1 (1)		
	口蓋骨変形		1 (1)		
	切歯骨小	1 (1)			
	椎骨/肋骨の重度形成異常	1 (1)	1 (1)	1 (1)	2 (1)
	胸骨裂 (軟骨分離)			1 (1)	1 (1)
	胸骨重度形成異常		1 (1)		
	肋骨分岐				1 (1)
	変異胎児総数 (腹数)	228 (26)	203 (24)	280 (29)	190 (22)
	腹あたり平均発生率 (%)	98.4	95.4	99.0	96.0
	頭蓋骨分離		4 (4↑)	3 (3)	1 (1)
	腹あたり平均発生率 (%)		1.8↑	1.9↑	0.6
距骨不完全骨化		5 (4↑)	5 (3)	3 (3)	
腹あたり平均発生率 (%)		2.1↑	1.5↑	1.8↑	

各胎児所見の表中の数値は所見がみられた胎児数 (腹数) を示す。空欄は発生なし。

統計学的方法

Fisher の直接確率検定 (片側) : 異常胎児を有する腹数

Wilcoxon 検定 (片側) : 腹あたりの異常胎児率

↑ ↓ : $p \leq 0.05$

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

3-5. 代謝物 のチャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた遺伝子突然変異試験 (HPRT 試験)

(資料 IM-19)

試験機関:

(GLP 対応)

報告書作成年:

検体純度:

試験方法: チャイニーズハムスター卵巣細胞由来の培養細胞 (CHO-K3 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 実験を各 2 反復で行なった。評価は濃度-反応性をみるために複数濃度について行った。※CHO-K1 細胞を継代して得た細胞を便宜的に CHO-K3 細胞としたため、両者は同一とみなせる。

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:

この結果から最高濃度として 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ をまず選定し、以下の実験を 2 反復で行った。なお、太字の濃度について評価した。

実験 1 (-S9 mix で 4 時間処理) : 0, 62.5, 125, 250, 375, 500, 750, 1000, 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
(+S9 mix で 4 時間処理) : 0, 62.5, 125, 250, 375, 500, 750, 1000, 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

実験 2 (-S9 mix で 24 時間処理) : 0, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 375, 500, 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$
(+S9 mix で 4 時間処理) : 0, 125, 250, 375, 500, 750, 1000, 1250, 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$, S9 mix の存在下では 3-メチルコラントレン (MCA) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$] および陰性 (溶媒) 対照も同様に試験した。

細胞ストックを播種し ($3\sim 5 \times 10^5$ 個/フラスコ)、HAT 培地で 3~4 日間培養し、自然 HPRT 欠損突然変異体を除いた。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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 6~7 日後、コロニーを固定・染色して計測した。

検体処理後の細胞毒性 (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 時間の附着時間経過後、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。

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

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 および浸透圧の変化について S9 mix の非存在下および存在下の処理群の 2 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。

試験結果：細胞毒性および突然変異頻度を表 1~2、培養細胞の状態および培養条件について表 3 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 ($0.00 \sim 6.17/10^6$ 細胞) は溶媒対照 ($1.07 \sim 3.14/10^6$ 細胞) に近い値であり、背景溶媒対照データ (-S9 mix: $0.00 \sim 15.95/10^6$ 細胞、+S9 mix : $0.00 \sim 12.62/10^6$ 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。

対照群を 100%とした場合に 20%を切る CE1 の著しい低下から、少なくとも最高用量群において実験 1、2 ともに明確な細胞毒性が示された。

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、試験終了時の培地中に検体の沈殿は認められなかった。

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. 試験結果-実験 1 (±S9 mix で 4 時間処理)

濃度 (μg/mL) (処理時間)	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 ^a	
溶媒対照 1% DMSO	-	3.12	83.2	100.0	102.1	100.0	1.12	1.07	
検体 (4 時間)	62.5	-	4.72	75.7	91.0	86.7	84.9	0.84	0.94
	125	-	5.35	74.9	90.0	90.3	88.4	0.28	0.33
	250	-	5.31	73.5	88.3	92.0	90.1	1.11	1.21
	375	-	5.00	61.3	73.7	93.1	91.2	0.84	0.94
	500	-	5.32	16.5	19.8	92.4	90.5	1.11	1.28
	750	-	3.84	0.0	0.0	-	-	-	-
	1000	-	0.46	0.0	0.0	-	-	-	-
1500	-	0.35	0.0	0.0	-	-	-	-	
陽性対照 EMS 300	-	5.02	72.3	86.9	74.1	72.6	81.67	110.16	
溶媒対照 1% DMSO	+	4.25	83.0	100.0	101.7	100.0	2.78	2.74	
検体 (4 時間)	62.5	+	5.17	80.9	97.5	(-)	(-)	(-)	(-)
	125	+	5.20	81.8	98.6	(-)	(-)	(-)	(-)
	250	+	5.50	84.4	101.7	96.9	95.3	1.67	1.73
	375	+	6.18	81.9	98.7	97.7	96.1	1.95	2.00
	500	+	6.17	83.3	100.4	97.6	96.0	0.84	0.84
	750	+	6.07	83.0	100.0	90.6	89.1	1.12	1.23
	1000	+	5.83	79.1	95.3	91.9	90.4	0.56	0.56
1500	+	0.46	0.0	0.0	-	-	-	-	
陽性対照 MCA 10.0	+	5.95	81.9	98.7	81.7	80.3	81.39	99.99	

^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。

-: 細胞毒性が強く培養を継続しなかった。

(-): 最低 4 濃度の評価がガイドラインで要求されているので評価しなかった。

DMSO: ジメチルスルホキシド

EMS: エチルメタンスルホネート

MCA: 3-メチルコラントレン

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 ($\mu\text{g/mL}$)	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 突然変異頻度 (10^6 個当り)		
			コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		補正前	補正後 ^a	
			絶対値	相対値	絶対値	相対値			
溶媒対照 1% DMSO	-	5.46	92.2	100.0	90.7	100.0	1.67	1.92	
検体 (24 時間)	15.6	-	5.62	79.8	86.6	(-)	(-)	(-)	(-)
	31.3	-	5.18	85.9	93.2	(-)	(-)	(-)	(-)
	62.5	-	4.80	84.8	92.0	(-)	(-)	(-)	(-)
	125	-	5.58	87.6	95.0	88.7	97.8	2.50	3.01
	250	-	5.39	81.8	88.7	84.3	92.9	0.00	0.00
	375	-	5.54	71.4	77.4	88.1	97.1	1.12	1.25
	500	-	3.97	73.2	79.4	86.3	95.1	1.67	1.94
750	-	2.06	19.9	21.6	86.6	95.5	2.50	2.79	
陽性対照 EMS 300	-	6.54	59.7	64.8	76.2	84.0	220.28	289.42	
溶媒対照 1% DMSO	+	5.10	92.2	100.0	97.9	100.0	3.06	3.14	
検体 (4 時間)	125	+	5.90	101.8	110.4	(-)	(-)	(-)	(-)
	250	+	5.13	105.0	113.9	(-)	(-)	(-)	(-)
	375	+	5.65	88.5	96.0	96.3	98.4	3.62	3.56
	500	+	6.12	99.9	108.4	88.8	90.7	5.28	6.17
	750	+	5.49	99.8	108.2	87.9	89.8	1.67	2.01
	1000	+	5.62	100.2	108.7	90.3	92.2	0.56	0.62
	1250	+	3.45	66.2	71.8	90.7	92.6	5.00	5.53
1500	+	0.43	1.1	1.2	-	-	-	-	
陽性対照 MCA 10.0	+	1.43	78.8	85.5	89.0	90.9	80.84	91.02	

^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

-: 細胞毒性が強く培養を継続しなかった。

(-): 最低 4 濃度の評価がガイドラインで要求されているので評価しなかった。

DMSO: ジメチルスルホキシド EMS: エチルメタンサルホネート MCA: 3-メチルコラントレン

表 3 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/スライ ドへの 付着 ^a	pH	浸透圧 mOsm ^b	溶解性/観察 ^c				
					溶媒		培地		
					肉眼	添加時 肉眼	処理終了時 肉眼	顕鏡	
溶媒対照 1% DMSO	-	+	7.4	394					
検体 (4時間)	62.5	-	+			S	S	S	S
	125	-	+			S	S	S	S
	250	-	+			S	S	S	S
	375	-	+			S	S	S	S
	500	-	+			S	S	S	S
	750	-	++			S	S	S	S
	1000	-	+++	7.3	380	S	S	S	S
1500	-	+++	7.3	365	S	S	S	S	
溶媒対照 1% DMSO	+	+	7.1	353					
検体 (4時間)	62.5	+	+			S	S	S	S
	125	+	+			S	S	S	S
	250	+	+			S	S	S	S
	375	+	+			S	S	S	S
	500	+	++			S	S	S	S
	750	+	+++			S	S	S	S
	1000	+	+++	7.1	346	S	S	S	S
1500	+	++++	7.1	334	S	S	S	S	
溶媒対照 1% DMSO	-	+	7.7	391					
検体 (24時間)	15.6	-	+			S	S	S	S
	31.3	-	+			S	S	S	S
	62.5	-	+			S	S	S	S
	125	-	+			S	S	S	S
	250	-	+			S	S	S	S
	375	-	+			S	S	S	S
	500	-	++	7.4	399	S	S	S	S
750	-	+++	7.4	393	S	S	S	S	
溶媒対照 1% DMSO	+	+	7.3	378					
検体 (4時間)	125	+	+			S	S	S	S
	250	+	+			S	S	S	S
	375	+	+			S	S	S	S
	500	+	+			S	S	S	S
	750	+	++			S	S	S	S
	1000	+	+++			S	S	S	S
	125	+	+++	7.1	370	S	S	S	S
	1500	+	++++	7.1	366	S	S	S	S

空欄：測定せず

^a: +=完全に付着 (線維芽細胞様細胞)

+++ = 付着減少 (大部分の細胞が円形)

^b: mOsm=milliosmolar

^c: S=溶解

++ = 付着軽度減少 (少数の円形細胞)

++++ = 完全に剥離、全ての細胞が円形

3-6. 代謝物 F048 のチャイニーズハムスター-V79 細胞を用いた *in vitro* 染色体異常誘発性試験

(資料 IM-20)

試験機関:

(GLP 対応)

報告書作成年:

検体純度:

試験方法: チャイニーズハムスター-V79 細胞を用いて、代謝活性化系の存在下 (+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。

用量設定根拠:

この結果から最高濃度として 1500

$\mu\text{g/mL}$ をまず選定し、以下の実験を 2 反復で行った。

10%牛胎児血清含有培地で培養し、調製した単細胞懸濁液 ($3\sim 8 \times 10^4$ 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 $1 \mu\text{g/mL}$ を処理した。

詳細な実験条件および細胞の処理濃度 ($\mu\text{g/mL}$) 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 (4 時間処理、処理 14 時間後標本作成):

0、62.5、125、250、**375**、**500**、**750**、1000、1500 $\mu\text{g/mL}$

+S9 mix (4 時間処理、処理 14 時間後標本作成):

0、62.5、125、250、375、**500**、**750**、**1000**、1500 $\mu\text{g/mL}$

実験 2 -S9 mix (18 時間処理、処理直後染色体標本作製):

0、62.5、**125**、**250**、**375**、500、750、1000、1500 $\mu\text{g/mL}$

-S9 mix (18 時間処理、さらに、10 時間培養後染色体標本作製):

0、250、375、**500**、750、1000、1500 $\mu\text{g/mL}$

+S9 mix (4 時間処理、処理 24 時間後染色体標本作製):

0、62.5、125、250、375、**500**、**750**、**1000**、1500 $\mu\text{g/mL}$

実験 2 の+S9 mix で構造的染色体異常の有意な増加が認められたので、実験 3 を行い再現性を確認した。

実験 3 +S9 mix (4 時間処理、処理 24 時間後染色体標本作製) :

0、400、600、800、1000、1200、1400 $\mu\text{g/mL}$

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 $\mu\text{g/mL}$ を、+S9 mix ではシクロホスファミド (CPP) 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 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濃度合計 200 個、陽性対照群では各濃度合計 100 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 および浸透圧の変化について、 \pm S9 mix の非存在下および存在下の処理群の 2 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。

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。

実験 1 では、 \pm S9 mix (4 時間処理、処理 14 時間後染色体標本作製) において、構造的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 では、-S9 mix (18 時間処理、処理直後および 10 時間後染色体標本作製) において、構造的染色体異常出現頻度の有意な増加は認められなかった。+S9 mix (4 時間処理、処理 24 時間後染色体標本作製) で、ギャップを含む、および含まない構造的染色体異常出現頻度の有意な増加が認められた。そこで、実験 3 を行い、再現性について確認した結果、用量関連性のある有意な増加が認められた。統計学的有意差が認められた用量は、後述する通り細胞毒性の認められた用量であった。

いずれの実験とも数異常出現頻度の有意な増加は認められなかった。

実験 1 では、細胞の付着は \pm S9 mix で 4 時間処理、処理 14 時間後標本作成とも構造的染色体異常について評価した最高濃度 (-S9 mix: 750 $\mu\text{g/mL}$ 、+S9 mix: 1000 $\mu\text{g/mL}$) で細胞付着に影響が認められた。評価した濃度以上の濃度では細胞分裂の明確な抑制 (分裂頻度 21.9% および 15.2%) が認められた。

実験 2 では、-S9 mix の 18 時間処理、処理直後染色体標本作製で 500 $\mu\text{g/mL}$ 以上で細胞付着に影響が認められ、細胞数は対照群に比し 49.6% で、細胞分裂の抑制 (45.8%) が認められた。-S9 mix の 18 時間処理、さらに 10 時間培養後染色体標本作製で、染色体異常について評価した 500

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

$\mu\text{g/mL}$ で細胞付着に影響が認められ、細胞数は対照群に比し 48.6%で、細胞分裂の抑制(55.6%)が認められた。

+S9 mix の 4 時間処理、さらに処理 24 時間後染色体標本作製(実験 2 および 3)では、実験 2 の $750 \mu\text{g/mL}$ 以上で細胞付着に影響が認められ、 $1000 \mu\text{g/mL}$ では細胞数は対照群に比し 54.4%であった。実験 3 の $1000 \mu\text{g/mL}$ 以上で細胞付着に影響が認められ、 $1200 \mu\text{g/mL}$ では細胞数は対照群に比し 43.3%であった。

pH6 浸透圧に対する検体処理の影響は認められなかった。処理終了時の培地中における検体の沈澱が実験 2 における $1500 \mu\text{g/mL}$ の 18 時間処理でのみ認められた。

したがって、本実験条件下で、検体は代謝活性化系の存在下で、*in vitro* で V79 細胞に対して染色体異常誘発を有すると判断された。

陽性対照物質である EMS および CPP 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*					数的染色体異常				
					G を含む	G を含まない				異数性	倍数性	核内倍数性	細胞数	分裂頻度
						合計	Ex	mA	Dis					
実験 1 (4/14 時間)	無	DMSO	1%	200	3.5	2.0	1.0				1.5		100.0	100.0
		検体	375	200	5.5	2.0	1.0						74.9	76.4
			500	200	4.0	3.0	1.5						56.4	90.4
			750	200	7.5	4.0	2.0				1.0		28.5	77.0
		EMS	500	100	18.0 \uparrow	16.0 \uparrow	9.0 \uparrow						-	92.1
	有	DMSO	1%	200	3.5	2.0	1.0				1.0	3.3	100.0	100.0
		検体	500	200	3.0	1.5					1.5		94.0	66.6
			750	200	2.5	2.0							69.0	62.3
			1000	200	4.5	2.0	1.0						14.6	58.9
		CPP	0.5	100	24.0 \uparrow	22.0 \uparrow	11.0 \uparrow	1.0					-	45.0
実験 2 (18/0 時間)	無	DMSO	1%	200	4.0	2.0	0.5						100.0	100.0
		検体	125	200	3.5	2.5	2.0						92.9	102.1
			250	200	2.0	2.0	1.0						81.4	91.7
			375	200	1.5	1.0	0.5						72.5	113.2
		EMS	500	100	21.0 \uparrow	20.0 \uparrow	14.0 \uparrow						-	121.5
実験 2 (18/10 時間)	無	DMSO	1%	200	6.5	3.5	1.5						100.0	100.0
		検体	500	200	2.5	1.5	1.0				0.5		48.6	55.6
		EMS	500	100	23.0 \uparrow	23.0 \uparrow	18.0 \uparrow						-	80.8
実験 2 (4/24 時間)	有	DMSO	1%	200	6.5	4.0	2.0						100.0	100.0
		検体	500	200	4.0	2.0	1.5						64.7	120.6
			750	200	2.5	2.0	1.0						81.1	133.9
			1000	100	23.0 \uparrow	22.0 \uparrow	5.0				1.0		54.4	82.1
		CPP	0.5	100	19.0 \uparrow	19.0 \uparrow	11.0 \uparrow						-	185.8
実験 3 (4/24 時間)	有	DMSO	1%	200	8.0	3.5	1.5						100.0	100.0
		検体	800	200	5.5	3.5	0.5						101.8	68.7
			1000	200	11.5	9.5 \uparrow	3.0					1.0	71.0	58.0
			1200	100	19.0 \uparrow	16.0 \uparrow	7.0					2.0	43.3	72.3
		CPP	0.5	100	26.0 \uparrow	25.0 \uparrow	14.0 \uparrow	1.0					-	92.2

DMSO : ジメチルスルホキシド EMS : エチルメタンスルホネート

CPP : シクロホスファミド - : 測定せず

(空白) : 0.0

* 構造的染色体異常: G = キ・ャツ、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 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞形態/スライドへの付着 ^a	スライドの評価 ^b	pH ^c	浸透圧 mOsm ^d	溶解性/観察				細胞毒性 (%)	
								溶媒 肉眼	培地			細胞数	分裂頻度
									添加時 肉眼	処理終了時 ^e 肉眼	顕鏡		
実験 1 (4/14 時間)	無	DMSO	1%	+	E1	7.8	409	-	-	-	-	100.0	100.0
		検体	62.5	+	E1	-	-	S	S	S	S	86.5	-
			125	+	E1	-	-	S	S	S	S	92.3	-
			250	+	E1	-	-	S	S	S	S	82.6	-
			375	+	E1	-	-	S	S	S	S	74.9	76.4
			500	+	E1	-	-	S	S	S	S	56.4	90.4
			750	+++	E1	-	-	S	S	S	S	28.5	77.0
			1000	+++	E2	7.8	396	S	S	S	S	1.9	21.9
			1500	++++	N1	7.9	391	S	S	S	S	0.8	*
		EMS	500	+	-	-	-	-	-	-	-	*	92.1
	有	DMSO	1%	+	E1	7.8	392	-	-	-	-	100.0	100.0
		検体	62.5	+	E1	-	-	S	S	S	S	99.7	-
			125	+	E1	-	-	S	S	S	S	101.3	-
			250	+	E1	-	-	S	S	S	S	103.8	-
			375	+	E1	-	-	S	S	S	S	98.5	-
			500	+	E1	-	-	S	S	S	S	94.0	66.6
			750	+	E2	-	-	S	S	S	S	69.0	62.3
			1000	+++	E3	7.8	360	S	S	S	S	14.6	58.9
			1500	+++	N1	7.8	356	S	S	S	S	6.0	15.2
		CPP	0.5	+	E1	-	-	-	-	-	-	*	45.0

-: 測定せず

*: 検査せずまたは検査できなかった。

S: 溶解

^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 =評価可能中期分裂細胞数減少、一部は質不良

N1 =分裂細胞がない、あるいはわずかであり評価が不可能

N2 =分裂細胞がない、あるいはわずかであり一部は質が悪く評価が不可能

^c: pH は処理終了時

^d: mOsm=milliosmolar

^e: 4 時間処理区は処理 3~4 時間後に観察

表 2(続き) 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/ スライドへの 付着 ^a	スライドの 評価 ^b	pH ^c	浸透圧 mOsm ^d	溶解性/観察				細胞毒性(%)	
								溶媒 肉眼	培地			細胞 数	分裂 頻度
									添加 時 ^e 肉眼	処理終了 時 ^e 肉眼	顕鏡		
実験 2 (18/0時間)	無	DMSO	1%	+	E1	7.7	453	-	-	-	-	100.0	100.0
		検体	62.5	+	E1	-	-	S	S	S	S	98.2	-
			125	+	E1	-	-	S	S	S	S	92.9	102.1
			250	+	E1	-	-	S	S	S	S	81.4	91.7
			375	+	E3	-	-	S	S	S	S	72.5	113.2
			500	+++	N2	-	-	S	S	S	S	49.6	45.8
			750	++++	N1	-	-	S	S	S	S	4.1	*
			1000	++++	N1	7.8	406	S	S	S	S	1.5	*
		1500	++++	N1	7.8	411	S	P	P	P	5.3	*	
EMS	500	+	E1	-	-	-	-	-	-	*	121.5		
実験 2 (18/10時間)	無	DMSO	1%	+	E1	7.7	403	-	-	-	-	100.0	100.0
		検体	250	+	E1	-	-	S	S	S	S	95.6	-
			375	+	E1	-	-	S	S	S	S	50.6	-
			500	++	E3	-	-	S	S	S	S	48.6	55.6
			750	++++	N2	-	-	S	S	S	S	1.0	*
			1000	++++	N2	7.8	411	S	S	S	S	2.9	*
		1500	++++	N2	7.8	388	S	P	S	P	4.7	*	
EMS	500	+	E1	-	-	-	-	-	-	*	80.8		
実験 2 (4/24時間)	有	DMSO	1%	+	E1	7.8	412	-	-	-	-	100.0	100.0
		検体	62.5	+	E1	-	-	S	S	S	S	87.6	-
			125	+	E1	-	-	S	S	S	S	89.1	-
			250	+	E1	-	-	S	S	S	S	101.7	-
			375	+	E1	-	-	S	S	S	S	64.0	-
			500	+	E1	-	-	S	S	S	S	64.7	120.6
			750	++	E1	-	-	S	S	S	S	81.1	133.9
			1000	++	E2	7.8	377	S	S	S	S	54.4	82.1
		1500	+++	N1	7.8	360	S	P	S	S	4.1	*	
CPP	0.5	+	E1	-	-	-	-	-	-	*	185.8		
実験 3 (4/24時間)	有	DMSO	1%	+	E1	7.7	332	-	-	-	-	100.0	100.0
		検体	400	+	E1	-	-	S	S	S	S	125.5	-
			600	+	E1	-	-	S	S	S	S	128.0	-
			800	++	E1	-	-	S	S	S	S	101.8	68.7
			1000	++	E3	-	-	S	S	S	S	71.0	58.0
			1200	+++	E3	7.7	302	S	S	S	S	43.3	72.3
		1400	+++	N1	7.6	326	S	S	S	S	13.0	2.6	
CPP	0.5	+	E1	-	-	-	-	-	-	*	92.2		

-: 測定せず * : 検査せずまたは検査できなかった。 S: 溶解 P: 沈殿

^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=評価可能中期分裂細胞数減少、一部は質不良

N1=分裂細胞がない、あるいはわずかであり評価が不可能

N2=分裂細胞がない、あるいはわずかであり一部は質が悪く評価が不可能

^c: pHは処理終了時

^d: mOsm=milliosmolar

^e: 4時間処理区は処理3~4時間後、18時間処理区は16~18時間後に観察

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

3-7. 代謝物 のマウスにおける小核試験

(資料 IM-21)

試験機関:

(GLP 対応)

報告書作成年:

検体純度:

供試動物: CrI:NMRI 系マウス (5~8 週齢、試験開始時平均体重 30.7g)、1 群雄各 5 匹

方 法: 検体を DMSO に溶解後、コーンオイルに懸濁 (混合比率 2 : 3) し、純度で補正し 500、1000 および 2000 mg/kg (実投与量 520、1046 および 2080 mg/kg) の投与量で単回強制経口投与した。陰性対照として DMSO/コーンオイルの混液 (2 : 3) 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 (経口投与) およびビンクリスチン (VCR) 0.15 mg/kg (腹腔内投与) を単回投与した。

最終投与 24 時間後にすべての群の動物を、投与 48 時間後に 2000 mg/kg 群および溶媒対照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キシレンで固定後、エオジンおよびメチレンブルーで染色後、蒸留水で洗浄した。さらにギムザ液で染色して、骨髓標本作製した。

動物当たり 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。

全ての群で死亡および一般状態に異常は認められなかった。

小核を有する多染性赤血球の出現頻度は投与 24 時間後屠殺の 1000 mg/kg で対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められ、そのほとんどが小さい小核 (小核の直径 < 細胞の直径の 1/4) であった。500 および 2000 mg/kg 群では有意差は認められず、小核を有する多染性赤血球の出現頻度は用量依存性がなく、また、背景データ (0.0~3.3%) の範囲内にあり、生物学的に意義がないと考えられた。投与 48 時間後屠殺では対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。小核を有する正染性赤血球数も溶媒対照と差がなかった。

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。

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。

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

以上の結果から、本試験条件下において、検体は *in vivo* で骨髓多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断される。

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	10mL	5	10000	0.7	0.7	0.0	3749	0.5
	検体	500	5	10000	1.0	1.0	0.0	3868	0.5
		1000	5	10000	2.1 ↑	2.0 ↑	0.1	3794	0.5
		2000	5	10000	0.9	0.8	0.1	2735	0.4
	CPP	20	5	10000	17.8 ↑	17.8 ↑	0.0	4086	1.2
	VCR	0.15	5	10000	75.7 ↑	57.5 ↑	18.2 ↑	5158	1.9
48 時間	DMSO	10mL	5	10000	1.5	1.5	0.0	3481	0.3
	検体	2000	5	10000	1.6	1.6	0.0	4849	0.6

CPP : シクロホスファミド

VCR : ビンクリスチン

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) ↑ : $P \leq 0.05$ 、↑ : $p \leq 0.01$

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

Fluxapyroxad

2-3-8. 代謝物 のラット単回投与によるラット肝細胞を用いた *in vivo* 不定期 DNA 合成試験

(資料 IM-22)

試験機関:

(GLP 対応)

報告書作成年:

検体純度:

供試動物: ウイスター系ラット [CrI:WI (Han)] 雄、8~10 週齢、体重 230~267 g、1 群 3 匹

試験方法:

投与: 検体は用時調製した。DMSO に溶解後、コーンオイルに懸濁 (混合比率 2:3) し、検体純度で補正し 1000 および 2000 mg/kg 相当の投与量で、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 DMSO/コーンオイルの混液 (2:3) のみを、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同様に強制経口投与した。

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 EGTA 溶液、次いでコラーゲナーゼ溶液を用いて還流した。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、滅菌ガーゼでろ過、遠心分離し、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% 以上であることを確認して試験に用いた。

培養条件: well 当り 4×10^5 個の生存細胞を、動物当り 4~6 well 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 0.25 mM 含有培地を加えて、さらに 12 時間 CO_2 インキュベーター内で培養した。培養は 37°C、95% O_2 /5% CO_2 気中で行った。

UDS の定量: 培養終了後、細胞をエタノール酢酸で固定し乾燥させた後、オートラジオグラフィーを取り、各動物につき少なくともスライド 2 枚 (合計 100 細胞/用量)、各用量 3 動物について観察し、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。細胞毒性は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: 正味の銀粒子数の平均がいずれか 1 用量で 0 を超え、かつ溶媒対照群の値を明らかに超えている場合を陽性とした。

試験結果:

臨床症状として、2000 mg/kg 投与群で軽度の下痢が認められたのみであった。検体の投与による正味核銀粒子数の増加は認められなかった。検体投与群の動物当たりの正味核銀粒子数(-2.26~-4.85)は溶媒対照群(-1.64~-5.52)の範囲内にあり、かつ溶媒対照の背景データ(-1.96~-7.92)の範囲内にあった。動物当たりの修復細胞率は0~3%の範囲内にあり、溶媒対照群(0~3%)の範囲内にあった。

検体の投与による細胞毒性、および生存細胞の質の変化は認められなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-AAF では動物当たりの正味核銀粒子数の明らかな増加が認められ、修復細胞の割合も大きく増加した。

以上の結果から、本検体はラットの肝細胞を用いた *in vivo* 検定において、不定期 DNA 合成を誘発しないと判断される。

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	10mL	5.23±1.39	9.32±1.60	-4.09±1.31	1.33
	検体	1000	4.51±0.84	7.44±0.90	-2.94±0.47	0.67
		2000	5.62±1.42	9.77±2.23	-4.16±0.82	0.67
	2-AAF	50	17.13±3.18	9.73±2.25	7.40±1.79	62.00
投与 14 時間後	DMSO	10mL	5.24±0.69	8.07±0.70	-2.84±1.36	0.67
	検体	1000	6.03±1.24	9.50±0.49	-3.47±0.77	0.67
		2000	4.19±0.95	6.71±1.31	-2.52±0.45	1.67
	2-AAF	50	18.59±4.08	10.65±2.11	7.94±2.58	68.00

数値は平均値±SD

DMSO: ジメチルスルホキシド

2-AAF: 2-アセチルアミノフルオレン

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	10mL	83.0	100.0
	検体	1000	81.3	98.0
		2000	78.7	94.8
	2-AAF	50	82.0	98.8
投与 14 時間後	DMSO	10mL	79.3	100.0
	検体	1000	80.3	101.3
		2000	84.3	106.3
	2-AAF	50	83.7	105.5

DMSO: ジメチルスルホキシド

2-AAF: 2-アセチルアミノフルオレン