

表 7 90日間亜急性神経毒性試験（ラット）投与量一覧

投与量 (ppm)	性別	50	250	750	1500
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	3.5	16.9	49.9	
	雌	4.0	20.4		111.9

1500ppm 投与群の雌で体重減少、摂餌量及び飲水量の減少及び前肢握力低下が、750ppm 投与群の雄で体重減少が、250ppm 以上の投与群の雄で摂餌量及び飲水量の減少が認められた。

いずれの投与群においても神経毒性影響は認められなかった。

本試験での無毒性量は、250ppm 以上の投与群の雄で摂餌量の減少等が認められたことから、雄で 50ppm (3.5mg/kg 体重/日)、1500ppm 投与群の雌で体重減少等が認められたことから、雌で 250ppm (20.4mg/kg 体重/日) であると考えられる。神経毒性は認められなかった。(参照 39)

10. 慢性毒性試験及び発がん性試験

(1) 12ヶ月間慢性毒性試験（イヌ）

ビーグル犬（一群雌雄各 5 匹）を用いた混餌（原体：0、100、200 及び 400ppm：表 8 参照）投与による 12ヶ月間慢性毒性試験が実施された。

表 8 12ヶ月間慢性毒性試験（イヌ）投与量一覧

投与量 (ppm)	性別	100	200	400
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	2.7	5.4	10.8
	雌	2.7	5.4	11.2

400ppm 投与群の雌雄で下痢及び嘔吐、血小板数の増加、血清中総蛋白及び総コレステロールの減少が、雄で白血球（多形核好中球、リンパ球）数の増加及び血清中アルブミンの減少が、雌で体重増加抑制、摂餌量減少及び血清中グロブリンの減少が認められた。

本試験での無毒性量は、400ppm 投与群の雄で白血球（多形核好中球、リンパ球）数の増加が、雌で体重増加抑制等が認められたことから、雌雄で 200ppm (雌雄：5.4mg/kg 体重/日) であると考えられる。(参照 40)

(2) 24ヶ月間慢性毒性試験（ラット）

Wistar ラット（一群雌雄各 20 匹）を用いた混餌（原体：0、25、75 及び 200ppm：表 9 参照）投与による 24ヶ月間慢性毒性試験が実施された。

表 9 24ヶ月間慢性毒性試験（ラット）投与量一覧

投与量 (ppm)	性別	25	75	200
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	1.1	3.4	9.0
	雌	1.5	4.6	12.3

200ppm 投与群の雌雄で体重増加抑制が、雄で精巢上体無精子症が、25ppm 以上の投与群の雄で精細管変性が認められた。腫瘍性病変は認められなかった。

精細管変性は、精細管加齢性変化であり、病変が重度になると精細管萎縮となるが、精細管変性と精細管萎縮を合わせた精細管の加齢性病変発生では各用量群で差が認められなかったことから、精細管変性は投与の影響ではないと考えられる。

本試験における無毒性量は、200ppm 投与群の雌雄で体重増加抑制等が認められたことから、雌雄で 75ppm (雄：3.4mg/kg 体重/日、雌：4.6mg/kg 体重/日) であると考えられる。(参照 41)

(3) 24ヶ月間発がん性試験（ラット）

Wistar ラット（一群雌雄各 50 匹）を用いた混餌（原体：0、25、75 及び 200ppm：表 10 参照）投与による 24ヶ月間発がん性試験が実施された。

表 10 24ヶ月間発がん性試験（ラット）投与量一覧

投与量 (ppm)	性別	25	75	200
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	1.2	3.4	9.2
	雌	1.5	4.7	12.6

200ppm 投与群の雌雄で体重減少及び体重増加抑制が、雄で摂餌量減少、肝細胞壊死及び肝細胞腺腫が、雌で乳腺がんが、75ppm 以上の投与群の雌で腎比重量の増加が認められた。75ppm 以上の投与群の雌で認められた腎比重量の増加は、腎への病理組織学的所見が認められなかったことから最終体重の減少に基づく 2 次的影響であると考えられる。

200ppm 投与群で認められた肝細胞壊死及び肝細胞腺腫は、*in vitro* 及び *in vivo* の遺伝毒性試験が全て陰性であること、肝過酸化脂質測定試験（14. その他毒性試験）で肝臓の過酸化脂質の増加が認められなかったこと、過形成病変の発生頻度や肝細胞がん及び肝細胞腺腫の合計発生頻度に有意差がなく（表 11 参照）、肝細胞腺腫の発生頻度（22%）が本系統雄ラットにおける肝細胞腺腫の背景データ（0～30%）の範囲内であること、ラットの 90 日間亜急性毒性試験において 1500ppm 群に肝細胞壊死がみられなかったことから、本変化は投与の影響とは考えられなかった。

また、200ppm 投与群で認められた乳腺がんは、他の乳腺上皮由来腫瘍の発生は各用量群間で差はなく、これらの上皮腫瘍の合計発生頻度にも統計学的有意差が認めら

れなかったこと、乳腺ののう胞及び過形成の発生頻度に各用量群間に差が認められなかったこと（表 12 参照）、乳腺がんの発生頻度（16%）が系統雌ラットにおける背景的数据（0~25%）の範囲内であることから、本変化は投与の影響とは考えられなかった。

本試験における無毒性量は、200ppm 投与群の雌雄で体重増加抑制が、雄で肝細胞腺腫等が認められたことから、雌雄で 75ppm（雄：3.4mg/kg 体重/日、雌：4.7mg/kg 体重/日）であると考えられる。発がん性は認められない。（参照 42,67）

表 11 雄ラットにおける肝細胞小増殖巣及び肝細胞腺腫・癌の発生頻度

性別		雄			
投与群 (ppm)		0	25	75	200
検査動物数		50	50	50	50
肝細胞小増殖巣	空砲巣	3	10*	10*	9
	明細胞性	13	20	16	17
	好塩基性	43	46	41	38
	好酸性	1	1	0	1
	混合性	0	1	0	0
	いずれかを有する動物数	43	48	42	39
肝細胞腺腫		4	7	5	11*
肝細胞癌		4	3	5	3
肝細胞腺腫/癌		8	10	10	14

Fisher の直接確率計算法、* : $p < 0.05$

表 12 ラットにおける乳腺ののう胞・過形成及び乳腺上皮由来腫瘍の発生頻度

性別	雌			
投与群 (ppm)	0	25	75	200
検査動物数	50	50	50	50
のう胞	21	11*	27	23
過形成	5	9	5	6
腺腫	0	0	2	1
のう腺腫	0	1	0	1
線維腺腫	10	10	8	10
腺癌	2	6	2	8*
腺腫/のう腺腫/ 線維腺腫/腺癌	12	17	12	20

Fisher の直接確率計算法、* : $p < 0.05$

(4) 18ヶ月間発がん性試験 (マウス)

B6C3F1 マウス (一群雌雄各 50 匹) を用いた混餌 [原体 : 0、10、30、120 (雄) 及び 180(雌)ppm : 表 13 参照] 投与による 18ヶ月間発がん性試験が実施された。

表 13 18ヶ月間発がん性試験 (マウス) 投与量一覧

投与量 (ppm)	性別	10	30	120	180
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	1.4	4.1	17.2	/
	雌	1.6	4.8	20.5	

180ppm 投与群の雌で体重減少、体重増加抑制、肝及び腎比重量の増加が、120ppm 投与群の雄で体重減少、体重増加抑制、腎比重量の増加が、雌で脳比重量の増加が、10ppm 以上の投与群の雄で精巣及び脳比重量の増加、肝実重量の減少が認められた。腫瘍性病変については対照群と比べて統計学的有意差は認められなかった。

各投与群で認められた臓器重量の変化は、関連する病理組織学的異常を伴わなかったことから、毒性学的意義はないものと考えられる。

本試験での無毒性量は、120ppm 投与群の雄及び 180ppm 投与群の雌で体重増加抑制等が認められたことから、雄で 30ppm (4.1mg/kg 体重/日)、雌で 120ppm (20.5mg/kg 体重/日) であると考えられる。発がん性は認められない。(参照 43)

1.1. 生殖発生毒性試験

(1) 2世代繁殖試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 25 匹) を用いた混餌 (原体 : 0、25、75 及び 300ppm : 表 14 参照) 投与による 2世代繁殖毒性試験が実施された。

表 14 2世代繁殖試験 (ラット) 投与量一覧 (mg/kg 体重/日)

		25ppm	75ppm	300ppm
P	雄	2.5	7.4	29.0
	雌	2.6	7.8	30.4
F ₁	雄	2.8	8.6	35.0
	雌	3.0	9.0	36.0

親動物では 300ppm 投与群の雌雄で低体重、摂餌量減少、腎比重量の増加 (F₁) が、雌で脳、下垂体及び脾比重量の増加 (F₁)、膣開口の遅延 (F₁)、交尾成立までの日数の延長 (F₁) が、75ppm 以上の投与群の雌で着床数の減少 (P) が認められた。

児動物では 300ppm 投与群の雌雄で低体重、体重増加抑制、脳比重量の増加、胸腺、脾及び脳実重量の減少が認められた。

P における着床数の減少、F₁ における交尾成立までの日数延長は変化が小さく背景

データの範囲内であることから、また、各投与群で認められた臓器重量の増加は偶発的であることから、ピラクロストロビン投与の影響とは考えにくい。

本試験の無毒性量は、親動物では 300ppm 投与群の雌雄で低体重等が、雌で膈開口の遅延 (F₁) 等が、児動物では 300ppm 投与群の雌雄で体重増加抑制等が認められたことから、親動物及び児動物の雌雄で 75ppm (P 雄: 7.4mg/kg 体重/日、P 雌: 7.8mg/kg 体重/日、F₁ 雄: 8.6mg/kg 体重/日、F₁ 雌: 9.0 mg/kg 体重/日) と考えられる。繁殖能に対する影響は認められない。(参照 44,67,69)

(2) 発生毒性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌 25 匹) の妊娠 6~19 日に強制経口 (原体: 0、10、25 及び 50mg/kg 体重/日) 投与して発生毒性試験が実施された。

母動物では 50mg/kg 体重/日投与群で体重減少、体重増加抑制が、25mg/kg 体重/日以上以上の投与群で妊娠子宮を除いた補正体重増加抑制、摂餌量減少が認められた。胎児では 50mg/kg 体重/日以上以上の投与群で内臓変異 (腎盂拡張) 及び骨格変異・化骨遅延 (頸肋、胸骨分節化骨不全) の発生頻度の上昇が認められた。

本試験の無毒性量は、母動物で 25mg/kg 体重/日投与群で体重増加抑制等が認められたことから、母動物で 10mg/kg 体重/日、胎児では 50mg/kg 体重/日投与群で腎盂拡張、頸肋及び胸骨分節化骨不全の発生頻度の上昇が認められたことから、胎児で 25mg/kg 体重/日であると考えられる。催奇形性は認められない。(参照 45)

(3) 発生毒性試験 (ウサギ)

Himalayan ウサギ (一群雌 25 匹) の妊娠 7~28 日に強制経口 (原体: 0、5、10 及び 20mg/kg 体重/日) 投与して発生毒性試験が実施された。

母動物では 20mg/kg 体重/日投与群で体重減少が、10mg/kg 体重/日以上以上の投与群で全胚吸収母体、体重増加抑制、摂餌量低下、妊娠子宮重量低下が認められた。胚/胎児では 20mg/kg 体重/日投与群で着床後胚死亡率の上昇及び生存胎児数の減少が、10mg/kg 体重/日で着床後胚死亡率上昇傾向が認められた。外表、骨格、内部器官の奇形の発現率にはピラクロストロビン投与の影響はみられなかった。

本試験の無毒性量は、母動物では 10mg/kg 体重/日投与群で体重増加抑制等が、胎児では 10mg/kg 体重/日で着床後胚死亡率上昇傾向が認められたことから、母動物及び胎児で 5mg/kg 体重/日であると考えられる。催奇形性は認められない。(参照 46,63)

1.2. 遺伝毒性

細菌を用いた復帰突然変異試験、ラット肝初代培養細胞を用いた *in vitro* 不定期 DNA 合成試験、チャイニーズハムスター培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験及び染色体異常試験、マウスを用いた小核試験が標準的な方法で実施されており、試験結果は全て陰性であった (表 15)。

ピラクロストロビンに遺伝毒性はないものと考えられる。(参照 47~51)

表 15 遺伝毒性試験結果概要 (原体)

	試験	対象	投与量(mg/kg 体重)	結果
<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験 (+/-S9)	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA98, TA1535, TA1537 株 <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> 株	/	陰性
	不定期 DNA 合成試験	ラット初代培養肝細胞		陰性
	遺伝子突然変異試験 (+/-S9)	チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO)		陰性
	染色体異常試験 (+/-S9)	チャイニーズハムスター肺由来細胞 (V79)		陰性
<i>in vivo</i>	小核試験	NMRI マウス雌雄各 5 匹	75, 150, 300 (単回経口投与)	陰性

注) +/-S9 : 代謝活性化存在下及び非存在下

代謝物である M01、M02、M60、M62 及び M76 の細菌を用いた復帰突然変異試験が実施されており、試験結果は全て陰性であった (表 16)。

これらの代謝物に遺伝毒性はないものと考えられる。(参照 52~56)

表 16 遺伝毒性試験結果概要 (代謝物)

被験物質	試験	対象	結果
代謝物 M01	復帰突然変異試験 (+/-S9)	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA98, TA1535, TA1537 株 <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> 株	陰性
代謝物 M02			
代謝物 M60			
代謝物 M62			
代謝物 M76			

注) +/-S9 : 代謝活性化系存在下及び非存在下

1.3. 一般薬理試験

マウス及びラットを用いた一般薬理試験が実施された。表 17 にその総括を示す。(参照 57)

表 17 一般薬理試験

試験の種類	供試生物	動物数 匹/群	投与量 (mg/kg 体重)	無作用量 (mg/kg 体重)	作用量 (mg/kg 体重)	概要	
中枢神経系	一般状態	マウス	雌雄 3	0, 320, 800, 2000, 5000	2000	5000	5000mg/kg 体重投与群の雌 1 例死亡。影響なし。
		ラット	雄 5	0, 320, 800, 2000, 5000	800	2000	5000mg/kg 体重投与群で流涎、下痢及びよろめき歩行がみられた。
	ヘキシパ [®] ルビ [®] タル睡眠	マウス	雄 8	0, 128, 320, 800, 2000, 5000	800	2000	睡眠時間延長がみられた。
	体温	ラット	雄 5	0, 320,800, 2000, 5000	5000	-	影響なし。
循環器系	血圧、心拍数	ラット	雄 5	0, 800, 2000,5000	5000	-	2000 及び 5000 mg/kg 体重投与群で各 1 例死亡。影響なし。
自律神経系	瞳孔径	ラット	雄 5	0, 320,800, 2000,5000	5000	-	影響なし。
消化器	炭末輸送能	マウス	雄 8	0, 20.5, 51.2, 128, 320, 800, 2000, 5000	5000	-	一晚絶食群の 320、800、2000 及び 5000mg/kg 体重投与群でそれぞれ 3、7、5 及び 4 例が、2 時間絶食群の 800、2000 及び 5000mg/kg 体重投与群でそれぞれ 1、2 及び 1 例が、炭末投与前に死亡。影響なし。
骨格筋	握力	ラット	雄 5	0,320,800, 2000,5000	5000	-	影響なし。
腎機能	腎機能	ラット	雄 5	0,51.2, 128,320, 800,2000, 5000	320	800	5000mg/kg 体重投与群で、採尿時に 3 例死亡。 800mg/kg 体重以上投与群で尿量減少、それに起因すると考えられる尿中 Na,K,Cl 排泄量の減少。

- ・ 全て強制経口投与した。
- ・ 検体はピラクロストロピン原体を用いた。

14. その他毒性試験

(1) ラットを用いた肝過酸化脂質測定試験

Wistar ラット(一群雄各 10 匹)を用いた 14 又は 28 日間混餌 (原体 : 0、75 及び 200ppm : 表 18) 投与による肝過酸化脂質測定試験が実施された。

表 18 肝過酸化脂質測定試験 (ラット) 投与量一覧

投与量 (ppm)	投与群	75	200
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	14 日間	5.3	13.4
	28 日間	5.1	13.6

14 日間投与群において 200ppm 投与群で、28 日間投与群において 75ppm 以上投与群で過酸化脂質が減少した。

ピラクロストロビン投与は肝臓に対して酸化ストレスを及ぼさないと考えられる。(参照 58)

(2) *in vitro* 溶血試験

ウサギ赤血球を用いた *in vitro* 溶血試験が実施された。比較的高い濃度 (0.1% W/V) のピラクロストロビンと赤血球との懸濁液を 2 時間攪拌した後も溶血を起こさなかったことから、ピラクロストロビンには直接的な溶血作用はないと考えられる。

(参照 59)

(3) ラットを用いた血清及び尿中鉄分析試験

Wistar ラット(一群雌雄各 10 匹)を用いた 14 日間混餌 (原体 : 0、50、500 及び 1500ppm : 表 19 参照) 投与による血清及び尿中鉄分析試験が実施された。

表 19 血清及び尿中鉄分析試験 (ラット) 投与量一覧

投与量 (ppm)	性別	50	500	1500
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	3.8	33.9	73.9
	雌	4.1	37.4	78.3

500ppm 以上投与群の雌雄で血清中鉄濃度減少が認められた。血清中トランスフェリン及び尿中鉄排泄量については、いずれの投与群においても影響は認められなかった。ラットを用いた 90 日間亜急性毒性試験 500ppm 以上投与群の雌雄で認められた十二指腸肥厚及び粘膜過形成に一致して血清鉄濃度の減少が認められたことから、十二指腸肥厚及び粘膜過形成はピラクロストロビン投与により持続性血清鉄欠乏が生じ鉄吸収要求の亢進した結果もたらされたと考えられる。

本試験での、血清中鉄濃度の減少に関する無毒性量は、500ppm 以上投与群の雌雄

で血清中鉄濃度減少が認められたことから、50ppm（雄：3.8mg/kg 体重/日、雌：4.1mg/kg 体重/日）であると考えられる。（参照 60）

（4）ラットに対するピラクロストロビンの混餌投与及びビタミン B₁₂ 同時皮下投与試験

Wistar ラット（一群雄各 12 匹）を用いて 28 日間混餌 [原体：0 及び 1500ppm（0 及び 98mg/kg 体重/日に相当）] 投与と同時にビタミン B₁₂（0 及び 0.1mL）を皮下投与した。ビタミン B₁₂ 投与の有無にかかわらず、ピラクロストロビン投与群で体重及び摂餌量の減少、赤血球数、血色素量、MCV、MCHC 及び血清鉄濃度の減少、血小板数の増加並びに十二指腸比重量の増加が認められた。また、前胃及び腺胃の pH に投与の影響は認められなかった。ピラクロストロビンに起因する貧血、血清鉄濃度の低下及び十二指腸重量増加は、ビタミン B₁₂ を投与しても抑制できなかったことから、ビタミン B₁₂ 又は pH の変化による鉄吸収への影響が原因ではないと考えられる。（参照 61）

（5）BAS505F³及び鉄の同時消化管外投与試験（ラット）

Wistar ラット（一群雌雄各 10 匹）を用いた混餌 [BAS505F 原体：0、500（雌）及び 4500ppm（雄）：表 20 参照] 投与及び鉄錯体 (Fe³⁺) の筋注（雄：0、7、11 及び 13 日目に 100mg/kg 体重を 1 日 1 回、雌：試験 2 日前～6 日目に 50mg/kg 体重を 1 日 2 回）処置併用による 14 日間（雄）及び 7 日間（雌）の BAS505F 及び鉄の同時消化管外投与試験が実施された。

表 20 検体摂取量 (mg/kg 体重/日)

投与量	雄	雌
500ppm		37.7
500ppm+Fe		17.7
4500ppm	206.6	191.3
4500ppm+Fe	171.2	84.9

BAS505F のみの投与群ではいずれも血清中鉄濃度の低下が、鉄錯体の併用投与群では投与 7 日目で血清中鉄濃度の上昇が認められた。十二指腸の実重量増加と細胞増殖の増加には高い相関性が認められ、4500ppm 群では鉄錯体の同時投与により細胞増殖の増加率及び瀰漫性過形成の程度が低くなる傾向が認められた。細胞増殖の増加は PCNA 染色で確認した。（参照 62,67,69,70）

（6）BAS505F 投与による十二指腸粘膜鉄吸収及び輸送への影響試験（ラット）

Wistar ラット（一群雌 5 匹）を用いた混餌 [BAS505F 原体：0 及び 4500ppm] 投与による 24、96 及び 168 時間後、十二指腸を摘出し、粘膜の一部を反転し、⁵⁹Fe を入れた培養液中につるして十二指腸粘膜鉄吸収及び輸送への影響試験が実施された。

BAS505F を 96 及び 168 時間投与した十二指腸では ⁵⁹Fe 吸収の低下が認められ、オー

³ ピラクロストロビンの類似化合物である dimoxystrobin : (E)-2-(methoxyimino)-N-methyl-2-[α-(2,5-xylyloxy)-o-tolyl]acetamide)

ラジオグラフィーの観察により対照群で⁵⁹Feが絨毛全域に分布していたのに対し、投与群では絨毛上部にのみ分布することが認められたことから、ストロビルリン系薬剤投与により、十二指腸における吸収は量的にも吸収面積においても低下すると考えられる。また、BAS505Fを96時間投与後、⁵⁹Feを十二指腸へ注入したところ20分後には、粘膜内保持量、粘膜輸送量、全粘膜吸収量が減少したことから、ストロビルリン系薬剤投与により、十二指腸粘膜から体内への⁵⁹Fe輸送が抑制されたと考えられる。

このことから、ストロビルリン系化合物は十二指腸における鉄吸収/体内輸送の両面を抑制することで鉄血清の減少をもたらし、この吸収抑制が十二指腸粘膜上皮に対する鉄吸収要求亢進のネガティブフィードバックとなり、吸収面積の拡張を図るため粘膜上皮細胞が増生し、結果的に粘膜肥厚/過形成が生じた可能性があると考えられた。(参照 63)