

## 10. 変異原性

### 10-1. 細菌を用いた復帰変異原性試験 (P 体)

(資料 T-25)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 :

被験物質の純度 :

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 [*Salmonella typhimurium* (TA1535, TA100, TA1537, TA98 株)] 及びトリプトファン要求性の大腸菌 [*Escherichia coli* WP2 *uvrA*] を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 Mix) の存在下及び非存在下で、標準プレート法により Ames らの方法で変異原性を検定した。溶媒として DMSO を用い、100 ~ 5000  $\mu$ g/plate 範囲の 5 濃度で試験した。

用量設定根拠 :

結 果 : 結果を次頁の表に示した。

被験物質は DMSO に約 500mg/mL の濃度まで溶解し、試験に用いた最高濃度とした。

第 1 回目の試験において、S9 mix 非存在下の TA100 に陽性反応が認められた (対照に対して最大 4.1 倍のコロニー数)。TA100 の S9 mix 存在下及び他の菌株については、S9 mix の存在下及び非存在下のいずれにも陽性反応は認められなかった。

第 2 回目の試験において、TA100 を S9 mix 非存在下について試験を実施した。対照に比して 2.3 倍のコロニー数の増加が認められ、陽性反応を示した。

一方、陽性対照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。

以上より、ジメテナミド P 原体は TA100 の代謝活性系の非存在下で変異原性を有すると結論する。

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。

Dimethenamid-P

第1回目 標準プレート法

[数値は3プレートの平均]

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/plate				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2 uvrA	TA1535	TA100	TA1537	TA98
対照 (DMSO)		-	10	9	123	4	17
検体	100	-	18	11	143	4	22
	333	-	13	8	182	6	15
	1000	-	10	12	215	4	24
	3333*1	-	13	12	374	7	32
	5000*1	-	9	11	507	7	31
対照 (DMSO)		+	14	7	152	3	17
検体	100	+	10	13	139	4	19
	333	+	11	11	144	5	19
	1000	+	6	10	151	3	19
	3333*1	+	9	14	145	5	16
	5000*1	+	6	9	149	5	13
陽性対照*2	2-AA*3	+	136	91	647	65	512
	2-NF (1.0)	-	165	NT	NT	NT	NT
	SA (1.0)	-	NT	435	509	NT	NT
	AAC (75)	-	NT	NT	NT	1154	NT
	MMS (1000)	-	NT	NT	NT	NT	142

\*1. 不溶性沈殿物を認める。

\*2. 2-AA: 2-aminoanthracene

AAC: 9-aminoacridine

2-NF: 2-nitrofluorene

MMS: methyl methanesulfonate

SA: Sodium azide

\*3. *Salmonella typhimurium* 全種に対して  $1.0\mu\text{g}/\text{plate}$ , *E. Coli*. WP2 uvrA に対して  $10\mu\text{g}/\text{plate}$

NT: 試験を行っていない

第2回目 標準プレート法

[数値は3プレートの平均]

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/plate
			塩基対置換型
			TA100
対照 (DMSO)		-	110
検体	100	-	110
	333	-	138
	1000	-	160
	2000	-	218
	3333	-	256
	4000*1	-	245
	5000*1	-	255
陽性対照*2	SA (1.0)	-	649

\*1. 不溶性沈殿物を認める。 \*2. SA: Sodium azide

10-2. 細菌を用いた復帰突然変異試験 (P 体)

(資料 T-26)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:

被験物質の純度:

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) の TA1535、TA100、TA1537 及び TA98 株、並びにトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli*) の WP2 uvrA 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 Mix) の存在下及び非存在下で、標準プレート法 (Ames 法) 及びプレインキュベーション法 (矢作ら、松島ら) の方法で変異原性を検定した。被験物質を溶解させるために DMSO を用いた。

実験は以下のようにそれぞれ区当りプレート 3 枚を用いて行った。

実験 1: 使用菌株: TA1535、TA100、TA1537、TA98、WP2 uvrA  
試験濃度: 0、20、100、500、2500、5000  $\mu$ g/プレート  
試験法: 標準プレート法

実験 2: 使用菌株: TA1535  
試験濃度: 0、500、1000、2000、3000、4000  $\mu$ g/プレート  
試験法: 標準プレート法

実験 3: 使用菌株: TA1535、TA100、TA1537、TA98、WP2 uvrA  
試験濃度: 0、20、100、500、2500、5000  $\mu$ g/プレート  
試験法: プレインキュベーション法

実験 4: 使用菌株: TA100  
試験濃度: 0、500、1000、2000、3000、4000  $\mu$ g/プレート  
試験法: 標準プレート法

陽性対照物質として S9 Mix 非存在下では N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (MNNG)、9-アミノアクリジン (AAC)、4-ニトロ-o-フェニレンジアミン (NOPD)、N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (ENNG) を、又 S9 Mix の存在下では 2-アミノアントラセン (2-AA) を用いた。

結果: 結果を次頁の表に示した。

被験物質は代謝活性化系の存在下及び非存在下における 4 実験において、標準プレート法及びプレインキュベーション法ともに 5000  $\mu$ g/プレートの最高濃度においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

被験物質の細胞毒性は菌株及び S9 Mix の有無によって異なるが、標準プレート法では 500  $\mu$ g/プレート以上、プレインキュベーション法では 2500  $\mu$ g/プレート以上で認められた。

一方、陽性対照として用いた 2-アミノアントラセン (2-AA)、9-アミノアクリジン (AAC)、N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (ENNG)、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (MNNG) 及び 4-ニトロ-o-フェニレンジアミン (NOPD) では、全ての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、被験物質は復帰変異誘発性を有しないものと判断される。

表 1. 標準プレート法 (実験 1) [数値は 3 プレートの平均]

薬 物	濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2 uvrA	TA1535	TA100	TA1537	TA98
対照 (DMSO)		-	44	20	121	11	29
検 体	20	-	43	21	126	12	39
	100	-	47	23	128	11	35
	500	-	42	32	134	9	33
	2500	-	47	39	123	11	34
	5000	-	44	19	42 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	33
対照 (DMSO)		+	51	19	148	12	50
検 体	20	+	57	16	134	13	47
	100	+	59	15	143	11	44
	500	+	56	11	136	15	23
	2500	+	51	10	112	11	28
	5000	+	38	20	53 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	19
陽性対照	2-AA 2.5	+	NT	148	1393	104	1073
	2-AA 60	+	351	NT	NT	NT	NT
	AAC 100	-	NT	NT	NT	402	NT
	ENNG 10	-	1315	NT	NT	NT	NT
	MNNG 5.0	-	NT	1048	1145	NT	NT
	NOPD 10	-	NT	NT	NT	NT	799

NT: 試験を行っていない

<sup>b</sup>: 背景菌叢の抑制

2-AA: 2-アミノアントラセン

AAC: 9-アミノアカリジン

ENNG: N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

MNNG: N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

NOPD: 4-ニトロ-O-フェニレンジアミン

表 2. 標準プレート法 (実験 2) [数値は 3 プレートの平均]

薬 物	濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート
			塩基対置換型
			TA1535
対照 (DMSO)		-	20
検 体	500	-	19
	1000	-	20
	2000	-	18
	3000	-	18
	4000	-	17
対照 (DMSO)		+	20
検 体	500	+	22
	1000	+	20
	2000	+	19
	3000	+	17
	4000	+	17
陽性対照	2-AA 2.5	+	429
	MNNG 5.0	-	1485

2-AA: 2-アミノアントラセン

MNNG: N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

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。

Dimethenamid-P

表 3. 標準プレート法 (実験 4) [数値は 3 プレートの平均]

薬 物	濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート	
			塩基対置換型	
			TA100	
対照 (DMSO)		-	158	
検 体	500	-	154	
	1000	-	152	
	2000	-	152	
	3000	-	141	
	4000	-	152	
対照 (DMSO)		+	159	
検 体	500	+	155	
	1000	+	171	
	2000	+	171	
	3000	+	153	
	4000	+	146	
陽性対照	2-AA 2.5	+	2130	
	MNNG 5.0	-	810	

2-AA : 2-アミノアントラセン

MNNG : N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

表 4. プレインキュベーション法 (実験 3) [数値は 3 プレートの平均]

薬 物	濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2 uvrA	TA1535	TA100	TA1537	TA98
対照 (DMSO)		-	29	21	147	10	31
検 体	20	-	33	20	136	8	29
	100	-	29	18	127	8	28
	500	-	24	19	117	9	23
	2500	-	10	0 <sup>b</sup>	15 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	9 <sup>b</sup>
	5000	-	10 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
対照 (DMSO)		+	32	20	143	10	41
検 体	20	+	30	18	139	8	37
	100	+	30	17	138	7	32
	500	+	27	11	98	7	29
	2500	+	18	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	7 <sup>b</sup>
	5000	+	21	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
陽性対照	2-AA 2.5	+	NT	149	869	111	1089
	2-AA 60	+	222	NT	NT	NT	NT
	AAC 100	-	NT	NT	NT	465	NT
	ENNG 10	-	675	NT	NT	NT	NT
	MNNG 5.0	-	NT	1317	1021	NT	NT
	NOPD 10	-	NT	NT	NT	NT	881

NT: 試験を行っていない

2-AA : 2-アミノアントラセン

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

NOPD : 4-ニトロ-O-フェニレンジアミン

<sup>b</sup>: 背景菌叢の抑制

AAC : 9-アミノアカリジン

MNNG : N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

10-3. 細菌を用いた復帰突然変異試験 (参考標準品)

(資料 T-27)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:

被験物質純度:

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) の TA1535、TA100、TA1537 及び TA98 株、並びにトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli*) の WP2 uvrA 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 Mix) の存在下及び非存在下で、標準プレート法 (Ames 法) 及びプレインキュベーション法 (矢作法、松島法) の方法で変異原性を検定した。被験物質を溶解させるために DMSO を用いた。

実験は以下のようにそれぞれ区当りプレート 3 枚を用い 3 回行った。

実験 1:

使用菌株: TA1535、TA100、TA1537、TA98、WP2 uvrA  
試験濃度: 0、20、100、500、2500、5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$   
試験法: 標準プレート法

実験 2:

使用菌株: TA1535  
試験濃度: 0、500、1000、2000、3000、4000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$   
試験法: 標準プレート法

実験 3:

使用菌株: TA1535、TA100、TA1537、TA98、WP2 uvrA  
試験濃度: 0、4、20、100、500、2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$   
試験法: プレインキュベーション法

陽性対照物質として S9 Mix 非存在下では N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (MNNG)、9-アミノアクリジン (AAC)、4-ニトロ-o-フェニレンジアミン (NOPD)、N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (ENNG) を、又 S9 Mix の存在下では 2-アミノアントラセン (2-AA) を用いた。

結果: 結果を次頁の表に示した。

被験物質は代謝活性化系の存在下及び非存在下における 3 実験において、標準プレート法では 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の最高濃度においても、又プレインキュベーション法では 2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の最高濃度においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

被験物質の細胞毒性は菌株及び S9 Mix の有無によって異なるが、標準プレート法では  $\geq 2500 \mu\text{g}/\text{プレート}$ 、プレインキュベーション法では  $\geq 500 \mu\text{g}/\text{プレート}$  で認められた。

一方、陽性対照として用いた 2-アミノアントラセン (2-AA)、9-アミノアクリジン (AAC)、N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (ENNG)、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (MNNG) 及び 4-ニトロ-o-フェニレンジアミン (NOPD) では、全ての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、被験物質は復帰変異誘発性を有しないものと判断される。

実験 1. 標準プレート法

[数値は3プレートの平均]

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/$ プレート)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2 uvrA	TA1535	TA100	TA1537	TA98
対照 (DMSO)		-	44	20	121	11	29
検体	20	-	37	20	134	11	22
	100	-	40	21	142	11	25
	500	-	40	20	141	9	25
	2500	-	39	36	132	6	22
	5000	-	39	25	110	2	14
対照 (DMSO)		+	51	19	148	12	50
検体	20	+	49	23	144	10	37
	100	+	47	20	135	11	39
	500	+	51	17	143	8	30
	2500	+	45	19	133	6	24
	5000	+	50	11 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>	12 <sup>b</sup>
陽性対照	2-AA 2.5	+	NT	148	1393	104	1073
	2-AA 60	+	351	NT	NT	NT	NT
	AAC 100	-	NT	NT	NT	402	NT
	ENNG 10	-	1315	NT	NT	NT	NT
	MNNG 5.0	-	NT	1048	1145	NT	NT
	NOPD 10	-	NT	NT	NT	NT	799

NT: 試験を行っていない

<sup>b</sup>: 背景菌叢の抑制

2-AA: 2-アミノアントラセン

AAC: 9-アミノアクリジン

ENNG: N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

MNNG: N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

NOPD: 4-ニトロ-0-フェニルソグアニン

実験 2. 標準プレート法

[数値は3プレートの平均]

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/$ プレート)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート
			塩基対置換型
			TA1535
対照 (DMSO)		-	20
検体	500	-	18
	1000	-	18
	2000	-	18
	3000	-	17
	4000	-	17
対照 (DMSO)		+	20
検体	500	+	17
	1000	+	19
	2000	+	17
	3000	+	16
	4000	+	15
陽性対照	2-AA 2.5	+	429
	MNNG 5.0	-	1485

2-AA: 2-アミノアントラセン

MNNG: N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

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。

Dimethenamid-P

実験 3. プレインキュベーション法

[数値は3プレートの平均]

薬物	濃度 ( $\mu$ g/ プレート)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2 uvrA	TA1535	TA100	TA1537	TA98
対照 (DMSO)		-	29	21	147	10	31
検体	4	-	36	18	145	8	32
	20	-	35	21	145	6	29
	100	-	33	19	141	6	20
	500	-	34	18	156	5	18
	2500	-	17 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
対照 (DMSO)		+	32	20	143	10	41
検体	4	+	41	19	156	8	36
	20	+	41	20	134	8	37
	100	+	36	16	141	9	34
	500	+	29	16	79	7	25
	2500	+	18 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
陽性対照	2-AA 2.5	+	NT	149	869	111	64
	2-AA 60	+	222	NT	NT	NT	NT
	AAC 100	-	NT	NT	NT	465	NT
	ENNG 10	-	675	NT	NT	NT	NT
	MNNG 5.0	-	NT	1317	1021	NT	NT
	NOPD 10	-	NT	NT	NT	NT	881

NT: 試験を行っていない

2-AA: 2-アミノアントラセン

ENNG: N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

NOPD: 4-ニトロ-O-フェニレンジアミン

<sup>b</sup>: 背景菌叢の抑制

AAC: 9-アミノアクリジン

MNNG: N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン



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。

Dimethenamid-P

10-4. 細菌を用いた復帰突然変異試験 (P 体)

(資料 T-28)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 :

被験物質の純度 :

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* TA100 を用い、薬物代謝酵素系 (S9 mix) の非存在下で、標準プレート法により Ames らの方法で変異原性を検定した。溶媒として DMSO を用い、100~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  範囲の 7 濃度で実施した。

用量設定根拠 :

結 果 : 結果を以下の表に示した。

被験物質は DMSO に約 100mg/mL の濃度に溶解し、試験に用いた最高濃度とした。

S9 mix 非存在下の TA100 に陽性反応は認められなかった。

一方、陽性対照は明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上より、ジメテナミド P 原体は TA100 の代謝活性系の非存在下で変異原性はないと結論する。

標準プレート法

[数値は 3 プレートの平均]

薬 物	濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/plate
			塩基対置換型 TA100
対 照 (DMSO)		-	104
検 体	100	-	136
	333	-	131
	1000	-	138
	2000* <sup>1</sup>	-	133
	3333* <sup>1</sup>	-	156
	4000* <sup>1</sup>	-	164
	5000* <sup>1</sup>	-	157
陽性対照* <sup>2</sup>	SA (1.0)	-	401

\*1. 不溶性沈殿物を認める。

\*2. SA : Sodium azide

#### 10-5. 細菌を用いた復帰突然変異試験 (P 体)

(資料 追 31)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 :

被験物質純度 :

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) 及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

被験物質は DMSO に溶解し、33~5200  $\mu\text{g}$ /プレートの範囲の 6 濃度で実施した。試験は 3 回反復とし、標準プレート法及びプレインキュベーション法で行った。

用量設定根拠 :

試験結果 : 結果を次表に示した。

2 回の試験において被験物質は菌株の生育阻害を起こさない最高用量 (標準プレート法では 1000  $\mu\text{g}$ /プレート、プレインキュベーション法では 333  $\mu\text{g}$ /プレート) まで、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照として用いた N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine、4-nitro-O-phenylenediamine、9-aminoacridine、4-nitroquinoline-N-oxide、2-aminoanthracene ではすべての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、被験物質は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと判断された。

標準プレート法

(表中の数値は3反復の平均値)

薬物	濃度 ( $\mu$ g/プレート)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			WP2uvrA	TA100	TA1535	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)		—	86.0	43.0	5.7	31.0	6.0	
被験物質	33	—	84.3	44.0	8.7	17.3	6.0	
	100	—	83.3	41.7	10.3	24.7	3.7	
	333	—	97.0	49.0	10.3	24.0	4.3	
	1000	—	88.3	50.7	4.3	25.7	6.0	
	2600	—	93.7	42.0	8.0	33.7B	3.0	
	5200	—	86.0	23.7	4.7B	13.3B	0.7B	
対照 (DMSO)		+	112.7	73.3	8.7	41.0	7.3	
被験物質	33	+	106.3	65.0	11.3	39.7	11.7	
	100	+	101.3	69.7	8.3	38.3	8.0	
	333	+	96.7	56.3	8.7	41.3	10.0	
	1000	+	96.3	59.0	10.7	37.0	9.7	
	2600	+	103.0	55.0	6.3	43.3	6.7	
	5200	+	88.7	33.7B	6.0B	25.7B	2.3B	
陽性 対照	MNNG	5.0	—		5472.0	6055.3		
	NOPD	10	—			341.7		
	AAC	100	—				1956.3	
	4-NQO	5	—	1114.0				
	2-AA	2.5	+		2426.7	291.3	2111.7	245.7
		60	+	257.0				

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

NOPD : 4-nitro-O-phenylenediamine

AAC : 9-aminoacridine

4-NQO : 4-nitroquinoline-N-oxide

2-AA : 2-aminoanthracene

B : 背景細菌叢が減少

プレインキュベーション法

(表中の数値は3反復の平均値)

薬物	濃度 ( $\mu$ g/プレート)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			WP2uvrA	TA100	TA1535	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)		—	74.3	36.0	13.7	24.0	13.3	
被験物質	33	—	70.7	39.0	12.7	18.7	11.0	
	100	—	72.3	50.0	10.7	20.3	8.0	
	333	—	69.3	41.0	7.7	22.0	14.3	
	1000	—	63.7	30.7	12.3	17.7	4.0B	
	2600	—	20.0B	33.7B	11.3B	13.0B	0.0B	
	5200	—	15.0B	0.0B	0.0B	9.3B	0.0B	
対照 (DMSO)		+	83.3	61.3	14.3	32.0	15.3	
被験物質	33	+	72.3	55.0	17.3	29.3	13.7	
	100	+	68.7	62.7	13.7	26.7	12.7	
	333	+	68.0	60.7	20.0	26.0	10.7	
	1000	+	68.7	62.0	11.0	26.7	16.3	
	2600	+	49.3B	19.7B	9.7B	7.0B	2.3B	
	5200	+	38.7B	0.0B	7.7B	0.0B	0.0B	
陽性 対照	MNNG	5.0	—		3681.3	3855.0		
	NOPD	10	—				416.0	
	AAC	100	—				1429.7	
	4-NQO	5	—	701.7				
	2-AA	2.5	+		2332.3	290.3	2246.7	160.3
		60	+	191.3				

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

NOPD : 4-nitro-O-phenylenediamine

AAC : 9-aminoacridine

4-NQO : 4-nitroquinoline-N-oxide

2-AA : 2-aminoanthracene

B : 背景細菌叢が減少

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。

Dimethenamid-P

10-6. 細菌を用いた復帰変異試験 (ラセミ体)

(資料 T-29a 参考 既提出 7-1a)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:

被験物質の純度:

方 法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* TA1537、TA1538、TA98、TA1535、TA100 を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝活性化系 S9mix の存在下及び非存在下で Ames らの方法に基づき標準プレート法で変異原性を検定した。

被験物質を溶解希釈するためジメチルスルホキシド(DMSO)を用いた。細胞毒性について予備試験を 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  を最高用量として 11 濃度を調製し、TA100 を用いて実施したところ、1000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上に菌の生育阻害が認められた。従って本試験は、薬物代謝活性化系 S9mix の存在下及び非存在下とも 0、10、33、100、333、500  $\mu\text{g}/\text{plate}$  で実施した。

結 果: 次頁の表に結果を示した。

被験物質は代謝活性化系の有無に拘らず復帰変異株コロニー数の用量相関を伴う統計学的に有意な増加を誘発せず陰性であった。この結果は独立した反復試験において確認された。

一方、陽性対照物質では明らかに陽性を示し、試験系は適切であった。

以上の結果より、本被験物質には突然変異誘発能はないと考えられた。

表 1. 試験結果

S9mix の有無	用量 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	復帰変異株のコロニー数(3 プレートの平均)									
		塩基対置換型				フレームシフト型					
		TA1535		TA100		TA1537		TA1538		TA98	
		試験 1	試験 2	試験 1	試験 2	試験 1	試験 2	試験 1	試験 2	試験 1	試験 2
-	ジメナムド <sup>a)</sup>										
	10	13	9	90	71	11	8	9	5	36	23
	33	11	10	100	77	11	7	11	10	32	23
	100	22 <sup>b)</sup>	7	100	75	9	8	9	8	35	32
	333	11	5	93	76	10	8 <sup>c)</sup>	10	9	34	32
	500	4	4	98	82	22 <sup>b)</sup>	10	10	13	35	28 <sup>b)</sup>
	溶媒対照 (DMSO)	13	7	102	85	11	8	8	7	47 <sup>c)</sup>	17
陽性対照 <sup>a)</sup>	364	330	1039	775	495	1282	1042	1163	1247	860	
+	ジメナムド <sup>a)</sup>										
	10	20	7	85	81	13	11	21	18	32	33
	33	10	7	81	86	8	6	17	20	38	34
	100	16	8	81	81	15	10	17	17	41	38
	333	19	6	92	85	11	7	18	19	41	35
	500	16	4	92	88	9	7	14	16	46	33
	溶媒対照 (DMSO)	10	8	105	91	6	10	16	16	35	32
陽性対照 <sup>a)</sup>	83	170	948	1787	44	71	421	1106	890	992	

a) : 陽性対照の種類を濃度は以下の表 2 に示す。

b) : バックグラウンドの僅かな減少。

c) : n=2, コンタミネーションのため。

表 2. 用いた陽性対照物質の種類と濃度

S9の 有無	使用変異株	陽性対照物質	使用濃度 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	溶媒
-S9	TA1535	Sodium azide (SA)	1	水
	TA 100	Methylmethanesulfonate (MMS)	0.5 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	DMSO
	TA 98 TA1538	4-nitro-O-phenylene- diamine (4NPD)	10	
	TA1537	9-aminoacridine (9AC)	60	水
+S9	TA1535 TA 100 TA 98 TA1538 TA1537	2-aminoanthracene (2AA)	0.5	DMSO

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。

Dimethenamid-P

#### 10-7. 細菌を用いた復帰変異試験

(資料 T-29b 参考 既提出 7-1b )

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 :

被験物質の純度 :

方 法: トリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、薬物代謝酵素系として市販のラット S9mix の存在下及び非存在下で Ames らの方法に基づきプレインキュベーション法で変異原性を検定した。

溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。

従って本試験は薬物代謝活性化系 S9mix 存在下、非存在下とも 0、39、78、156、313、625、1250  $\mu\text{g}/\text{Plate}$  で実施した。

結 果: 次頁の表 1 に結果を示した。

被験物質処理区では、代謝活性化系の有無にかかわらず、陰性対照と比較して 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加を認めず、用量反応性も認められなかった。

一方、陽性対照は溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーを出現させた。

以上の結果より、本被験物質は突然変異誘発能を有しないと判断する。

表 1. 試験結果

代謝活性化系の有無	用量 ( $\mu\text{g}/\text{p plate}$ )	復帰変異数(2 プレーートの平均)	
		塩基対置換型	
		WP2uvrA	
S9Mix (-)	溶媒対照 (DMSO)		25
	ジメナミド <sup>*</sup>	39	23
		78	25
		156	25
		313	17
		625	19
		1250	0*
	陽性対照 AF-2 <sup>#1</sup>	0.01	205
S9Mix (+)	溶媒対照 (DMSO)		25
	ジメナミド <sup>*</sup>	39	33
		78	30
		156	25
		313	36
		625	24
		1250	21*
	陽性対照 2AA <sup>#2</sup>	10.0	523

\*1: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

\*2: 2-Aminoanthracene

\*: 菌の生育阻害が認められたもの。



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。

Dimethenamid-P

10-8. 復帰変異原性試験(ラセミ体)

(資料 追 14 参考)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書年 :

被験物質の純度 :

方 法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* TA1537、TA1538、TA98、TA1535、TA100 を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝活性化系 S9mix の存在下及び非存在下で Ames らの方法に基づき標準プレート法で変異原性を検定した。被験物質を溶解希釈するためジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。

従って本試験では、以下の濃度を選択した。

S9mix 非存在下 ; 50、100、500、1000、2500、6500  $\mu\text{g}/\text{plate}$

S9mix 存在下 ; 100、500、1000、2500、5000、10000  $\mu\text{g}/\text{plate}$

結 果 : 次頁以降の表に結果を示した。

サルモネラ菌はいずれの株も復帰変異原コロニーの増加はみられず、溶媒対照と同等であった。陽性対照はいずれも溶媒対照に比べて有意に増加した。

以上の結果より、被験物質は本試験条件下で復帰変異原性を有しないと判断した。

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。

Dimethenamid-P

試験 1

S9mix の有無	用量 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	復帰変異株のコロニー数(3 プレーートの平均)				
		塩基対置換型		フレームシフト型		
		TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
-	溶媒対照 (DMSO)	8	106	6	4	15
	50	6	96	4	4	17
	100	8	102	5	8	15
	500	7	102	4	7	12
	1000	9	95	4	3	10
	2500 <sup>a)</sup>	7	83	2	3	13
	6500 <sup>b)</sup>	7	13	2	0	9
	陽性対照	SA ( $2.0\mu\text{g}/\text{plate}$ )	SA ( $2.0\mu\text{g}/\text{plate}$ )	ICR-191 ( $2.0\mu\text{g}/\text{plate}$ )	NF ( $1.0\mu\text{g}/\text{plate}$ )	NF ( $1.0\mu\text{g}/\text{plate}$ )
	554	596	95	218	132	
+	溶媒対照 (DMSO)	8	130	8	14	25
	100	10	143	8	15	25
	500	9	145	9	16	30
	1000	8	133	8	20	25
	2500 <sup>a)</sup>	6	146	10	11	31
	5000 <sup>a)</sup>	9	113	3	14	30
	10000 <sup>b)</sup>	6	18	4	4	23
	陽性対照	2AA ( $2.5\mu\text{g}/\text{plate}$ )	2AA ( $2.5\mu\text{g}/\text{plate}$ )	2AA ( $2.5\mu\text{g}/\text{plate}$ )	2AA ( $2.5\mu\text{g}/\text{plate}$ )	2AA ( $2.5\mu\text{g}/\text{plate}$ )
	129	897	134	1072	1017	

a) : 軽度の沈殿

b) : 中等度の沈殿及び軽度のバクテリアコロニーの減少

DMSO : ジメチルスルホキシド

SA : アジ化ナトリウム

NF : 2-ニトロフルオレン

2AAA : 2-アミノアントラセン

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

Dimethenamid-P

試験 2

S9mix の有無	用量 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	復帰変異株のコロニー数(3 プレーットの平均)				
		塩基対置換型		フレームシフト型		
		TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
-	溶媒対照 (DMSO)	13	94	5	6	56
	50	11	93	5	4	56
	100	13	87	4	3	47
	500	9	90	2	4	49
	1000 <sup>a)</sup>	9	86	4	5	58
	2500 <sup>a)</sup>	12	54	3	4	33
	6500 <sup>b)</sup>	3	0	0	0	11
	陽性対照 <sup>b)</sup>	SA (2.0 $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	SA (2.0 $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	ICR-191 (2.0 $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	NF (1.0 $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	NF (1.0 $\mu\text{g}/\text{plate}$ )
	543	622	160	227	161	
+	溶媒対照 (DMSO)	12	142	7	14	65
	100	18	134	7	12	70
	500	13	120	5	15	79
	1000	14	135	6	12	69
	2500	12	102	4	11	61
	5000 <sup>a)</sup>	11	57	5	10	46
	10000 <sup>b)</sup>	7	0	1	3	41
	陽性対照	2AA (2.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	2AA (2.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	2AA (2.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	2AA (2.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	2AA (2.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ )
	209	1126	161	1196	1081	

<sup>a)</sup> : 軽度の沈殿

<sup>b)</sup> : 中等度の沈殿及び軽度のバクテリアコロニーの減少

DMSO : ジメチルスルホキシド

SA : アジ化ナトリウム

NF : 2-ニトロフルオレン

2AAA : 2-アミノアントラセン

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

Dimethenamid-P

10-9. チャイニーズハムスター卵巣由来の培養細胞 (CHO) を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (P 体)

(資料 T-30)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

被験物質の純度：

試験方法：チャイニーズハムスター卵巣由来の CHO 細胞を用いて、代謝活性化系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で染色体異常誘発性を検索した。被験物質は DMSO に溶解して用いた。試験は各濃度あたり 2 反復で行った。

染色体異常検査用細胞の培養：CHO 細胞を播種し 16~24 時間培養後、これに被験物質を添加した完全培地を加えて処理した。

### 染色体異常試験（本試験）

S9 mix の非存在下では細胞を採取するまで被験物質に約 20 時間暴露した。細胞の採取 2 時間前に、コルセミド(0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を添加して細胞分裂を停止させた。

S9 mix の存在下では細胞を 4 時間処理した後、処理培地を除いて、細胞を Ca-Mg-フリーリン酸緩衝液(CMF-PBS)で洗浄して、被験物質無添加の完全培地と交換し、さらに 16 時間培養した。細胞の採取 2 時間前に、コルセミド(0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を添加して細胞分裂を停止させた。

試験濃度： S9 Mix 非存在下 — 2、4、8、15、30、60、120  $\mu\text{g}/\text{mL}$

S9 Mix 存在下 — 8、16、32、63、125、250、500  $\mu\text{g}/\text{mL}$

標本の作製：コルセミドを添加 2 時間後、トリプシン処理し、遠心分離して分裂中期細胞のペレットを得た。これに 0.075M 塩化カリウム溶液を添加して膨潤させた後、遠沈して、細胞ペレットを得た後、固定(メタノール：氷酢酸=3:1)した。この固定細胞を遠沈して得た細胞ペレットに、再度固定液を添加して再懸濁、遠沈を繰り返して得た細胞懸濁液をスライド 1 枚に広げ、乾燥/染色して検査用標本作製した。

中期細胞の評価：500 細胞あたりの有糸分裂細胞の割合(分裂指数)を各処理区について求め、十分な中期細胞数があるか確認した。

染色体異常の評価：20 $\pm$ 2 動原体を有する中期分裂細胞について、各処理区当り良く拵がった染色体を少なくとも 200 個(100 個/スライド)について分析し、染色体異常を有する細胞数及び染色体異常の数を算出した。

構造異常：染色分体型及び染色体型について、ギャップ、切断、交換、断片、細粉化等に分類し計数した。

染色体異常を有する細胞数(ギャップを除く)について、溶媒対照と被験物質処理区間の比較は Fisher 直接確率検定で行った。

陽性対照として、S9 mix の非存在下ではマイトマイシン C (MMC)を 0.08  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で、S9 mix の存在下ではシクロホスファミド(CP)を 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で用いた。又、溶媒対照区を設け、同様に試験した。

### 試験結果：

#### 染色体異常試験(表 2 及び 3)

S9 Mix の非存在下において、120  $\mu\text{g}/\text{mL}$  区で溶媒処理区に比し細胞増殖阻害率は 39%で、分裂阻害指数は 83%であった。15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の処理区について染色体異常出現頻度を観察した結果、60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で有意な増加がみられたが、この出現頻度は背景データ(範囲：0.0~6.0%；平均 1.3%)の範囲内にあることから、生物学的意義はないものと考えられた。

S9 Mix の存在下において、500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  区で溶媒処理区に比し細胞増殖阻害率は 51%で、分裂阻害指数は 94%であった。63  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の処理区について染色体異常出現頻度を観察した結果、有意な増加はみられなかった。

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。

Dimethenamid-P

陽性対照物質であるマイトマイシン C (MMC) 及びシクロホスファミド (CP) では、明らかな染色体異常出現頻度の増加がみられた。

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

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。

Dimethenamid-P

表1 予備細胞毒性試験結果一

表 2 細胞毒性試験結果

薬物	濃度 <sup>1</sup> ( $\mu$ g/mL)	S9 Mix の 有無	細胞数 ( $\times 10^6$ )	細胞生存 率 <sup>2</sup> (%)	フラスコ当り生 存細胞数 <sup>3</sup> ( $\times 10^6$ )	細胞増殖指 数 <sup>4</sup> (%)	細胞抑制率 <sup>5</sup> (%)
無処理		-	1.76	94.5	1.66	-	-
DMSO		-	1.85	96.5	1.78	100	0
被験物質	2	-	1.78	95.0	1.69	95	5
	4	-	1.93	97.0	1.87	105	-5
	8	-	2.02	99.0	2.00	112	-12
	15	-	2.05	99.5	2.04	114	-14
	30	-	2.03	98.0	1.99	112	-12
	60	-	1.76	99.0	1.74	98	2
	120	-	1.17	93.0	1.08	61	39
MMC	0.08	-	1.70	98.0	1.66	100	-0
無処理		+	1.40	95.5	1.34	-	-
DMSO		+	1.63	96.0	1.56	100	0
被験物質	8	+	1.56	98.5	1.54	99	1
	16	+	1.55	98.5	1.53	98	2
	32	+	1.55	97.5	1.51	97	3
	63	+	1.37	97.0	1.33	85	15
	125	+	1.31	97.0	1.27	81	19
	250	+	1.24	97.5	1.21	77	23
	500	+	0.79	96.5	0.76	49	51
CP	10	+	1.21	97.0	1.17	88	12

<sup>1</sup> CHO 細胞は S9 mix の非存在下では 20 時間、存在下では 4 時間各濃度に処理した。

<sup>2</sup> トリパン青染色除外法で求めた。

<sup>3</sup> フラスコ当り生存細胞数 = 細胞数  $\times$  細胞生存率%

<sup>4</sup> 細胞増殖指数% = (処理区のフラスコ当り細胞数 / 対照区 DMSO のフラスコ当り細胞数)  $\times$  100

<sup>5</sup> 細胞抑制率 = 100% - 細胞増殖指数%



表3 染色体異常試験結果

薬物	濃度 <sup>1</sup> ( $\mu$ g/mL)	S9 Mix の有無	有糸 分裂 指数	観察 細胞 数	染色体異常 細胞率 <sup>2</sup>		構造異常の総数						重度損 傷細胞 <sup>5</sup>	平均染色体 異常数 <sup>6</sup>	
					%	平均	染色分体型 <sup>3</sup>			染色体型 <sup>4</sup>				細胞当り	平均
							gap	br	ex	br	dic	環状			
無処理		-	5.4	100	0	0.0	1	0	0	0	0	0	0	0.000	0.000
		-	4.6	100	0		2	0	0	0	0	0	0	0.000	
DMSO		-	5.6	100	0	0.0	1	0	0	0	0	0	0	0.000	0.000
		-	6.4	100	0		4	0	0	0	0	0	0	0.000	
被験物質	15	-	6.0	100	0	0.0	3	0	0	0	0	0	0	0.000	0.000
		-	6.6	100	0		3	0	0	0	0	0	0	0.000	
	30	-	5.0	100	0	0.0	3	0	0	0	0	0	0	0.000	0.000
		-	5.2	100	0		2	0	0	0	0	0	0	0.000	
	60	-	2.6	100	3	2.5*	3	3	0	0	0	0	0	0.030	0.025
		-	3.8	100	2		3	2	0	0	0	0	0	0.020	
120	-	0.8	100	1	1.5	4	1	0	0	0	0	0	0.010	0.015	
	-	1.2	100	2		4	2	0	0	0	0	0	0.020		
MMC	0.08	-	4.6	100	17	15.5**	5	15	3	1	0	0	0	0.190	0.185
		-	4.0	100	14		5	13	2	3	0	0	0	0.180	
無処理		+	5.6	100	0	0.5	2	0	0	0	0	0	0	0.000	0.005
		+	4.8	100	1		0	1	0	0	0	0	0	0.010	
DMSO		+	5.8	100	1	0.5	1	1	0	0	0	0	0	0.010	0.005
		+	7.2	100	0		0	0	0	0	0	0	0	0.000	
被験物質	63	+	7.8	100	0	0.5	3	0	0	0	0	0	0	0.000	0.005
		+	5.2	100	1		2	0	1	0	0	0	0	0.010	
	125	+	3.0	82	2	1.1	0	0	1	1	0	0	0	0.024	0.011
		+	3.0	100	0		3	0	0	0	0	0	0	0.000	
	250	+	2.4	100	4	2.5	4	1	3	0	0	0	0	0.040	0.025
		+	2.4	60	1		1	0	0	0	0	0	0	0.000	
500	+	0.6	93	3	3.2	3	3	0	0	0	0	0	0.032	0.032	
	+	0.2	2	0		0	0	0	0	0	0	0	0.000		
CP	10	+	2.6	100	17	16.5**	1	13	3	3	0	0	1	0.290	0.235
		+	4.0	100	16		3	11	5	2	0	0	0	0.180	

DMSO : ジメチルスルホキシド

MMC : マイトマイシンC

CP : シクロホスファミド

gap : ギャップ

br : 切断

ex : 交換

dic : ニ動原体

統計学的方法 : Fisher 直接確立検定 \* :  $p \leq 0.05$ , \*\* :  $p \leq 0.01$

<sup>1</sup> CHO 細胞は S9 mix の非存在下では 20 時間、存在下では 4 時間各濃度に処理した。

<sup>2</sup> ギャップのみを有する細胞を除いた。

<sup>3</sup> 染色分体型切断 (br) には染色分体及び同位染色分体の切断及び断片、染色分体交換には四放射状、三放射状及び複雑な交換を含む

<sup>4</sup> 染色体切断 (br) には切断及び無動原体断片を含む。

<sup>5</sup> 重度損傷細胞は 1 つ以上の細粉化染色体異常及び 10 個以上の染色体異常を有する細胞を含む。

<sup>6</sup> 重度損傷細胞及び細粉化細胞は染色体異常 10 個として計数した。

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。

Dimethenamid-P

10-10. チャイニーズハムスターの卵巣細胞を用いた *in vitro* 細胞遺伝学的試験 (ラセミ体)

(資料 T-31 参考 既提出 7-2)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 :

被験物質の純度 :

方 法: チャイニーズハムスターの継代培養した卵巣 (CHO) 細胞を用いた。CHO 細胞は 10%牛胎仔血清 (FCS)、L-グルタミン及び抗生物質を添加した McCoy's5a 培地で増殖させた。溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用い、代謝活性化系には S9 反応液を用いた。

用量設定試験 :

染色体異常試験 : 各用量当り 2 連で実施し、陽性対照を 2 群、陰性対照及び溶媒対照をそれぞれ 1 群設けた。

非代謝活性化系では被験物質で 17 時間処理した後に細胞を洗浄し、新しい培養液でコルセミドを添加して 3 時間培養し中期分裂細胞を取り出し、固定液で洗浄後スライド標本を作成した。

代謝活性化系では S9 反応液存在下で被験物質と FCS 無添加培地で 2 時間培養した。その後、緩衝食塩水で細胞を洗浄し、10%FCS 添加の正常培地で 8 時間、最後の 3 時間はコルセミド添加で培養した。中期細胞を取り出し同様に固定した。

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。

Dimethenamid-P

スライド標本はギムザ染色をし、それぞれの標本について 100 個の細胞を観察して染色体異常発生頻度を調べた。陽性対照については 25-50 個の細胞を計測した。陽性対照以外はブラインドで行った。

実験の結果は、高用量での毒性等を考慮して、非代謝活性化系では 10~100  $\mu\text{g/mL}$ 、代謝活性化系では 150~400  $\mu\text{g/mL}$  の用量で解析した。

異常を有する細胞の出現頻度は無処理対照との比較においては有意水準 5%で有意なもの、また、背景レベル 1~5%より大きいものを陽性とみなした。

結果：次頁の表 1 に結果を示した。

各濃度の被験物質処理区では、染色体異常の発現頻度において対照と比べて有意な上昇はなく、また、5%を超えるものはなかった。

一方、陽性対照として用いたマイトマイシン C 及びシクロホスファミドでは顕著な染色体異常の増加が認められた。

以上の結果から、ジメテナミド原体の CHO 細胞における染色体異常誘発性は陰性であると判断された。

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。

Dimethenamid-P

表 1. CHO 細胞における染色体異常結果

代謝活性化の有無	薬物及び濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	観察細胞数	型別染色体異常数								細胞当りの異常数	異常がみられた細胞の率 (%)	異常が1よりも大きい細胞の率 (%)		
			染色分体型			染色体型				その他					
			TB	TR	OR	SB	AF	D	R						
-S9	無処理対照及び溶媒対照	200	2									0.01	1.0	0.0	
	マトマイシシC	0.5	25	21	5	1	1	4				1.28	80.0*	28.0	
	ジメナムド	10	200	1								0.005	0.5	0.0	
		25	200					1				0.005	0.5	0.0	
		50	200	3						1		DM6	0.050	2.0	1.0
		75	200	2						2	2		0.030	2.5	0.5
100	170	14			1						0.090	4.1	1.2		
+S9	無処理対照及び溶媒対照	200	3									0.015	1.5	0.0	
	シクロホスファミド	50	25	7	2	3					ID1	0.52	36.0*	12.0	
	ジメナムド	150	200	4									0.020	2.0	0.0
		200	200	8									0.040	4.0	0.0
		300	200	6									0.030	2.5	0.5
		400	200	11									0.055	4.5	1.0

\*: 無処理対照及び溶媒対照に対する有意差検定、 $P < 0.05$

TB 染色分体切断

TR 三放射状染色分体交換

OR 四放射状染色分体交換

SB 染色分体切断

AF 染色分体断片

D 二動原体染色体

R 環状染色体

DM 微小断片

ID 中間部欠失

10-11. マウスの骨髄細胞を用いた小核試験 (P 体)

(資料 T-32)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 :

被験物質の純度 :

供試動物 : Sprague Dawley 系 ICR マウス、1 群雌雄各 15 匹 (陽性対照群は雌雄各 5 匹)

試験開始時 6~8 週齢、体重 雄 30.7~37.0g、雌 26.4~31.1g

方法 : 被験物質 103、205 及び 410mg/kg の用量をコーン油に溶解して、その 20mL/kg を腹腔内に単回投与し、死亡の有無及び一般状態を観察した。投与容量は投与直前の体重に基づき算出した。

被験物質投与群及び溶媒対照群の雌雄各 5 匹を投与後 24、48 及び 72 時間に、陽性対照 (シクロホスファミド) 群の動物は投与 24 時間後に屠殺して、各動物の両大腿骨から骨髄塗抹標本をマウス当り 2~4 枚作製し、ギムザ液で染色した。

群の構成は以下のように行った。

薬物	投与量 (mg/kg)	動物数 (雌雄各)	骨髄採取時期 (投与後時間)		
			24	48	72
溶媒対照	-	15	5	5	5
被験物質	103	15	5	5	5
	205	15	5	5	5
	410	20*	5	5	5
陽性対照	60	5	5	-	-

\* : 予備用の余剰動物 5 匹からは骨髄採取をしなかった。

動物ごとに多染性赤血球 1000 個当り小核を有する赤血球数を計数した。また、多染性赤血球 1000 個の視野中の小核を有する正染性赤血球数も計数した。

多染性赤血球数の総赤血球に対する比は赤血球 1000 個を検査して求めた。

投与量設定根拠 :

結 果 :

一般症状及び生死 : いずれの群も死亡は認められなかった。

205mg/kg 群では活動亢進及び攻撃性が供試全例に、又、嗜眠が雄 7/15 例及び雌 4/15 例に認められた。410mg/kg 群では活動亢進、攻撃性及び嗜眠が全例に認められた。その他の群では全て正常であった。

小核の出現頻度：結果を表1に示した。

被験物質投与群は3層殺時期のいずれにおいても小核を有する多染性赤血球の出現頻度に統計学的有意な増加を認めなかった(P>0.05)。シクロホスファミドでは、小核を有する多染性赤血球数に統計学的有意な増加を認めた。

また、被験物質投与群及び陽性対照群とも、総赤血球数に対する多染性赤血球数の比率に有意な増加は認められなかった(P>0.05)。

以上の結果から、被験物質は本試験条件下でマウス骨髄細胞に対する変異原性あるいは骨髄細胞毒性は認められないと判断される。

表1. 小核を有する多染性赤血球の出現頻度(各群雌雄各5匹を検査)

採取時間	薬剤	投与量 (mg/kg)	性別	PCE/RBC <sup>1</sup>		小核を有する PCE 数/1000PCE <sup>2</sup>
				平均	対照群との差%	
24	対照 コーンオイル	20mL	雄	0.50±0.14	--	1.2±0.45
			雌	0.63±0.02	--	0.6±0.55
	被験物質	103	雄	0.53±0.16	6	1.8±1.30
			雌	0.60±0.03	-5	1.2±0.84
		205	雄	0.56±0.12	12	1.4±0.89
			雌	0.67±0.09	6	1.6±0.89
	410	雄	0.64±0.08	28	1.0±0.71	
		雌	0.60±0.07	-5	1.2±0.84	
	シクロホスファミド <sup>*</sup>	60	雄	0.51±0.04	2	29.4±12.10*
			雌	0.58±0.05	18	31.6±7.70*
48	対照 コーンオイル	20mL	雄	0.56±0.14	--	1.2±1.64
			雌	0.61±0.05	--	1.0±1.22
	被験物質	103	雄	0.46±0.15	-18	0.0±0.0
			雌	0.60±0.05	12	1.8±1.30
		205	雄	0.53±0.13	15	0.6±0.55
			雌	0.65±0.04	7	1.2±1.30
	410	雄	0.65±0.06	16	1.2±0.84	
		雌	0.62±0.06	2	1.4±1.14	
72	対照 コーンオイル	20mL	雄	0.57±0.13	--	0.4±0.55
			雌	0.57±0.05	--	1.2±1.30
	被験物質	103	雄	0.56±0.13	-2	0.8±0.84
			雌	0.61±0.05	7	1.0±1.22
		205	雄	0.51±0.07	-11	1.6±1.52
			雌	0.57±0.04	0	1.2±0.84
	410	雄	0.57±0.04	0	1.0±1.00	
		雌	0.57±0.05	0	1.2±1.64	

<sup>1</sup> PCE/T. RBS=多染性赤血球数/総赤血球数(5例の平均値)

<sup>2</sup> 多染性赤血球1000個あたりの小核を有する多染性赤血球数(5例の平均値)

統計学的方法：Kastenbaum-Bowman表 \*：p≤0.05

## 10-12. マウスを用いた小核試験 (P 体)

(資料 追 32)

試験機関 :

報告書作成年 :

被験物質純度 :

供試動物 : CrI:NMRI 系マウス (8~11 週齢、平均体重 35.4 g)

雄 43 匹 (投与群 : 各 7 匹、陰性及び陽性対照群 : 各 5 匹)

試験方法 : 被験物質をコーン油に懸濁し、125、250 及び 500 mg/kg 体重の投与量で、強制的に 1 回経口投与した。なお、陰性対照群にはコーン油、陽性対照群にはシクロホスファミドを同様に投与した。

陰性対照群及び被験物質投与群は投与 24 及び 48 時間後、陽性対照群は 24 時間後に動物を屠殺し、各動物から大腿骨の骨髓を採取してスライドガラスに塗抹、風乾後メイグリンワルドギムザ染色を行って骨髓標本を作製した。

各標本について、細胞毒性を調べるために 1 個体当たり赤血球 2000 個中の多染性赤血球数及び正染性赤血球数を計数後、2000 個の多染性赤血球数を観察し、小核を有する多染性赤血球数を計数した。

用量設定根拠 :

結果 : 骨髓標本の観察結果を次頁表に示した。

すべての被験物質投与群動物に、被毛の乱れ、自発運動の低下、腹臥位、閉眼、円背位、白色流涙、流涎、興奮、充血が認められ、500 mg/kg 群には呼吸促迫もみられたが、24 時間以内に消失した。

陰性対照群と比較して多染性赤血球数の減少が認められなかったことから、被験物質は骨髓に対して細胞毒性を有さないことを示した。投与 24 及び 48 時間後いずれの標本採取時間にも、小核を有する多染性赤血球数の出現頻度は陰性対照群より低値であり、増加は認められなかった。

陽性対照であるシクロホスファミドでは、小核を有する多染性赤血球数の出現頻度に、陰性対照群と比較して有意な増加が認められた。

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

Dimethenamid-P

### 観察結果

採取時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg 体重)	性別	観察 動物数	MNPCE (%)	赤血球 2000 個 当たりの PCE 数
24	陰性対照 (コーン油)	0	雄	5	0.190	1250
	被験物質	125	雄	7	0.171	1229
		250	雄	7	0.186	1277
		500	雄	7	0.171	1219
	陽性対照 (CPA)	40	雄	5	2.250 ↑	1186
48	陰性対照 (コーン油)	0	雄	5	0.110	1194
	被験物質	500	雄	7	0.093	1187

Non-parametric Mann-Whitney 検定 ↑ :  $p < 0.05$

CPA : シクロホスファミド

PCE : 多染性赤血球数

MNPCE : 多染性赤血球 2000 個の内、小核を有する赤血球数

結論 : 以上の結果から本試験条件下において、被験物質はマウスの骨髄多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体構造異常は陰性と判断された。



10-13. マウス骨髄における小核試験 (ラセミ体)

(資料 T-33 参考 既提出 7-4)

試験実施機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 :

被験物質純度 :

供試動物 : CD-1 マウス雌雄、1 群雌雄各 5 匹

投与時 35~42 日齢、体重 雄 ; 23~29 g、雌 ; 22~25 g

方 法 : 被験物質を 35.50 mg/mL 濃度となるようコーン油に溶解し、マウスに 710 mg/kg を 2 日間に渡り強制経口投与した。陰性対照としてコーン油のみを同様に投与した。両群とも投与 24 または 48 時間後に屠殺した。

陽性対照として、シクロホスファミド (CPA) は精製生理食塩水に溶解し、80 mg/kg を単回強制経口投与し、24 時間後に屠殺した。

屠殺直後、両大腿骨からして骨髄細胞を採取してマウス 1 匹当たり 2 枚の塗抹標本を作成し、無水メタノール中で固定して風乾後、ギムザ染色してスライドを作成した。

全ての動物について 1 動物当り多染性赤血球 (PCE) 及び正染色性赤血球 (NCE) を合計少なくとも 1000 個になるまで検査し、その比率を求めた。続いて 2000 個の PCE を調べ、いずれの検査でも小核を有する PCE を計測した。

各動物について PCE/NCE 比を求め、群平均値を算出した。PCE1000 個あたりの小核を有する PCE の出現頻度を個体別及び群平均を求めた。陰性対照及び投与群については屠殺時間ごとに群内の個体変動を Heterogeneity  $\chi^2$  テストで解析した。群平均値は、溶媒対照群に対する投与群及び陽性対照群の変化を  $2 \times 2$  Contingency  $\chi^2$  で有意差を調べた。また、用量相関性及び背景対照データとの比較も行った。

用量設定根拠 :


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。

Dimethenamid-P

**結 果：** 多染性赤血球 1000 個中に認められる小核を有する赤血球は、ジメテナミド投与群の雌雄別及び雌雄合計の群平均値を溶媒対照群と比した場合、24 及び 48 時間ともに有意な変化は認められなかった。一方陽性対照 (CPA) 投与群では、有意な増加が認められた (24 時間)。

溶媒対照群及びジメテナミド投与群の不均一性についてはいずれも有意でなく、試験の妥当性が確認された。

雌雄別に統計処理をした場合も被験物質投与群に有意差はなかった。

溶媒対照の値は歴史的背景対照データの範囲内であった。

以下に雌雄合計の結果の表を示す。

試料採取 時間 (hr)	性別 (例数)	投与量 (mg/kg)	PCE/NCE 比 (1000 個中)	小核を有する PCE の割合 (%) (1000 個中)
		平均±SD <sup>1)</sup>	平均±SD <sup>1)</sup>	平均±SD <sup>1)</sup>
24 時間後	雄 (5)	溶媒対照 (0)	0.98±0.14	0.60±0.37
		ジメテナミド* (710)	1.16±0.37	0.50±0.32
		陽性対照 (80)	0.59±0.06	19.46±4.31 <sup>2)</sup>
	雌 (5)	溶媒対照 (0)	1.06±0.28	0.20±0.40
		ジメテナミド* (710)	1.15±0.62	0.60±0.37
		陽性対照 (80)	0.52±0.11	23.43±3.38 <sup>2)</sup>
	雌雄 (10)	溶媒対照 (0)	1.01±0.22	0.40±0.39
		ジメテナミド* (710)	1.16±0.51	0.55±0.35
		陽性対照 (80)	0.56±0.09	21.44±3.87 ↑
48 時間後	雄 (5)	溶媒対照 (0)	1.31±0.35	0.80±0.40
		ジメテナミド* (710)	0.73±0.35	0.30±0.24
	雌 (5)	溶媒対照 (0)	0.93±0.07	0.50±0.32
		ジメテナミド* (710)	1.31±0.29	0.40±0.58
	雌雄 (10)	溶媒対照 (0)	1.12±0.25	0.65±0.36
		ジメテナミド* (710)	1.02±0.32	0.35±0.45

PCE: 多染性赤血球, NCE: 正染性赤血球

統計計算: 2x2 分割  $\chi^2$  テスト ↑:  $p \leq 0.001$

<sup>1)</sup>: 標準偏差 (SD) は個体別値より申請者が計算した。

<sup>2)</sup>: 雌雄別の統計処理結果については報告書に記載がない。

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。

Dimethenamid-P

蓄積対照データ (1992 年 10 月, 26 試験、雄 252 匹、雌 223 匹)

試料採取 時間 (hr)	性別 (例数)	PCE/NCE 比 (1000 個中)	小核を有する PCE の割合 (%) (1000 個中)
		平均 (範囲)	平均 (範囲)
24 及び 32 時 間合算	雄	1.06 (0.67-1.83)	0.51 (0-1.29)
	雌	1.08 (0.70-1.45)	0.47 (0-1.10)

結 論： 以上より、本試験条件下において被験物質はマウス骨髄に小核を誘発しないと判断した。

10-14. マウス骨髄細胞を用いた小核試験 (ラセミ体)

(資料 追 15 参考)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書年:

被験物質の純度:

供試動物: NMR1 マウス 1 群雌雄各 5 匹

開始時 2.5-4 ヶ月齢、体重記載なし

方法: 被験物質をジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、1000mg/kg を単回強制経口投与し、24、48 及び 72 時間後に屠殺して大腿骨を採取した。投与容量は 5mL/kg とした。ウシ胎児血清で大腿骨の骨髄を洗い出し、骨髄細胞の懸濁液を遠心分離(1000rpm、5 分)してペレットを少量再懸濁してスライドに塗抹した。スライドを風乾後メイグリュンワルド・ギムザ染色し、鏡検で 1 動物当り多染性赤血球(PCE)1000 個を計測し、小核を有する赤血球を計測した。1 動物につき標本 3 つ作成した。  
溶媒対照(DMSO)及び陽性対照(シクロホスファミド; CP, 30mg/kg、腹腔内投与)を設けた。

用量設定根拠:

結果: 結果を以下の表に記載する。

陽性対照は小核を有する多染性赤血球が増加した。

被験物質 1000mg/kg においても小核を有する多染性赤血球は溶媒対照と同等であった。

以上、被験物質はマウスの骨髄に変異原性を有しないと結論する。

時間	薬品名 (経路)	投与量 (mg/kg)	動物数 (雌雄合)	雌雄 (合算)			
				小核を有する PCE/2000 個 PCE (%)	範囲	PCE	NCE
24	溶媒対照 [DMSO] (po)	0	10	0.06	0-2	1000	577
	被験物質 (po)	1000	10	0.04	0-1	1000	432
	陽性対照 [CP] (ip)	30	10	0.45	0-8	1000	413
48	溶媒対照 [DMSO] (po)	0	10	0.11	0-3	1000	673
	被験物質 (po)	1000	10	0.15	0-4	1000	701
72	溶媒対照 [DMSO] (po)	0	10	0.10	0-4	1000	547
	被験物質 (po)	1000	10	0.03	0-1	1000	563

PCE: 多染性赤血球、NCE: 正染性赤血球

CP: シクロホスファミド 30mg/kg、DMSO: ジメチルスルホキシド

10-15. チャイニーズ・ハムスターCHO 細胞を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験  
(HGPRT 前進突然変異試験) (P 体)

(資料 T-34)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:

被験物質の純度:

試験方法: チャイニーズハムスターCHO-K<sub>1</sub>-BH<sub>4</sub>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 (HGPRT) 遺伝子座における *in vitro* 突然変異誘発性試験を代謝活性化系 (S-9 mix) の存在下及び非存在下で行なった。溶媒として DMSO を用いた。

処理濃度: 用量設定試験で設定した範囲の濃度で 1 回目の試験を行ったが、過度の汚染のために失敗したので、2 回目の実験を以下の濃度で行った。

S-9 mix 非存在下: 100、200、300、350 及び 400  $\mu$ g/mL

S-9 mix 存在下: 100、200、300、400 及び 450  $\mu$ g/mL

自然 HGPRT 欠損突然変異体を除いた細胞を F12FBS5-Hx 培地に播種し ( $5 \times 10^5$  個/フラスコ) 18~24 時間培養した。この細胞に代謝活性化系の非存在下及び存在下で、被験物質を添加した F12FBS5-Hx 培地を添加して 5 時間、被験物質処理を行った。処理終了後、細胞を Ca-Mg-フリー-Hank' s 平衡塩溶液で洗浄し、さらに 18~24 時間培養した。この細胞を F12FBS5-Hx 培地中で継代培養した。

細胞毒性の評価用には 100 細胞をシャーレに 3 反復で播種して、7~10 日間培養した後、コロニーを Hank' s 平衡塩溶液で洗浄し、メタノールで固定、ギムザで染色して、計数し、細胞毒性 (コロニー形成率) を調べた。

突然変異体の表現型の評価用には  $10^6$  以下の細胞をシャーレに 2 反復で播種して、7~9 日間の発現期間中 2~3 日ごとに、継代培養した。発現期間の終了後、この細胞を  $2 \times 10^5$  細胞をシャーレに 5 反復で、 $10 \mu$ M 6-チオグアニン (TG) 含有 F12FBS5-Hx 培地に播種して突然変異体を選択した。又、突然変異体を選択時のコロニー形成率の調査用にはシャーレ当り 100 細胞を 3 反復で播種して培養した。7~10 日間培養後、コロニーを固定、染色して、計数し、コロニー形成率及び突然変異体数を調べた。

陰性 (DMSO) 対照及び陽性対照 [S-9 mix の非存在下ではエチルメタンスルホネート (EMS)  $0.2 \mu$ L/mL、S-9 mix の存在下ではベンゾ (a) ピレン [B(a)P]  $4 \mu$ g/mL も同様に試験した。

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。

Dimethenamid-P

評価基準：溶媒対照区のコロニー形成率は 50%以上であり、自然発生変異体数は  $10^6$  コロニー当り 0~25 個であること。陽性対照区は少なくとも溶媒対照区の 3 倍以上であり、 $10^6$  コロニー当り変異体数 40 個以上であること。

用量設定根拠：

試験結果： 結果を次頁の表に示した。

被験物質処理区の変異体数は  $10^6$  コロニー当り代謝活性化系の非存在下で 0.6~16.6 個、存在下で 1.4~13.9 個であり、陽性の判定基準である 40 個を越えることはなかった。陽性対照の EMS 及び BaP は明らかな変異体数の増加を認めた。

細胞毒性(コロニー形成率が溶媒対照区の<50%を示す)は代謝活性化系の非存在下で 350  $\mu$ g/mL、存在下で 400  $\mu$ g/mL 以上でみられた。

以上の結果から、本試験条件下における前進突然変異試験において、被験物質は代謝活性化系の有無に係らず突然変異誘発性を有しないと判断される。

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。

Dimethenamid-P

薬物	用量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	S-9 mix の 有無	コロニー形成率 <sup>1</sup>		突然変異体選 択時のコロニー形 成率(%)	平均突然変 異体数/ プレート	変異頻度 <sup>2</sup> ( $10^5$ コロニー-当り)
			クローニング <sup>*</sup> 効率	相対クローニング <sup>*</sup> 効率%			
陰性対照 (DMSO)		-	0.94	100	0.86	18	10.5
被験物質	100	-	0.90	96	0.77	15	12.3
	200	-	0.86	91	0.97	32	16.6
	300	-	0.62	66	0.92	14	8.5
	350		0.38	41	0.79	1	0.6
	400 <sup>3</sup>	-	0.63	67	0.89	13	7.3
陽性対照 (EMS)	0.2	-	0.57	61	0.83	334	202.4
陰性対照 (DMSO)		+	0.89	100	0.95	10	5.2
被験物質	100	+	0.53	60	0.93	13	7.7
	200	+	0.56	63	0.80	20	13.9
	300	+	0.47	53	0.69	16	12.9
	400 <sup>3</sup>	+	0.29	33	0.76	16	10.6
	450 <sup>3</sup>	+	0.20	22	0.71	2	1.4
陽性対照 (BaP)	0.2	+	0.41	46	0.85	256	150.6

<sup>1</sup>コロニー形成率=計測総コロニー数/反復シャーレ数(3) x シャーレ当り 100 細胞

<sup>2</sup>変異頻度=(総突然変異体コロニー数/選択シャーレ数 x コロニー形成率 x  $2 \times 10^5$ ) x  $10^6$

<sup>3</sup>培地は濁っていたが、肉眼的に沈殿は認められなかった。

10-16. チャイニーズハムスターV79 細胞(HGPRT)を用いた *in vitro* 前進突然変異試験(ラセミ体)  
(資料 追16 参考)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書年:

被験物質の純度:

方 法: チャイニーズハムスターV79 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* 前進突然変異誘発性試験を代謝活性化系 (S-9 mix) の存在下及び非存在下で行なった。溶媒としてエタノールを用いた。

用量設定根拠:

変異原

性試験には以下の濃度を選択した。

被験物質処理区 (S-9 mix 非存在下) 33、100、180、333  $\mu$ g/mL

被験物質処理区 (S-9 mix 存在下) 33、100、180、333  $\mu$ g/mL

自然 HPGRT 欠損突然変異体を除いた細胞を播種し ( $6 \times 10^6$  個/フラスコ)、S-9mix 非存在下及び存在下で、血清を含む培地中で 2 時間被験物質処理を行った。被験物質処理時間は長時間暴露での S-9mix の毒性により選択した。暴露後、細胞を HBSS で 2 回洗浄し、計測して変異体の表現型をみるため F-10 培地に播種した。さらに 2~3 日おきに継代培養して Log phase 成長を保持した。6-TG 耐性の発現時間は 7 日間であった。 $10^6$  個細胞を選択培地に接種して HPRT 欠損変異体のコロニーを 7~10 日間かけて形成させた。メタノールで固定後、1%メチレンブルーで染色してコロニーを計算した。

暴露直後に各濃度から  $3 \times 200$  細胞を採取し、クローニング培地の入った P90 ペトリ皿接種して細胞の生存性 (クローニング効率) を調べた。

陽性対照として S-9 mix の非存在下ではエチルメタンサルホネート (EMS) 6mM 及び S-9 mix の存在下ではジメチルニトロソアミン (DMN) 4 または 8  $\mu$ M を選択し、溶媒対照とともに被験物質同様試験した。

試験の基準:

以下の基準を満たす場合は試験が成立とする。

- a) 個々のクローニング効率が対照群の  $\geq 60\%$  である場合。
- b) 4 用量のうち少なくとも 3 用量において HPRT 座変異の細胞が  $10^6$  個生存している場合。
- c) 溶媒対照における自然発生的変異が  $10^5$  個生存細胞中  $< 3$  である場合。
- d) 陽性対照の変異発生が有意 (少なくとも 3 倍) である場合。



以下の基準を満たす場合は陽性であると判断する。

- a) 溶媒対照における自然発生的変異の少なくとも 3 倍の発生を誘発する場合。
- b) 結果に用量関連性があり、再現性がある場合。

以下の基準を満たす場合は陰性であると判断する。

- a) 溶媒対照に対し少なくとも 3 倍の変異発現率を示す用量がない場合。
- b) 結果は独立した再試験で確認される場合。

結 果： 結果を次頁の表に示す。

溶媒対照において  $10^5$  個細胞当りの変異発生数が 3 個を上回ったが、同時期に実施した 6 つの異なる試験において変異発生数は同様であり、その平均発生数は、 $6.2 \pm 1.3$  (S-9mix 存在下) 及び  $5.9 \pm 1.3$  (S-9mix 非存在下) であったことから、本試験での溶媒対照の変異発生数はこの試験条件下での試験系における自然発生的なもので何らかの影響があったためではないと結論し、試験系は有効であると判断した。

陽性対照は 3 倍以上の変異発生率を示した。

被験物質群はいずれも陰性の基準を満たした。

以上、本試験条件下において、被験物質はチャイニーズハムスター V79 細胞 (HGPRT 座) に対し突然変異誘発性がないと判断した。

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。

Dimethenamid-P

試験 1

S-9mix	試験物質	用量 ( $\mu$ g/mL)	細胞生存率 (% 溶媒対照)	10 <sup>5</sup> 生存細胞当りの 変異細胞数 (HPRT 座)
-	溶媒対照 (イタノール)	-	100	6.8
	被験物質	33	94	6.1
		100	97	6.9
		180	106	4.2
		333	59	4.9
陽性対照 (EMS)	6mM	86	33.6	
+	溶媒対照 (イタノール)	-	100	5.1
	被験物質	33	97	10.4
		100	89	11.6
		180	74	6.4
		333	28	6.7
陽性対照 (DMN)	4mM	44	55.9	

EMS : エチルメタンサルネート, DMN : ジメチルニトロソアミン

試験 2

S-9mix	試験物質	用量 ( $\mu$ g/mL)	細胞生存率 (% 溶媒対照)	10 <sup>5</sup> 生存細胞当りの 変異細胞数 (HPRT 座)
-	溶媒対照 (イタノール)	-	100	4.1
	被験物質	33	91	4.6
		100	99	5.8
		180	90	6.8
		333	72	3.7
陽性対照 (EMS)	6mM	83	44.9	
+	溶媒対照 (イタノール)	-	100	5.4
	被験物質	33	111	4.4
		100	120	5.8
		180	136	3.8
		333	104	6.5
陽性対照 (DMN)	8mM	71	33.0	

EMS : エチルメタンサルネート, DMN : ジメチルニトロソアミン

10-17. マウスリンパ腫細胞を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験 (TK 前進突然変異試験)  
(P 体)

(資料 追 33)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 :

被験物質純度 :

試験方法 : マウスリンパ腫細胞 L5178Y TK<sup>+</sup>/3.7.2c 株を用い、チミジンキナーゼ遺伝子座における *in vitro* 突然変異誘発性試験を、代謝活性化系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で行った。マイクロウェル法を用いてトリフルオロチミジン (TFT) 抵抗性細胞の出現頻度を測定し、突然変異誘発性を検定した。

被験物質は DMSO に溶解した。試験は 3 回行い、それぞれ下記濃度で実施した。対数増殖期の細胞を、S9 mix 非存在下で 4 又は 24 時間、存在下で 4 時間、各濃度の被験物質で 2 回反復処理後、発現期間として約 48 時間培養した。突然変異体を選択するため各群の細胞を TFT 培地に懸濁し、96-ウェルプレートに播種後さらに約 10 日間培養した。その後、コロニーを含まないウェル及びコロニーを含むウェルを計数し、変異体頻度を算出した。又、ウェル内で形成されたコロニーの大きさにより、大型/小型に分けて計数し、被験物質が突然変異誘発性を有すると判断された場合は、大型/小型コロニー数の比率を用いて点突然変異を鑑別した。

試験条件

試験	S9 mix 非存在下 ( $\mu\text{g/mL}$ )		S9 mix 存在下 ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	暴露時間	試験濃度	暴露時間	試験濃度
1	4 時間	6.25、12.50、25.00、 50.00、100.00、200.00、 (400.00)	4 時間	3.13、6.25、12.50、 25.00、50.00、100.0、 (200.00)
2	24 時間	3.13、6.25、12.50、 25.00、50.00、100.00、 (200.00)	4 時間	4.69、9.38、18.75、 37.50、75.00、150.0、 200.00
3	—		4 時間	6.25、12.50、25.00、 50.00、100.00、150.00、 (200.00)

( ) 内の濃度は、強度の細胞毒性のため評価しなかった。

結果の判定として、 $10^6$  細胞当たりの変異体頻度閾値が、同時に実施した溶媒対照の閾値に 126 を加えた値を超え、変異体頻度の増加に再現性があり、1 試験の 2 回反復共に突然変異反応が生じ、かつ変異体頻度に統計学的に有意な用量依存性の増加が認められた場合、陽性と判定した。 $10^6$  細胞当たりの変異体頻度閾値が、同時に実施した溶媒対照の閾値に 126 を加えた値を下回る、又は変異体頻度の増加に再現性がない、あるいは変異体頻度に統計学的に有意な用量依存性の増加がない場合、陰性と判定した。

陽性対照には、S9 mix 非存在下ではメチルメタンサルホン酸 (MMS)、S9 mix 存在下ではシクロホスファミド (CPA) を用いた。溶媒対照には 1%DMSO を用いた。

**用量設定根拠：**

**結果：** 結果を表に示した。

**細胞毒性：** すべての試験の S9 mix 存在下及び非存在下において、相対クローニング効率及び相対総増殖率が溶媒対照より 20%を下まわる細胞毒性が認められた。

**変異体頻度：** S9 mix の有無にかかわらず、再現性のある有意な変異体頻度の増加は認められなかった。

試験 2 の S9 mix 存在下において、変異体頻度に用量依存性の有意な増加が認められ、2 濃度が変異体頻度閾値を超えたが、他の試験では変異体頻度閾値を超えていないことから、強度の細胞毒性によるもので生物学的に無関係と考えられた。

一方、陽性対照として用いたメチルメタンサルホン酸、シクロホスファミドでは明らかな変異体頻度の増加が認められた。

以上の結果より、被験物質は本試験条件下において、代謝活性化系の有無にかかわらず前進突然変異誘発性は有しないものと判断された。

試験結果

試験 1

(2 反復の平均値)

	濃度 μg/mL)	暴露 時間 (時間)	S9 mix の有無	細胞毒性		遺伝毒性	
				相対クロー ニング効率 (%)* <sup>1</sup>	相対 総増殖率 (%)* <sup>2</sup>	補正変異体 頻度* <sup>3</sup>	突然変異 頻度閾値* <sup>4</sup>
						(コロニー/10 <sup>6</sup> 細胞)	
溶媒対照 (DMSO)	1%	4	-	100.0	100.0	64	190
被験物質	6.25		-	99.2	93.7	47	
	12.50		-	95.6	73.3	58	
	25.00		-	101.5	68.2	54	
	50.00		-	103.1	68.0	57	
	100.00		-	90.7	60.0	70	
	200.00		-	77.4	37.9	66	
	400.00		-	2.2	nc	nc	
陽性対照 (MMS)	15.0		-	62.2	34.2	1078	
溶媒対照 (DMSO)	1%	4	+	100.0	100.0	49	175
被験物質	3.13		+	124.9	81.0	51	
	6.25		+	99.3	70.1	46	
	12.50		+	103.0	55.4	59	
	25.00		+	96.4	34.0	53	
	50.00		+	92.3	21.7	99	
	100.00		+	85.9	15.4	97	
	200.00		+	59.7	nc	nc	
陽性対照 (GPA)	2.5		+	82.9	37.1	499	

試験 2

(2 反復の平均値)

	濃度 μg/mL)	暴露 時間 (時間)	S9 mix の有無	細胞毒性		遺伝毒性	
				相対クロー ニング効率 (%)* <sup>1</sup>	相対 総増殖率 (%)* <sup>2</sup>	補正変異体 頻度* <sup>3</sup>	変異体頻度 閾値* <sup>4</sup>
						(コロニー/10 <sup>6</sup> 細胞)	
溶媒対照 (DMSO)	1%	24	-	100.0	100.0	36	162
被験物質	3.13		-	131.5	77.8	51	
	6.25		-	125.7	73.2	42	
	12.50		-	100.8	75.2	39	
	25.00		-	117.3	54.4	49	
	50.00		-	101.5	42.9	50	
	100.00		-	40.3	7.9	69	
	200.00		-	3.5	nc	nc	
陽性対照 (MMS)	5.0		-	69.5	43.9	397	
溶媒対照 (DMSO)	1%	4	+	100.0	100.0	59	185
被験物質	4.69		+	105.3	109.1	66	
	9.38		+	101.5	82.5	95	
	18.75		+	84.8	78.7	74	
	37.50		+	61.1	43.4	140	
	75.00		+	56.7	32.0	191	
	150.00		+	56.7	26.2	156	
	200.00		+	45.0	14.1	270	
陽性対照 (GPA)	2.5		+	48.7	28.1	922	

試験 3

(2 反復の平均値)

	濃度 μg/mL)	暴露 時間 (時間)	S9 mix の有無	細胞毒性		遺伝毒性	
				相対クロー ニング効率 (%)* <sup>1</sup>	相対 総増殖率 (%)* <sup>2</sup>	補正変異体 頻度* <sup>3</sup>	変異体頻 度閾値* <sup>4</sup>
						(コロニー/10 <sup>6</sup> 細胞)	
溶媒対照 (DMSO)	1%	4	+	100.0	100.0	61	187
被験物質	6.25		+	100.8	83.8	77	
	12.50		+	101.6	81.9	70	
	25.00		+	89.8	64.0	68	
	50.00		+	86.5	49.3	84	
	100.00		+	79.3	45.1	118	
	150.00		+	65.4	28.1	75	
	200.00		+	41.6	nc	nc	
	陽性対照 (CPA)		2.5	+	61.8	48.4	

補正変異体頻度 (陽性対照除く) については Linear trend 検定 (両側、p<0.05) を実施

対照物質 DMSO : ジメチルスルホキシド

MMS : メチルメタンサルホン酸、CPA : シクロホスファミド

nc : 強度の細胞毒性のため、培養を継続しなかった。

\*<sup>1</sup> 溶媒対照を 100 とした場合の相対値

\*<sup>2</sup> 溶媒対照を 100 とした場合の相対値をさらに相対クローニング効率で補正した値

\*<sup>3</sup> クローニング効率で補正した値

\*<sup>4</sup> 溶媒対照の補正変異体頻度+総合評価ファクター (126/10<sup>6</sup>)

10-18. ラット初代培養肝細胞を用いた不定期 DNA 合成 (UDS) 試験 (P 体)

(資料 T-35 )

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 :

被験物質の純度 :

試験方法 : ラット初代培養肝細胞を用いて不定期 DNA 合成誘発能をオートラジオグラフィ測定法により検索した。被験物質は DMSO に溶解した。

細胞付着期間経過後、培養液を捨てて未付着細胞を除き、各濃度の被験物質溶液及び<sup>3</sup>H-チミジン添加血清無添加培地と交換した。18~20 時間処理後、オートラジオグラフィにより<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みを測定した。実験は下記濃度で 2 回行なった。

各処理群につき 3 枚のスライドについてスライドあたり 50 個の正常形態細胞を無作為に選択し、合計 150 個の細胞を観察し、核上銀粒子数 (NG) 及び細胞粒子数を計数した。平均核上銀粒子数から平均細胞質粒子数をひいて平均正味核上銀粒子数 (NNG) を算出し、また修復細胞 (正味核上銀粒子数が 5 個以上) の割合を算出した。

陰性対照群 (無処理及び溶媒対照) 及び陽性対照群 (7,12-dimethylbenz(a)-anthracene) についても同時に試験した。

同時に細胞毒性試験を行い、培養液中の LDH 活性と細胞毒性を鏡検した。この結果から UDS を評価する 5 用量を選択した。

実験濃度及び UDS 評価濃度

実験濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	UDS 評価濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )
7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000	7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125

用量設定根拠 :

結果：結果を以下の表に示した。

LDH 活性は 6.25  $\mu\text{g/mL}$  以上の用量で増加した。細胞形態は 250  $\mu\text{g/mL}$  以上の用量で影響がみられた。LDH 活性と細胞形態学的異常の相関関係がないことから、UDS 評価に用いた濃度は 7.8~125  $\mu\text{g/mL}$  とした。

UDS 試験の結果、被験物質はいかなる用量においても有意な正味の核上銀粒子数の増加を誘発しなかった。陽性対照物質は正味の核上銀粒子数の明らかな増加を誘発した。

以上の結果より、本試験条件下では、本被験物質はラット初代培養肝細胞を用いた不定期 DNA 合成試験において陰性であると結論された。

表 UDS 試験成績

試験群 用量	NNG 数 平均 <sup>1)</sup> ±SD	修復細胞 (%)
		NNG $\geq$ 5
無処理対照	-1.4 ± 2.0	1
溶媒対照 (DMSO)	-1.3 ± 2.2	1
被験物質		
7.8 $\mu\text{g/mL}$	-1.8 ± 1.9	0
15.6 $\mu\text{g/mL}$	-1.6 ± 2.0	0
31.3 $\mu\text{g/mL}$	-1.6 ± 1.7	1
62.5 $\mu\text{g/mL}$	-1.7 ± 1.6	0
125 $\mu\text{g/mL}$	-0.8 ± 2.1	0
250 $\mu\text{g/mL}$ *	-	-
500 $\mu\text{g/mL}$ *	-	-
1.000 $\mu\text{g/mL}$ *	-	-
陽性対照 10 $\mu\text{g/mL}$	23.0 ± 8.0	100

NNG = 正味核上銀粒子数。

<sup>1)</sup> = 150 個の細胞の平均, SD = 標準偏差。

\* = 細胞毒性のために評価できない (形態学的変化が著しいため評価可能な細胞がない / あるいはほとんどない) ; 鏡検による細胞の形態学的検査より判定。

陽性対照 : 7,12-dimethylbenz(a)anthracene



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。

Dimethenamid-P

10-19. ラットの初代肝細胞を用いた *in vitro* 細胞毒性試験 (ラセミ体)

(資料 追 17 参考)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書年 :

被験物質の純度 :

方 法 :

肝細胞の採取/調製 ;

試験液の調製 ;

肝細胞の適合性確認 ;

肝細胞の生存性試験 ;

評 価 ;

結 果 : 試験 1 及び 2 の結果の表を次頁に記載する。

溶媒対照の生存率は 50% を超え、試験系は成立した。

試験 1 において、 $5.65 \mu\text{g/mL}$  以下では細胞毒性がみられず、 $EC_{50}$  は約  $21 \mu\text{g/mL}$  であった。試験 2 においては細胞毒性がみられなかったのは  $2.5 \mu\text{g/mL}$  のみで、 $EC_{50}$  は約  $8.6 \mu\text{g/mL}$  であった。2 試験の結果は約 2.5 倍離れていた。このばらつき及び文献や他の試験機関のばらつきに基づくと、このような差は有意なものであるかは疑わしい。

培養肝細胞の平均生存率 (3 連の平均値)

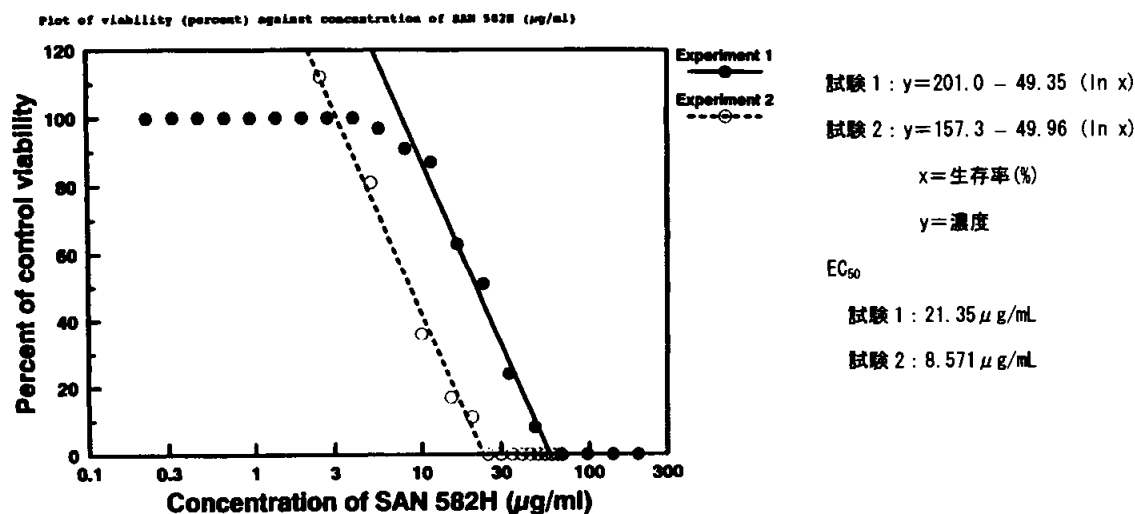
試験 1 :

処理濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	平均生存率 (%)	溶媒対照に対する割合 (%)
溶媒対照 (DMSO) (2 反復)	79	100
0.2280-3.955	NS	NS
5.650	77	97
8.071	72	91
11.53	69	87
16.47	50	63
23.53	40	51
33.61	19	24
48.02	6	8
68.6-200	T	T

試験 2 :

処理濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	平均生存率 (%)	溶媒対照に対する割合 (%)
溶媒対照 (DMSO) (2 反復)	75	100
2.5	84	112
5	61	81
10	27	36
15	13	17
20	8	11
25-70	T	T

NS : 評価しなかった。 T : 毒性あり。



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

Dimethenamid-P

10-20. ラットの初代肝細胞を用いた *in vitro* 細胞毒性試験 (ラセミ体)

(資料 追 18 参考)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書年 :

被験物質の純度 :

方 法 :

肝細胞の採取/調製 ;

試験液の調製 ;

培地の調製 ;

肝細胞の生存性試験 ;

評 価 ;

試験基準 ; 以下の基準を用いた。

結 果 : 試験 1 及び 2 の結果の表を次頁に記載する。

被験物質はラットの初代培養肝細胞に対して毒性を有する。

試験 1 の EC<sub>50</sub> 値は 20.4 μg/mL 及び試験 2 の EC<sub>50</sub> 値は 13.4 μg/mL であった。両試験を合わせると EC<sub>50</sub> 値は 16.9 μg/mL であった。

試験 1 :

処理濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	溶媒対照の生存率に対する割合 (%)	形態学的所見
陰性対照 (培地のみ)	100.0	NL
溶媒対照 (DMSO)	100.0	NL
0.228-2.77	NS	NL
3.96	100.7	NL
5.66	100.1	NL
8.09	95.1	NL
11.6	78.0	NLS
16.5	51.3	PM
23.6	10.2	PM
33.7	0.68	CD
48.1	0	
68.7	0	
98.2	0	
140	0	
200	0	

試験 2 :

処理濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	溶媒対照の生存率に対する割合 (%)	形態学的所見
陰性対照 (培地のみ)	100.0	NL
溶媒対照 (DMSO)	100.0	NL
2.5	90.9	NL
5.0	90.5	NL
10.0	80.6	NLS
15.0	60.1	CD, PM
20.0	40.1	CD, PM
25.0	0	
30.0	0	
35.0	0	
40.0	0	
45.0	0	
50.0	0	
55.0	0	
60.0	0	
65.0	0	
70.0	0	

0 : 生存細胞なし。

CD : 細胞の残骸あり

NL : 正常な肝細胞の形態 (大きい領域)

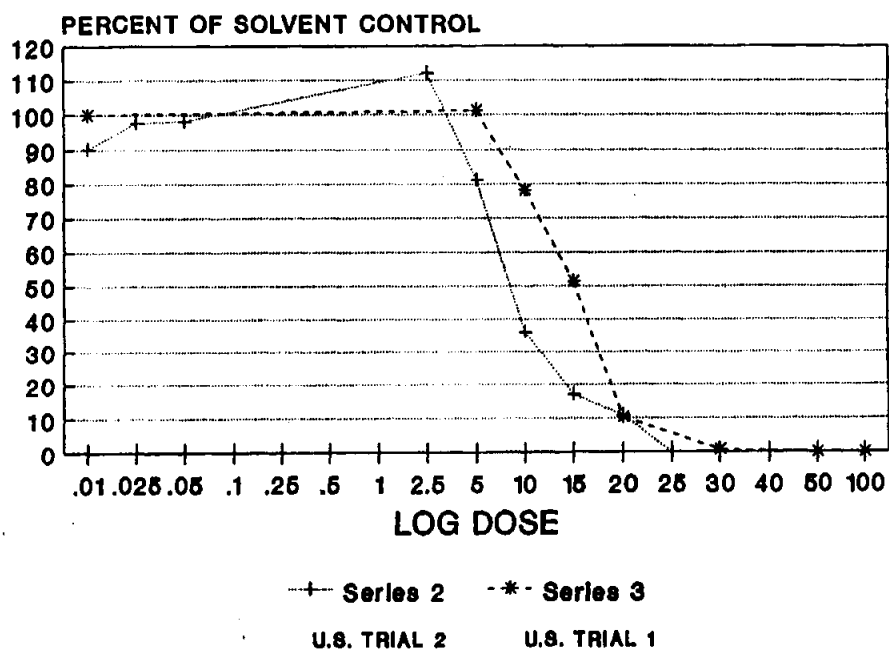
NLS : 正常な肝細胞の形態 (小さい領域)

PM : 肝細胞の形態に異常 球状または凝集細胞

NS : 計測せず 毒性領域の下限の確認済

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。

Dimethenamid-P



10-21. ラットの肝細胞を用いた *in vitro* 不定期 DNA 合成 (ラセミ体)

(資料 追 19 参考)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書年 :

被験物質の純度 : 記載なし

供試料 : Wistar 系雄ラットの肝細胞

8-12 週齢、体重 150-200g

方法 : ラットから変法 Seglen's 媒体 (pH4 に調製) を用いた灌流下で肝臓を採取し、40  $\mu$ m のステンレススチールのメッシュで濾過して個々の細胞に分け、再懸濁後してトリパンプルーで染色し、細胞の生存率を確認した。

分離した肝細胞を洗浄・遠心分離し、HEPES、ペニシリン、ストレプトマイシン、グルコース、インシュリン、NaHCO<sub>3</sub> を添加した L-15 培地に移した。pH7.4 に調整し、肝臓当り 2~5x10<sup>8</sup> 細胞を得た。

溶媒対照 (DMSO) 及び陽性対照 (7,12-dimethylbenz (a)anthracene ; DMBA25.64  $\mu$ g/mL) を別途設けた。

1.00、3.00、10.00、30.00 及び 100.00nL/mL

3.5~4 x 10<sup>6</sup> 個を有する一部試料をヒドロキシウレア 4mL が添加されたフラスコに入れ、37°C で 1 時間インキュベートした後、試験溶液及び [<sup>3</sup>H]-チミジン (0.7  $\mu$ Ci/mL) を添加しさらに 3 時間インキュベートした。

インキュベート終了後フラスコをアイスバスに移し、2mL のリン酸緩衝液及びチミジン (0.5mg/mL) を添加して細胞を溶解して核を取り出した。

核をさらに溶解液で溶解し、DNA を 10% トリクロロ酢酸 (TCA) で沈殿させて得た。DNA を 5% TCA 1mL に再溶解し、その 0.2mL を液体シンチレーションカウンターで計測した。

結果 : 結果を次頁の表に示す。

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。

Dimethenamid-P

試験濃度		dpm/ $\mu$ gDNA
溶媒対照		117.1 $\pm$ 4.2
(nl/mL)	( $\mu$ g/mL)	
1.00	1.187	103.7 $\pm$ 7.9
3.00	3.56	111.7 $\pm$ 13.5
10.00	11.87	112.0 $\pm$ 6.9
30.00	35.6	113.4 $\pm$ 7.4
100.00	118.7	112.5 $\pm$ 13.3
陽性対照 (DMBA 25.64mg/mL)		375.2 $\pm$ 90.0

すべての試験濃度での DNA1 $\mu$ g 当りの放射能は対照群と同等であった。一方、陽性対照では対照群の3倍を超えており、試験の妥当性が確認された。

以上より、被験物質を 100nl/mL まで暴露させても、修復による [ $^3$ H]-チミジンの DNA の取り込みは対照群と同等であり、不定期 DNA 合成はないと結論した。

10-22. ラットの初代培養肝細胞を用いた *in vitro* 不定期 DNA 合成(ラセミ体)

(資料 追 20 参考)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書年:

被験物質の純度:

供試料: Fischer344 系 (NhsdBR) 雄ラット (成獣 226.6-260.5g) の肝細胞

方法:

細胞の採取: ラットを軽麻酔下で灌流により肝臓を採取し、洗浄した肝細胞はコラーゲン溶液に入れ、細胞の単一層を培養ディッシュでカバースリップに単一層の細胞を付着させた。これを 5%CO<sub>2</sub> 流気下、37°C で保持した。

培養液: WME+: Williams E 完全培地に 10%ウシ胎児血清、2mM L-グルタミン、100 μg/mL ゲンタマイシンを添加したもの。

WMEI: WME+から血清を除いたもの。

試験液調製及び暴露: 被験物質を DMSO に溶解し、WMEI で所定の濃度 (0.010~500 μg/mL の範囲で 16 濃度) を調製した。Williams の方法に基づいて 1 ディッシュ当り、3mL WME+ に  $0.5 \times 10^6$  個の肝細胞を調製した。

同時に溶媒対照 (DMSO を最大 1%) 及び陽性対照 (2-acetyl-aminofluorene ; 2-AAF 0.10 μg/mL) を設けた。

37°C、5%CO<sub>2</sub> 流気下で 1.6~1.8 時間インキュベートした後、付着しない細胞を除いて培養液を交換し、各試験液を [<sup>3</sup>H]-チミジン (20Ci/nM) と一緒に添加してさらに 18.3~18.9 時間処置した。1 濃度について 5 連で実施し、うち 2 連を細胞毒性 (20.7~21.2 時間処置) へ供した。処置時間の終了後細胞を洗浄して乳剤を添着し、オートラジオグラフィーの標本を作製した。標本を鏡検し、3 標本について計 150 個の細胞から、正味のグレイン数を計測した。

用量設定根拠:

試験の妥当性の基準:

1. 灌流により採取した肝細胞生存率が通常 70%以上、最低 50%以上。
2. 単一層の肝細胞の生存が 70%以上。通常は約 90%。
3. 陰性対照の細胞生存率は 50%を下回らない。
4. 陰性対照の net 標識核は -5.00~1.00。10%以上及び核当たり 6 つ以上のグレインを有さない。
5. 陽性対照は核あたりのグレイン数は 6 以上、かつ 6 以上のグレインを有する各は 10%以上である。
6. 再現性の考慮
7. 6 用量



8. 最高用量は毒性用量(細胞の形態学的変化あり)または被験物質の溶解性で、限界は 5000  $\mu\text{g/mL}$ 。

陽性基準： 正味の核当りの平均グレイン数が 6 個を超え、6 個以上のグレインを有する核が 10%を超える場合。

結果： 結果の表を次頁に示す。

生存細胞の割合は試験 1 及び 2 においてそれぞれ、91.0%及び 94.5%であった。ディッシュに付着した生存細胞はそれぞれ 75.0%及び 64.2%であった。

試験 1 では、0.025 及び 0.050  $\mu\text{g/mL}$  でグレインを 6 つ以上有する核の平均が 10%を超えているが平均のグレイン数は基準に達せず、マージナルと考えられた。

試験 2 では陽性はより強く検出され、1.00 及び 0.5  $\mu\text{g/mL}$  で両基準を著しく超えた。

2 回の試験結果をみると、感度の違いはあるがいずれも陽性であり、本試験条件下で被験物質は不定期 DNA 合成を誘発する変異原性ありと判断された。

#### 試験 1

試験条件	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	UDS 正味のグレイン数 <sup>1)</sup>	グレインを 6 つ以上有する核の平均割合 (%) <sup>2)</sup>	細胞質当りの平均グレイン数 <sup>2)</sup>	21.2 時間暴露の生存率 (%) <sup>3)</sup>
溶媒対照 (DMSO)	1%	0.47	9.3	11.19	100.0
陽性対照 (2-AAF)	0.1	13.32	89.3	20.81	65.8
被験物質	10.0	-2.00	3.3	13.15	84.2
	5.0	-0.40	2.0	7.24	86.5
	2.50	-2.52	0.7	12.00	82.5
	1.00	-0.86	4.7	10.26	84.4
	0.50	-0.42	3.7	9.34	81.3
	0.10	-1.19	2.7	12.09	87.5
	0.050	1.58	16.0	9.10	79.3
0.025	2.99	33.0	11.03	77.6	

#### 試験 2

試験条件	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	UDS 正味のグレイン数 <sup>1)</sup>	グレインを 6 つ以上有する核の平均割合 (%) <sup>2)</sup>	細胞質当りの平均グレイン数 <sup>2)</sup>	20.7 時間暴露の生存率 (%) <sup>3)</sup>
溶媒対照 (DMSO)	1%	0.30	6.7	10.73	100.0
陽性対照 (2-AAF)	0.1	19.01	94.7	14.31	78.1
被験物質	10.0	0.96	10.0	8.24	76.3
	5.0	0.73	13.3	11.80	96.0
	2.50	2.59	22.7	11.74	93.0
	1.00	21.05	92.7	13.31	86.1
	0.50	8.74	70.0	9.61	90.2
	0.10	5.09	46.0	10.22	98.1

<sup>1)</sup>： 正味のグレイン数=核内グレイン数-細胞質内グレイン数(3 連の平均；150 細胞)

<sup>2)</sup>： 3 連の平均

<sup>3)</sup>： 生存=溶媒対照に比するユニット領域あたりの生存細胞数

10-23. ラットの肝細胞を用いた *in vitro* 不定期 DNA 合成試験(ラセミ体)

(資料 追 21 参考)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書年 :

被験物質の純度 :

供試試料 : Wistar 系雄ラット 2 匹の肝細胞

開始時日齢 ; 56~58 日齢、 体重 203g~206g

方 法 : Williams の方法に基づいた。

肝細胞の調製 : 動物を軽麻酔下で灌流し、肝臓を採取した。肝細胞を Williams E 完全培地 (WE-C) に懸濁して 150  $\mu$ m のクロスで濾し、WE-C に再懸濁して遠心分離 (40 x g、2-3 分) してペレットを WE-C に再懸濁した。この操作を 2 回繰り返す。0.4% トリパンブルーに非染色の細胞を生存細胞として、 $1.5 \times 10^5$  生存細胞/ml WE-C の溶液を調製した。この細胞溶液 3ml を 6 つの well に入れてカバースリップをし、37°C、5% CO<sub>2</sub> 流気下で 90 分細胞を付着させた。

試験溶液の調製 : 被験物質をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して原液を調製し、さらに DMSO で希釈して以下の濃度の試験液を調製した。

試験	試験溶液中濃度 (mg/mL)	最終処置濃度 ( $\mu$ g/mL)
試験 1	0.001280	0.01280
	0.006400	0.06400
	0.03200	0.3200
	0.1600	1.600
	0.8000	8.000
	4.000	40.00
	20.00	200.0
	100.0	1000
試験 2	0.7813	7.813
	1.563	15.63
	3.125	31.25
	6.250	62.50
	12.50	125.0
	25.00	250.0
	50.00	500.0
	100.0	1000 P

P : 表面に非溶解物あり

溶媒対照及び陽性対照 : 溶媒対照として 1% DMSO 培地溶液を、陽性対照として 0.25 及び 0.50mg/mL 濃度の 2-acetamidofluorene (2-AA) (最終濃度 ; 2.5 及び 5.0  $\mu$ g/mL) を設けた。

暴露及び生存細胞の評価 : 培地を除き、単一細胞層を Williams E 不完全培地 (WE-I) で洗浄、1.98mL の WE-I 及び 200  $\mu$ L の溶媒対照を添加、37°C、5% CO<sub>2</sub> 流気下で一晩インキュベートした。1mL の培地を取り、代わりに 1mL の 0.4% トリパンブルーを添加して 5 分インキュベーションし、上清を 2mL のリン酸緩衝液 (PBS) に置き換え、カバ

ースリップをして生存細胞及び全細胞数を計測した。3 連で実施した。

不定期 DNA 合成のための暴露及び放射標識： 試験液及び陽性対照は 6 連で、溶媒対照は 10 連で実施した。

培地を除き、1.98mL の WE-1、10  $\mu$ Ci/mL の [ $^3$ H]-チミジン及び 20  $\mu$ L の試験溶液を添加し 37°C、5%二酸化炭素流気下で一晩インキュベートした。その後、PBS で洗浄、氷酢酸：エタノール(1：3 v/v)で固定した。洗浄し、風乾したカバースリップかけて、生存細胞を確認し、50~90%の生存細胞の連続的な 4 濃度を選択した。

オートラジオグラフィー及び銀粒子(グレイン)の計測： 標識したスライドに乳剤を添着し、細胞の核及び細胞質の Meyers Haemalum/eosin Y 染色をして鏡検に供した。細胞質及び核のグレイン数を計測した。

結 果： 結果の表を以下に示す。

培養肝細胞の生存性

試験	処置濃度 ( $\mu$ g/mL)	平均生存率 (%)	%vs 対照 (DMSO)
試験 1	0 (DMSO)	64.1	100
	0.0128	NS	NS
	0.064	NS	NS
	0.32	NS	NS
	1.6	NS	NS
	8	64.7	101
	40	40.7	63.5
	200	11.6	18.1
	1000	3.2	5.0
試験 2	0 (DMSO)	59.1	100
	7.813	52.3	88.5
	15.63	39.0	66.0
	31.25	29.6	50.1
	62.5	11.0	18.6
	125	T	T*
	250	T	T
	500	T	T
	1000	3.2	5.4

NS：計測しなかった。

T：毒性あり

\*：部分的に生存細胞あり

核当りのグレイン数

試験	処置濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	平均 正味のグレイン数	修復した NG を 5 個 以上有する細胞の 割合 (%)	修復細胞当りのグ レイン数
1	0 (DMSO)	-12.7	2.4	11.5
	0.0128	NS	NS	NS
	0.064	NS	NS	NS
	0.32	-8.2	0	-
	1.6	-9.9	1.3	6
	8	-9.7	0	-
	40	-8.0	1.3	8
	200	-4.2	2.7	5
	1000	T	T	T
	2.5 (2-AAF)	18.7	94.7	19.4
2	0 (DMSO)	-26.7	0	-
	7.813	-29.0	0	-
	15.63	-22.2	0	-
	31.25	-16.1	0	-
	62.5	-13.0	0	-
	125	-7.9	0	-
	250	T	T	T
	500	T	T	T
	1000	T	T	T
	2.5 (2-AAF)	47.5	100	47.5

NS : 計測しなかった。

T : 毒性あり

正味のグレイン数 = 核内グレイン数 - 細胞質内グレイン数

結果より、被験物質を  $1000 \mu\text{g/mL}$  まで肝細胞に暴露しても有意と思われる不定期 DNA 合成は 2 つの独立した試験で認められなかった。

用量関連的な核のグレイン数の増加が試験 2 で認められたが、細胞のグレイン数を上回らなかったことより、これは被験物質の毒性によるものであると考えられた。

以上、被験物質は不定期 DNA 合成の本試験条件において遺伝毒性を有しないと結論する。

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。

Dimethenamid-P

#### 10-24. ラットの肝臓における *in vivo* 不定期 DNA 合成 (ラセミ体)

(資料 追 22 参考)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書年 :

被験物質の純度 :

供試動物 : Fischer 系ラット 1 群雄 6 匹

開始時日齢 ; 57-66 日齢、開始時体重 ; 176-203g

方 法 :

投与用量 ; 被験物質をコーン油に懸濁し、158 及び 500mg/kg となるように単回強制経口投与した。投与容量は 10mL/kg とし、陰性対照には溶媒を同容量投与した。陽性対照として、12-14 時間の試験には 2-acetamidofluorene (2-AAF) を 75mg/kg (溶媒 ; コーン油)、2-4 時間の試験には Dimethylnitrosamine (DMN) を 10mg/kg (溶媒 ; 純水) の投与群を設けた。

投与用量設定根拠 ;

肝細胞の採取 ; 試験 1 では、動物を投与 12-14 時間後に、試験 2 では 2-4 時間後にハロタンで麻酔して Ca フリーのリン酸緩衝液 (pH7.4) で灌流し、肝臓を採取した。肝臓をペトリ皿に入れて緩衝液とカルシウム及びコラーゲンを加えて、肝細胞を取り出し Williams E 完全培地 (WE-C) で 150  $\mu$ m のナイロンメッシュを濾して洗浄し、遠心分離した後ペレットを WE-C に再懸濁して遠心分離にかけ、最終的に 20mL の WE-C に懸濁した。この 0.5mL をとり、0.4% のトリパンブルーを等量加えて生存細胞の比率をヘパトサイトメーターで計測した。その  $1.5 \times 10^5$  生存細胞/mL となるよう希釈して、3mL をとり、カバースリップをかけて 37°C、5% 二酸化炭素の流気下で 90 分間接着させた。

[ $^3\text{H}$ ]-チミジンの取り込み ; 細胞から媒体を除き、Williams E 不完全培地 (WE-I) で洗浄し、[ $^3\text{H}$ ]-チミジン (10  $\mu$ Ci/mL) 含有の WE-I に入れて 37°C 二酸化炭素流気下で 4 時間インキュベートした。0.25mM チミジン含有の WE-I を 3 回交換した後、同媒体で一晩インキュベートした。

細胞をリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄後 Glacial acetic acid : ethanol (1:3 v/v) で固定した。カバースリップをかけた。

オートラジオグラフィー及びグレインの計測 ; スライドに乳剤を添着させ、現像及び定着をおこなった。核及び細胞のグレインを鏡検で計測し、正味のグレイン数を算出し

た。動物当たり 2 枚のスライドで 50 細胞/枚、計 100 細胞を計測した。

結 果： 以下の表に記載する。

試験の妥当性： 溶媒対照動物の平均 net グレイン数は 0 またはそれ以下であった。陽性対照の正味のグレイン数は 5 以上で細胞の 50%以上がグレインを有していたことから試験は妥当であった。

結果より死亡しない最大用量と思われる被験物質 500mg/kg まで<sup>[3H]</sup>-チミジンの取り込みは増加していなかったことから、本試験条件下で被験物質は不定期 DNA 合成を行わないと結論する。

	用 量 (mg/kg)	核当りの グレイン数	細胞質当りの グレイン数	正味の グレイン数 (NG)	修復細胞中の 正味の グレイン数	細胞の修復率 (NG>5)
12-14 時間	0(コーン油)	1.87	2.40	-0.5	5.3	0.2
	158	2.55	3.02	-0.5	6.8	1.8
	500	2.79	3.05	-0.3	7.8	2.2
	75 (2-AAF)	16.70	2.50	14.2	14.8	94.4
2-4 時間	0(コーン油)	3.86	4.40	-0.5	5.8	3.6
	158	4.53	5.12	-0.6	6.7	4.8
	500	5.21	6.02	-0.8	6.6	5.8
	10 (DMN)	30.01	8.10	21.9	24.4	90.0

10-25. ラットにおける優性致死試験 (ラセミ体)

(資料 追 23 参考)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書年:

被験物質の純度:

供試動物: SD 系ラット

初回試験: 1 群雄 40-60 匹

開始時週齢 雌雄約 8 週齢 体重記載なし

再試験: 1 群雄 40-75 匹

開始時週齢 雌雄約 12 週齢 体重記載なし

方 法:

投与方法: 被験物質をコーン油に希釈し、初回及び再試験ともに 275、550 及び 1100mg/kg となるように雄ラットに強制単回経口投与した。投与容量は 10mL/kg とした。投与後各雄動物は、2 匹の未交配の雌ラットと 5 日間/週交配させ、その後別の 2 匹雌ラットと交配させ、交配期間を計 2 週とした。雄動物は 2 週の交配の後屠殺した。交配期間の中間時点から 13~14 日後に雌動物を二酸化炭素で屠殺し、開腹して子宮内を調べ、生存及び死亡(早期及び後期)胚数を計測した。

	初回試験	再試験
投与用量及び動物数	溶媒対照: 40 匹 275mg/kg: 40 匹 550mg/kg: 40 匹 1100mg/kg: 60 匹	溶媒対照: 40 匹 275mg/kg: 40 匹 550mg/kg: 40 匹 1100mg/kg: 75 匹
交配開始日	投与当日	投与第 3 日目

結 果: 結果を次頁に示す。

試験の妥当性として、対照群の妊娠雌 1 匹当りの未着床数が <6 であることを基準とした。本試験において対照群はこの基準を満たしていた。

統計学的有意差いくつかの項目に散見された。再試験で 500mg/kg 群の週 2 及び 275mg/kg 群の週 1 における生存胚の有意な低下に関連する死亡胚の有意な増加がみられたが、高用量では初回及び再試験ともに有意な変化はみられなかった。この変化には再現性がなかった。生存胚数の低下に関連する死亡胚の有意な増加が被験物質投与に由来しないことは、SD ラットに対して本被験物質は優性致死性において陰性であると判断した。

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。

Dimethenamid-P

用量群 (mg/kg)	初回試験				再試験				
	対照	275	550	1100	対照	275	550	1100	
雄死亡率 (%)	0	0	0	55	0	0	7.5	72	
妊娠雌 1 匹当り									
繁殖指数	週 1	0.33	0.21	0.24	0.26	0.70	0.54	0.54	0.48*
	週 2	0.54	0.61	0.59	0.56	0.70	0.66	0.57	0.67
総着床数	週 1	9.27	6.00 ↓	8.11	4.64 ↓	15.59	13.84 ↓	14.18 ↓	14.55
	週 2	13.42	12.71	11.96 ↓	12.87	15.32	14.77	15.71	13.79 ↓
未着床数	週 1	4.54	5.59	4.37	6.36	2.54	3.53 ↑	4.05 ↑	3.15
	週 2	2.12	2.76	4.02 ↑	3.00	3.68	3.74	2.38	1.96
総死亡胚	週 1	0.46	0.35	1.16 ↑	0.79	0.55	0.95 ↑	0.73	0.75
	週 2	0.81	0.92	1.26 ↑	1.00	1.52	0.74	0.67	0.46
早期死亡胚	週 1	0.46	0.35	0.68	0.79	0.55	0.93 ↑	0.73	0.75
	週 2	0.81	0.84	1.26 ↑	1.00	1.52	0.74	0.67	0.46
後期死亡胚	週 1	0.00	0.00	0.47	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00
	週 2	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1 個以上の死亡胚を有する妊娠雌の比	週 1	0.19	0.29	0.53*	0.50	0.30	0.63*	0.48	0.55
	週 2	0.53	0.47	0.70	0.67	0.57	0.43	0.43	0.25
2 個以上の死亡胚を有する妊娠雌の比	週 1	0.15	0.06	0.21	0.29	0.14	0.26	0.15	0.20
	週 2	0.23	0.24	0.36	0.23	0.36	0.17	0.17	0.11
総死亡胚/総着床胚	週 1	0.05	0.06	0.14 ↑	0.17 ↑	0.04	0.07 ↑	0.05	0.05 ↑
	週 2	0.06	0.07	0.10	0.08	0.10	0.05	0.04	0.03
早期死亡胚/全着床胚	週 1	0.05	0.06	0.08 ↑	0.17 ↑	0.04	0.07 ↑	0.05	0.05 ↑
	週 2	0.06	0.07	0.10	0.08	0.10	0.05	0.04	0.03
後期死亡胚/全着床胚	週 1	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	週 2	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
生存胚/妊娠動物	週 1	8.81	5.65 ↓	6.95	3.86 ↓	15.04	12.88 ↓	13.43 ↓	13.80
	週 2	12.60	11.80	10.70 ↓	11.87	13.80	14.04	15.05	13.32

カイニ乗検定 : \* p < 0.05

t-検定 : ↑ ↓ p < 0.05

表中の項目は妊娠雌 1 匹当りを示す。

繁殖指数 = 妊娠動物数 / 交配動物数

未着床 (妊娠雌 1 匹当り) = 黄体数 - 総着床数



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。

Dimethenamid-P

10-26. マウス Balb/c-3T3 細胞を用いた in vitro 形質転換

(資料 追 24 参考)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書年 :

被験物質の純度 :

供 試 試 料 : マウスのクローン Balb/c-3T3 細胞

方 法 :

細胞の調製 :

試験液の調製及び用量設定 :

対照物質 :

形質転換試験 :

試験基準 :

評価基準 :

結 果 :

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

Dimethenamid-P

形質

転換細胞の発現率は用量関連性がなく、被験物質は本試験条件下において、陰性と結論する。

細胞生存性

濃度 (μg/mL)		平均生存細胞数/プレート	%生存率 vs 溶媒対照
被験物質	15.0		
	30.0		
	50.0		
	75.0		
	100.0		
溶媒対照 (1%DMSO)			
陽性対照 (DMN)			

形質転換細胞

濃度 (μg/mL)	N	総形質転換細胞数	形質展開細胞数/プレート (平均)		log <sub>10</sub> 分析 (平均)	統計 <sup>1)</sup>
			絶対	Log10		
溶媒対照 (1%DMSO)	19					
陽性対照 (DMN)	18					
検体	15.0	19				
	30.0	20				
	50.0	18				
	75.0	17				
	100.0	20				

<sup>1)</sup>: T検定

NS: 有意差なし

11. 生体機能影響

11-1. 生体機能に及ぼす影響 (P 体及びラセミ体)

(資料 T-36)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 :

被験物質の純度 : ジメテナミド P (P 体) ;

ジメテナミド (ラセミ体) ;

① Irwin 法を用いた一般状態観察

供試動物 : マウス ; CrIj:CD1 (ICR) 系 1 群雌雄各 3 匹

投与時週齢 7 週齢、体重範囲 雄 29.5~34.5g、雌 22.6~27.3g

ラット ; CrI:CD (SD) 系 1 群雄各 5 匹

投与時週齢 7 週齢

体重範囲 雄 241.8~264.6g

方法 : 各被験物質の 0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC-Na) 懸濁液を調製した。被験液を予備試験より設定した下記の用量となるよう動物に単回強制経口投与した。また溶媒対照として 0.5%CMC-Na 溶液を投与した。ラットは投与前夜一晩、マウスは投与前約 4 時間絶食し、両動物とも投与後 6 時間目の観察後に給餌を再開した。

試験設定

用量群	溶媒対照 (CMC-Na 液)	P 体			ラセミ体
		150mg/kg	500mg/kg	1500mg/kg	1500mg/kg
マウス	♂3、♀3	♂3、♀3	♂3、♀3	♂3、♀3	♂3、♀3
ラット	♂5	♂5	♂5	♂5	♂5

観 察 :

マウス : Irwin の多次元観察法に準じた方法で行動変化、神経症状などの中毒症状を評価した。投与前、投与 1、2、4、6、24 時間後に観察した後、3 日目まで 1 日 1 回観察した。

ラット : 機能観察総合評価法 (FOB) に準じた方法で行動変化、神経症状及び中毒症状を評価し、体温、瞳孔径も測定した。投与前、投与 1、2、4、6、24 時間後及び 2 日目に観察した。

体 重 : マウスは投与前、投与 24 時間、2 日及び 3 日目に体重測定した。ラットについては、投与前、投与 24 時間及び 2 日目に体重測定した。

結 果：

マウス： 溶媒対照には死亡は認められず、一般状態及び体重に異常は認められなかった。

P 体：

150mg/kg 投与群には死亡は認められず、一般状態及び体重に異常は認められなかった。

500mg/kg 群雄 1 例において眼瞼下垂、呼吸数減少及び潮紅が投与 1~2 時間後にのみ認められたが、その他の雄 2 例及び雌には一般状態の変化は認められなかった。体重は雌雄とも経日的にほぼ増加した。

1500 mg/kg 群の雄では 3 例全例に眼瞼下垂、正向反射の着地不全、呼吸数減少又は呼吸困難、潮紅が、2 例に異常歩行、流涙、軟便が、1 例に警戒性の低下、受動性の低下、拳尾、振戦、ひきつり (twitch)、腹臥位、肢筋緊張度の低下又は抵抗、耳介反射の低下、角膜反射の低下、立毛が投与後 1~6 時間の間に観察された。体重は投与 24 及び 48 時間後では減少を示したが、72 時間後には増加に転じた。雌では 3 例全例に眼瞼下垂、警戒性の低下、受動性の低下、疼痛反応の低下、振戦、腹臥位、歩行失調、異常歩行、正向反射の着地不全、肢筋緊張度の低下、呼吸数減少・呼吸困難又は緩徐、低体温が、2 例にひきつり、後肢握力の低下が、1 例に視覚性置き直し反応の低下、接触反応の鈍化、痙攣、身もだえ、潮紅又は血色不良、立毛がみられた。症状は投与後 1~6 時間の間に観察され、投与 24 時間までに 2 例が死亡した。生存した 1 例は投与 24 時間後の一般状態は回復していたが、48 時間後に体重の増加抑制が認められた。

ラセミ体：

1500mg/kg において振戦、歩行失調及び正向反射の着地不全が雌雄全例にみられ、さらに雄では耳介反射の低下、雌では異常歩行及び低体温が全例に認められた。その他に、接触反応の鈍化又は過敏、後肢握力の低下、呼吸困難又は緩徐、警戒性の低下、受動性の低下、ひきつり、痙攣、肢筋緊張度の低下、角膜反応の低下、同側性屈曲反射の低下、潮紅、立毛、腹臥位及び疼痛反応の低下が認められた。これらの症状は投与 1~6 時間後に認められ、雄 2 例が投与 4 時間後に、雌は全例が 48 時間後までに死亡した。雄 1 例の生存動物は 4 時間後に一般状態は回復したが、体重は 72 時間後に増加に転じた。

ラット： 溶媒対照には死亡は認められず、一般状態及び体重に異常は認められなかった。

P 体：

150mg/kg 投与群には死亡は認められず、一般状態及び体重に異常は認められなかった。

500mg/kg 投与群では全例に流涎が認められた。その他に腹這い歩行、覚醒状態の低下、潮紅、腹臥位、円背位、呼吸緩徐、移動性減少、接触反応の過反応、軟便、流涙、歩行不能、接近反応消失、痛覚反射の消失、腹筋及び肢筋緊張度の低下、後肢握力の低下傾向、後肢着地開脚幅の減少傾向、瞳孔径増大、血色不良が認められた。これらの症状は 1~6 時間後に認められ、6~48 時間後までに 4 例が死亡した。生存動物では 6 時間後に一般状態は回復し、体重も 24 時間後では増加した。

1500mg/kg 投与群では全例に呼吸緩徐、眼瞼閉鎖、流涎、覚醒状態の低下、潮紅が認められた。その他に腹臥位、歩行異常、下痢/軟便、接触反応の過反応、血行不良、振戦/強直性伸展痙攣(死亡前1例)、接近反応の消失が認められた。これらの症状は投与後1~6時間後に認められ、4~24時間後までに全例死亡した。

ラセミ体；

1500mg/kg 投与群において、全例に腹臥位/円背位、流涎、歩行異常、潮紅が認められた。その他に、移動性の減少、接触反応の過反応、覚醒状態の低下、正向反射の着地不全、後肢着地開脚幅の減少、下痢/軟便、呼吸緩徐、振戦/突発性ジャンプ、眼瞼閉鎖、流涎、接近/接触反応の消失、痛覚反射の過反応、腹筋緊張度の抵抗が認められた。これらの一般状態は投与後1~4時間後に認められ、4~6時間後までに全例死亡した。

② 中枢神経系に対する作用

1) ラットの自発運動量の測定

供試動物： ラット； CrI:CD(SD)系 1群雄各5匹

投与時週齢7週齢、体重範囲 雄 247.0~269.4g

方 法： 被験物質の0.5%CMC-Na懸濁液及び溶媒対照を一晩絶食させたラットに強制単回経口投与した。

試験設定

用量群	溶媒対照 (CMC-Na液)	P体			ラセミ体
		150mg/kg	500mg/kg	1500mg/kg	1500mg/kg
ラット	♂5	♂5	♂5	♂5	♂5

ラットは個別に試験装置に入れて各々3分間の運動量を受動型赤外線センサーによる自発運動量計測システムで測定した。測定は投与前日、投与1、2、4及び6時間後に行った。

結 果： P体及びラセミ体の1500mg/kg群では投与4時間後にそれぞれ3及び1例が死亡した。

P体及びラセミ体ともにいずれの投与群も対照群と比較して、各測定時点における有意な変化は認められなかった。

2) マウスの電撃痙攣に対する作用

供試動物： マウス CrIj:CD1(ICR)系 1群雄各5匹

投与時週齢7週齢、体重範囲 雄 29.4~33.1g

方 法： 被験物質の0.5%CMC-Na懸濁液及び溶媒対照を投与前4時間絶食させたマウスに強制単回経口投与した。

試験設定

用量群	溶媒対照 (CMC-Na液)	ジメテナミドP (P体)			ジメテナミド (ラセミ体)
		150mg/kg	500mg/kg	1500mg/kg	1500mg/kg
マウス	♂5	♂5	♂5	♂5	♂5

投与 1 時間後にマウスの両眼瞼に予め生理食塩液を浸した電極を当て、小動物用電撃刺激痙攣装置を用いて以下の条件の電気ショックを与えた。動物に間代性痙攣(CI.)及び強直性伸展痙攣(T.E.)が発現するときの電流値を調べた。

電気ショック；

パルス幅 5msec  
周波数 100Hz  
上昇幅 0.5mA (1 秒間)

結 果： 以下の表に結果を示す。間代性痙攣についてはP体及びラセミ体ともに有意な変化は見られなかったが、強直性伸展痙攣ではP体の1500mg/kg投与群で有意な域値の低下がみられた。ラセミ体についても有意ではないが、低下傾向がうかがわれた。

群	用量 (mg/kg)	閾値 (mA)	
		CI.	T.E.
溶媒対照	-	3.8±0.1	5.1±0.2
P 体	150	3.7±0.2	5.0±0.2
	500	3.8±0.1	5.2±0.1
	1500	3.1±0.3	3.7±0.3 ↓
ラセミ体	1500	3.5±0.2	4.3±0.3

統計処理：Dunnett test, ↓：P<0.01

### ③ 循環器系に対する作用

ラットの血圧、心拍数に対する作用

供試動物： ラット； CrI:CD(SD)系 1群雄各5匹

投与時週齢7週齢、体重範囲 雄222.7~259.4g

方 法： 被験物質の0.5%CMC-Na懸濁液及び溶媒対照を一晩絶食させたラットに強制単回経口投与した。

#### 試験設定

用量群	溶媒対照 (CMC-Na液)	P 体			ラセミ体
		150mg/kg	500mg/kg	1500mg/kg	1500mg/kg
ラット	♂5	♂5	♂5	♂5	♂5

投与1、2、4及び6時間後に血圧及び心拍数を無加温型非観血式血圧計で各測定ポイントについて5回測定し、収縮期血圧の最高値と最低値を除いた3回の平均値を求めた。動物は事前に馴化測定を2回実施した。

結果： 結果を以下の表に示す。

項目/ 群	用量 (mg/kg)	投与前	投与後 (時間)			
			1	2	4	6
収縮期血圧 (mmHg)						
溶媒対照	-	97±3	96±2	99±4	100±3	95±3
P 体	150	95±3	93±6	96±6	97±4	98±4
	500	95±3	106±4	90±3	99±3	93±7
	1500	97±2	97±6	109±4 <sup>a</sup>	↑115±0 <sup>b</sup>	115 <sup>c</sup>
ラセミ体	1500	95±1	100±4	103±2	107±2 <sup>b</sup>	98±3 <sup>b</sup>
心拍数 (beat/分)						
溶媒対照	-	424±21	427±14	400±17	398±23	406±18
P 体	150	426±14	438±9	424±10	440±17	440±13
	500	431±14	439±14	414±10	429±33	430±20
	1500	420±31	390±21	370±14 <sup>a</sup>	388±15 <sup>b</sup>	413 <sup>c</sup>
ラセミ体	1500	424±18	407±10	396±17	433±21 <sup>b</sup>	350±5 <sup>b</sup>

Dunnett 検定: ↑ ; p<0.05

<sup>a</sup>: n=4, 投与の影響と思われる動物の動きにより測定できなかった。

<sup>b</sup>: n=3, <sup>c</sup>: n=1,

P 体 (1500mg/kg 群) で 4 及び 6 時間時点で各 2 例が死亡。ラセミ体で 4 時間後に 2 例が死亡。

P 体 1500mg/kg 投与群で投与 4 時間後に収縮期血圧の有意な上昇がみられた。  
心拍数に投与による有意な影響は認められなかった。

#### ④ 腎機能に対する作用

ラットの尿量、尿中電解質に対する作用

供試動物: ラット; CrI:CD(SD)系 1 群雄各 5 匹

投与時週齢 7 週齢、体重範囲 雄 270.7~296.7g

方 法: 被験物質の 0.5%CMC-Na 懸濁液及び溶媒対照を一晩絶食させたラットに強制単回経口投与した。投与直後に生理食塩液を 2.5mL/100g 体重の割合で経口負荷し、個別に採尿ケージに入れて投与 6 時間後までの尿を採尿し遠心分離 (4℃、1500rpm、10 分間) して上清を採取するとともに尿量を測定した。尿中の Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>及び Cl<sup>-</sup>濃度及び浸透圧を測定した。測定値より Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>比を求めた。動物は蓄尿中絶食、絶水とした。

#### 試験設定

用量群	溶媒対照 (CMC-Na 液)	P 体			ラセミ体
		150mg/kg	500mg/kg	1500mg/kg	1500mg/kg
ラット	♂5	♂5	♂5	♂5	♂5

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。

Dimethenamid-P

結果： 結果を以下の表に示す。

群	用量 (mg/kg)	尿量 (mL/100g/6hr)	Na <sup>+</sup> ( $\mu$ Eq/100g/6hr)	K <sup>+</sup> ( $\mu$ Eq/100g/6hr)	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> (比)	Cl <sup>-</sup> ( $\mu$ Eq/100g/6hr)	浸透圧 (mOsm/kg/H <sub>2</sub> O)
溶媒 対照	-	2.6 $\pm$ 0.3	215 $\pm$ 24	46 $\pm$ 9	5.22 $\pm$ 0.94	222 $\pm$ 27	432 $\pm$ 58
P体	150	2.0 $\pm$ 0.1	208 $\pm$ 20	54 $\pm$ 5	3.91 $\pm$ 0.42	237 $\pm$ 21	585 $\pm$ 67
	500	↓ 1.1 $\pm$ 0.4	90 $\pm$ 40	77 $\pm$ 14	↓ 1.15 $\pm$ 0.40	↓ 107 $\pm$ 45	↑ 1074 $\pm$ 151
	1500	↓ 0.1 $\pm$ 0.0	↓ 4 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	↓ 4 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	↓ 0.86 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	↓ 6 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	136 <sup>c</sup>
ラセミ体	1500	↓ 0.1 $\pm$ 0.0	↓ 2 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	↓ 5 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	↓ 1.11 $\pm$ 0.74 <sup>a</sup>	↓ 3 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	619 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>: n=3, <sup>b</sup>: n=2, <sup>c</sup>: n=1,

統計処理: Dunnett test, ↑ ↓: p<0.05, ↓↑: p<0.01

P体及びラセミ体の1500mg/kg群はいずれも投与2~5時間以内に全例が死亡したため、尿量の不足で測定できない動物があった。これら両群では、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>排泄量及びNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>比において対照群と比較して有意に低下した。浸透圧は例数不足であった。

P体の500mg/kg群では尿量、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>比及びCl<sup>-</sup>排泄量において対照群と比較して有意に低下し、浸透圧は有意に増加した。

P体の150mg/kgでは有意な変化は認められなかった。

#### ⑤ 血液凝固に対する作用

供試動物: ラット; CrI:CD(SD)系 1群雄各5匹

投与時週齢7週齢、体重範囲 雄260.8~298.3g

方法: 被験物質の0.5%CMC-Na懸濁液及び溶媒対照を一晩絶食させたラットに強制単回経口投与した。投与1時間後にジエチルエーテル麻酔科で開腹し、後大静脈より血液を採取して3.13%クエン酸Naを添加処理した。遠心分離(4℃、3000rpm、10分間)して血漿を分離し、プロトロンビン時間(PT)及び活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)を測定した。

#### 試験設定

用量群	溶媒対照 (CMC-Na液)	P体			ラセミ体
		150mg/kg	500mg/kg	1500mg/kg	1500mg/kg
ラット	♂5	♂5	♂5	♂5	♂5

結果: 結果を以下の表に示す。

群	用量(mg/kg)	PT(秒)	APTT(秒)
溶媒対照	-	14.7 $\pm$ 0.2	18.2 $\pm$ 0.3
P体	150	14.5 $\pm$ 0.2	17.0 $\pm$ 0.3
	500	14.8 $\pm$ 0.2	↓ 15.7 $\pm$ 0.7
	1500	14.8 $\pm$ 0.4	18.8 $\pm$ 1.4
ラセミ体	1500	14.8 $\pm$ 0.2	16.4 $\pm$ 0.4

統計検定: Dunnett test, ↓: p<0.05

本試験中に動物の死亡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。

Dimethenamid-P

P 体の 500mg/kg 投与群で APTT の有意な短縮が認められたが、用量関連性がないことより偶発的と判断した。よって P 体及びピラセミ体ともに血液凝固系に有意な影響を及ぼさないと判断した。

本試験結果から P 体及びピラセミ体の毒性はほぼ同等であると考えられた。薬理作用において、マウスの電撃痙攣及びラットの血圧上昇作用では P 体がやや強めであったが、両原体はほぼ同程度であると考えられた。

生体機能に及ぼす影響試験の総括表

	試験項目 (供試動物)	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数/群	無作用量 (mg/kg)	作用量 (mg/kg)	結果の概要
①	Irwin 法 一般状態 (マウス)	経口 (0.5%CMC-Na)	溶媒対照 P 体: 150, 500, 1500	♂♀各 3	♂: 150 ♀: 500	♂: 500, 1500 ♀: 1500	500mg/kg 雄 1 例にのみ眼瞼下垂、呼吸数減少及び潮紅が投与後 1-2 時間に認められた。 1500mg/kg 雄全例に眼瞼下垂、呼吸数減少/呼吸困難、潮紅、正向反射の着地不全が認められ、その他、異常歩行、流涙、軟便、警戒性の低下、受動性の低下、拳尾、振戦、ひきつり、腹臥位、肢筋緊張度の低下/抵抗、耳介反射の低下、角膜反射の低下、立毛が投与後 1-6 時間に認められた。 雌ではこれらのほかに疼痛反応の低下、歩行失調、低体温、後肢握力の低下、視覚性置き直し反応の低下、接触反応の鈍化、痙攣、身もだえ、血色不良が投与後 1-6 時間に認められ 2 例が 24 時間以内に死亡した。
			ラセミ体: 1500			-	♂: 1500
	Irwin 法 一般状態 (ラット)	経口 (0.5%CMC-Na)	溶媒対照 P 体: 150, 500, 1500	♂5	♂: 150	♂: 500, 1500	500mg/kg 投与群では全例に流涎が認められた。その他に腹這い歩行、覚醒状態の低下、潮紅、腹臥位、円背位、呼吸緩徐、移動性減少、接触反応の過反応、軟便、流涙、歩行不能、接近反応消失、痛覚反応の消失、腹筋及び肢筋緊張度の低下、後肢の握力低下傾向、後肢着地開脚幅の減少傾向、瞳孔径増大、血色不良が投与後 1~6 時間に認められ、48 時間後までに 4 例が死亡。 1500mg/kg 投与群では全例に呼吸緩徐、眼瞼閉鎖、流涎、覚醒状態の低下、潮紅が認められた。その他に腹臥位、歩行異常、下痢/軟便、接触反応の過反応、血行不良、振戦/強直性伸展痙攣(死亡前 1 例)、接近反応の消失が投与後 1~6 時間に認められ、24 時間後までに全例死亡。
			ラセミ体: 1500			-	♂: 1500

生体機能に及ぼす影響試験の総括表(つづき)

	試験項目 (供試動物)	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数/群	無作用量 (mg/kg)	作用量 (mg/kg)	結果の概要
②	自発運動量の測定 (ラット)	経口 (0.5%CMC-Na)	溶媒対照	♂5	♂ ; 500	♂ ; 1500	1500mg/kg では 3 例の死亡が認められ、有意差はなかったが、自発運動量の抑制傾向が認められた。
			P 体: 150, 500, 1500				-
	電撃痙攣に対する作用 (マウス)	経口 (0.5%CMC-Na)	溶媒対照	♂5	♂ ; 500	♂ ; 1500	1500mg/kg において強直性伸展痙攣誘発閾値 (mA) の有意な低下。
			P 体: 150, 500, 1500				-
③	血圧・心拍数に対する作用 (ラット)	経口 (0.5%CMC-Na)	溶媒対照	♂5	♂ ; 500	♂ ; 1500	1500mg/kg で 4 例死亡。4 時間後に収縮期血圧の有意な上昇。心拍数に有意な変化なし。
			P 体: 150, 500, 1500				-
④	腎機能に対する作用 (ラット)	経口 (0.5%CMC-Na)	溶媒対照	♂5	♂ ; 150	500, 1500	500mg/kg 以上で尿量、Na <sup>+</sup> /k <sup>+</sup> 比及び Cl <sup>-</sup> の有意な低下ならびに浸透圧の有意な上昇。
			P 体: 150, 500, 1500				-
⑤	血液凝固に対する作用 (ラット)	経口 (0.5%CMC-Na)	溶媒対照	♂5	♂ ; 1500	-	被験物質に関連した有意な変化なし。
			P 体: 150, 500, 1500				♂ ; 1500
			ラミ体: 1500				

## 12. その他

### 12-1. マウスを用いた免疫毒性試験 (P 体)

(資料 追 34)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 :

被験物質純度 :

供試動物 : C57BL/6JRj マウス、1 群雌各 8 匹、開始時 48~50 日齢 (平均体重 ; 18.3 g)

投与期間 : 28 日間 ( )

投与方法 : 被験物質を飼料と混合してプレミックスを調製し、0、500、1500 及び 4000 ppm の濃度で飼料に混入して 4 週間にわたり自由に摂食させた。陽性対照であるシクロホスファミド (CPA) は、10 mg/kg/日の用量で 4 週間にわたり強制経口投与した。全動物について、投与終了時に 16~20 時間絶食させた。

用量設定根拠 :

観察・検査項目及び結果 :

一般状態及び死亡率 ; 一般状態及び生死を毎日観察した。

死亡動物はなく、投与による影響は認められなかった。

体重変化 ; 投与開始日及びその後は毎週すべての動物の体重を測定した。

対照群と比較して統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

投与量 (ppm)	500	1500	4000	CPA
体重	14 日		93 ↓ ↓	93 ↓ ↓
	21 日			93 ↓
	28 日			91 ↓ ↓
体重増加量	0~14 日		3 ↓ ↓	9 ↓ ↓
	0~21 日		172 ↑	7 ↓
	0~28 日		176 ↑ ↑	-3 ↓

CPA : 陽性対照 (シクロホスファミド、10 mg/kg 体重/日)

Dunnett' s 検定 (両側) ↑ ↓ : p ≤ 0.05 ↑ ↑ ↓ ↓ : p ≤ 0.01

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

4000 ppm 投与群で、投与後 14 日に対照群と比較して体重及び体重増加量が有意な低値を示した。摂餌量に同様の低下が認められなかったことから、これら所見は被験物質投与による直接的な影響と考えられた。

1500 ppm 投与群の投与後 21 及び 28 日に体重増加量の有意な増加が認められ

たが、用量依存性が認められなかったことから、偶発的なものと判断した。  
陽性対照群では投与後 14 日以降、体重及び体重増加量が顕著に減少した。

摂餌量： 全動物の摂餌量を週 1 回測定した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

投与量 (ppm)	500	1500	4000	CPA
14~21 日			144 ↑ ↑	
21~28 日				73 ↓

CPA：陽性対照（シクロホスファミド、10 mg/kg 体重/日）

Dunnett's 検定（両側） ↓ : p ≤ 0.05    ↑ ↑ : p ≤ 0.01

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したものの。

4000 ppm 投与群の投与後 14~21 日に摂餌量が有意に増加したが、投与後 21 日の摂餌量測定前に 1 つのケージで餌こぼしが観察されたことによるもので、被験物質投与による影響ではなかった。

陽性対照群では、CPA 投与により投与後 21~28 日に摂餌量減少が見られた。

被験物質摂取量：投与期間中の平均被験物質摂取量は以下のとおりであった。

投与量 (ppm)	500	1500	4000
被験物質摂取量 (mg/kg 体重/日)	120	385	1167

飲水量： 全動物の飲水量を、目視観察した。

被験物質投与による影響は認められなかった。

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

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

被験物質投与に関連のある異常は認められなかった。

臓器重量：投与終了後、全動物を 16~20 時間絶食し、イソフルラン麻酔下、断頭により屠殺した。下記の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

腎臓、肝臓、脾臓、胸腺

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

投与量 (ppm)	500	1500	4000	CPA	背景値	
最終体重				92 ↓ ↓	/	
腎臓	重量					
	対体重比	116	107 ↑	115 ↑ ↑		
肝臓	重量		119 ↑ ↑	137 ↑ ↑		90 ↓ ↓
	対体重比	107 ↑	118 ↑ ↑	141 ↑ ↑		
脾臓	重量			82 ↓		
	対体重比					
胸腺	重量		129 ↑ (53.0mg)			(38.2 ~ 60.6mg)
	対体重比		133 ↑ ↑ (0.318)			(0.222 ~0.353)

CPA : 陽性対照 (シクロホスファミド、10 mg/kg 体重/日)

被験物質投与群 : Kruskal-Wallis + Wilcoxon検定 (両側) ↑ :  $p \leq 0.05$  ↑ ↑ :  $p \leq 0.01$

CPA 群 : 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対照群を 100 とした場合の値を表したものの。

( ) 内の数値は絶対値。

肝重量の増加は投与関連と見なされたが、さらなる検査を実施しなかったため病理組織学的な関連は確認できなかった。腎臓の対体重比の増加は用量反応関係が認められなかったことから偶発的なもの見なされた。4000 ppm 投与群で認められた胸腺重量の増加は、この系統のこの齢のマウスでの背景対照データの範囲内であることから偶発的なものと見なされた。

一方、陽性対照である CPA 投与群では予測どおり最終体重、脾臓及び肝臓重量の有意な減少が認められた。

申請者注)

肉眼的病理検査 ; 試験終了時、全動物について剖検を行った。

被験物質投与による異常は認められなかった。

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

Dimethenamid-P

病理組織学的検査；病理組織学的検査は実施しなかった。

プライマリーT細胞依存性抗体反応； 4週間投与終了の7日前、1群8匹全てにヒツジ赤血球 ( $4 \times 10^8$  /mL) 0.5 mL を腹腔内投与して免疫し、投与終了時に採血し、抗 SRBC IgM ELISA を行った。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

投与量 (ppm)	500	1500	4000	CPA
29日				8↓↓

CPA：陽性対照（シクロホスファミド、10 mg/kg 体重/日）

Wilcoxon 検定（両側） ↓↓：p≤0.01

いずれの被験物質投与群にも、抗 SRBC IgM 抗体の抗体価に変化はなかった。陽性対照である CPA 群では顕著な抗体価の減少が見られ、本試験での感受性が確認された。

以上の結果から、マウスを用いた4週間混餌投与による免疫毒性試験において、いずれの投与群にも免疫機能に対する影響は認められなかったことから、免疫毒性に関する無毒性量は4000 ppm (1167 mg/kg 体重/日) であると判断された。

申請者注)

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。

Dimethenamid-P

12-2. ラットにおける肝酵素誘導の検討 (ラセミ体)

(資料 追 25 参考)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書年 :

被験物質の純度 :

供試動物 : SD系ラット 1群雄6匹

試験開始時週齢 約5週齢、体重 188.0-196.2g(群平均)

投与期間 : 主群 ; 4日間投与、回復群 ; 4日間投与 [4日間回復期間]

方 法 :

試験項目及び結果

一般状態及び死亡 ;

体 重 ;

統計学的に有意であったものについて以下の表に示す。

体重増加量 (g)

群	主群				
	用量 (mg/kg)	0	25	100	200
主群 (4日間投与)					
0-3日					
0-4日					
回復群 (4日間投与+4日間休薬)					
0-4日		/			
0-7日					
4-7日					

飼料摂取量 ;



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。

Dimethenamid-P

飼料摂取量 (g/動物/日)

群	主群				
用量 (mg/kg)	0	25	100	200	400
主群 (4日間投与)					
0-4日					
回復群 (4日間投与+4日間休業)					
0-4日		/			
4-7日					

血液性化学的検査：

統計学的に有意な項目を以下に示す。

用量群 (mg/kg)	25	100	200	400
主群				
ALT				
回復群				
CRE	/			
Ca				
P				
Cl				
TP				

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。

Dimethenamid-P

尿検査及び尿生化学的検査：

統計学的有意差の認められた項目を以下の表に示す。

尿検査

用量群 (mg/kg)	25	100	200	400
主群				
尿量				

尿生化学的検査

用量群 (mg/kg)	25	100	200	400
主群				
U-CRE				
U-UREA				
U-PRO				
回復群				
U-LDH				

肉眼的病理検査： 採血後屠殺した動物を肉眼的病理検査に供した。

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。

Dimethenamid-P

臓器重量：

統計学的有意差のみられた項目を以下に示す。

		25	100	200	400
<b>主群（4日間投与）</b>					
最終体重		98.7	97.8	101.1	93.9
腎臓	対体重比				
肝臓					
<b>回復群（4日間投与+4日間休薬）</b>					
最終体重		/			
肝臓					

肝酵素検査：

統計学的有意差の認められた項目を次に示す。

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。

Dimethenamid-P

肝酵素検査結果

用量群 (mg/kg)		25	100	200	400
<b>主群</b>					
A	P450				
	EROD				
	PROD				
	NCPR				
	UDPGT				
B	GHS				
	GST				
<b>回復群</b>					
A	P450				
	EROD				
	PROD				
	NCPR				
	UDPGT				
B	GHS				
	GST				

ミクロゾームにおける P450、PROD 及び EROD は生体外由来物質を酸化する第 I 相の代謝酵素であり、

第 II 相の UDPGT の増加は、酸化されたジメテナミドを抱合する代謝分解の重要なステップの 1 つであると考えられる。

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。

Dimethenamid-P

申請者注)

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。

Dimethenamid-P

(2) 原体混在物及び代謝物の毒性

1. 代謝物の急性毒性

1-1. 代謝物 のラットを用いた急性経口毒性試験 (資料 M-1 代替 既提出 9-1 )

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 :

本試験はラセミ体を用いた試験成績で代替した。

被験物質の純度 :

供試動物 : CD(SD)系ラット、1群雌雄各5匹 投与時週齢 ; 約5週齢、  
投与時体重 ; 雄 86~112g, 雌 81~110g

試験期間 : 14日間観察

方法 : 被験物質を 0.5%メチルセルロースに懸濁して経口投与した。投与前に一晩絶食し、さらに投与後3時間まで絶食した。

試験項目 : 中毒症状及び生死を14日間観察した。個体別体重は投与前日、当日(1日目)、8及び15日目に測定した。試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行なった。

結果 :

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	2000、5000
LD <sub>50</sub> (mg/kg)	> 5000
死亡開始時間及び終了時間	死亡なし
症状発現時間及び消失時間	投与後 15 分から発現 投与後 2 日目に消失
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5000

中毒症状としては雌雄に関係なく活動性の低下、蒼白、立毛、背弯姿勢が認められ、雄の約半数例に流涎が認められた。

剖検所見では、主要な組織器官に特記すべき変化は認められなかった。

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

Dimethenamid-P

1-2. 代謝物 のラットを用いた急性経口毒性試験 (資料 M-2 代替 既提出 9-2)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

本試験はラセミ体を用いた試験成績で代替した。

被験物質の純度：

供試動物：CD(SD)系ラット、1群雌雄各5匹

投与時週齢；約9～12週齢、投与時体重；雄258～276g、雌190～200g

試験期間：14日間観察

方法：被験物質を蒸留水に溶解して経口投与した。投与前に約18時間絶食し、さらに投与後4時間まで絶食した。

試験項目：中毒症状及び生死を14日間観察した。個体別体重は投与当日(0日目)、7日目及び14日目に測定した。試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経口
投与量(mg/kg)	5000
LD <sub>50</sub> (mg/kg)	> 5000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現時間及び消失時間	投与後1時間から発現 投与後3日目に消失
死亡例の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	5000

中毒症状としては、雌雄に関係なく水様便あるいは軟便および肛門生殖器周囲の汚れが認められた。

剖検所見では主要な組織器官に特記すべき変化は認められなかった。