

表 37 2 世代繁殖試験（ラット）で認められた毒性所見

	投与群	親：P、児：F ₁		親：F ₁ 、児：F ₂	
		雄	雌	雄	雌
親動物	750 mg/kg 体重/日	<ul style="list-style-type: none"> ・流涎、被毛汚れ ・体重増加抑制 ・腎比重量増加 ・肝細胞肥大 ・腎好塩基性尿管 	<ul style="list-style-type: none"> ・流涎、被毛汚れ ・体重増加抑制（妊娠期間） ・肝絶対及び比重量増加 ・肝細胞肥大 ・腎好塩基性尿管 ・発情周期延長 ・交尾までの日数増加 ・妊娠期間延長 ・着床数減少 ・同腹児数減少 	<ul style="list-style-type: none"> ・流涎、被毛汚れ ・肝比重量増加 ・腎比重量増加 ・肝細胞肥大 ・腎好塩基性尿管 	<ul style="list-style-type: none"> ・流涎、被毛汚れ ・体重増加抑制（妊娠期間） ・摂餌量減少（哺育期間） ・肝比重量増加 ・肝細胞肥大 ・腎好塩基性尿管 ・発情周期延長 ・交尾までの日数増加 ・妊娠期間延長 ・着床数減少 ・同腹児数減少
	100 mg/kg 体重/日以上	・肝絶対及び比重量増加	毒性所見なし	・体重増加抑制	毒性所見なし
	10 mg/kg 体重/日	毒性所見なし		毒性所見なし	
児動物	750 mg/kg 体重/日	<ul style="list-style-type: none"> ・流涎（離乳後） ・体重増加抑制 ・包皮分離遅延 ・脾絶対重量減少 	<ul style="list-style-type: none"> ・流涎（離乳後） ・体重増加抑制 ・膻開口日短縮 ・脾絶対及び比重量減少 	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・脾絶対重量減少 	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・脾絶対及び比重量減少
	100 mg/kg 体重/日以下	毒性所見なし		毒性所見なし	

② 発生毒性試験（ラット）（i）

Wistar ラット（Hsd Cpd:WU、一群雌 26 匹）の妊娠 6～19 日に強制経口（原体：0、80、500 及び 1,000 mg/kg 体重/日、溶媒：0.5%CMC 水溶液）投与する発生毒性試験が実施された。

各投与群で認められた毒性所見は表 38 に示されている。

本試験において、500 mg/kg 体重/日以上投与群の母動物で体重増加抑制等、1,000 mg/kg 体重/日投与群の胎児で低体重等が認められたので、無毒性量は母動物で 80 mg/kg 体重/日、胎児で 500 mg/kg 体重/日であると考えられた。小眼球症の増加については、後述する発生毒性試験(ii)[8. (6)③]の結果、本検体の特異的な作用ではなく、検体の母動物に対する影響の結果、本系統のラットが有する自然発生病変が増強されたものと考えられた。また、全投与群で、第 14 肋骨が増加したが（出現頻度：対照群から順に 0.7%、7.1%、10.6%、25.2%）、そのほとんどが痕跡状のものであり、かつ 500 mg/kg 体重/日以下投与群では、背景データの範囲内（背景データ最高値：24.4%、1990～1994

年)であったことが、後述する発生毒性試験[8. (6)③及び9. (6)④]で確認されている。(参照 39)

表 38 発生毒性試験 (ラット) (i) で認められた毒性所見

投与群	母動物	胎児
1,000 mg/kg 体重/日	<ul style="list-style-type: none"> ・ 摂餌量減少 ・ ALT 及び ALP 増加 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 低体重 (雌雄) ・ 小眼球症 ・ 第 14 肋骨 (痕跡または点) ・ 第 6 胸骨体不完全骨化 ・ 第 4 尾椎骨体不完全骨化
500 mg/kg 体重/日 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ 排尿行動増加 ・ 体重増加抑制* ・ 飲水量増加 ・ T.Chol 増加、T₄ 減少 	500 mg/kg 体重/日以下毒性所見なし
80 mg/kg 体重/日	毒性所見なし	

* : 補正体重増加量 [= (妊娠 20 日の体重 - 妊娠 0 日の体重) - (妊娠子宮重量)] の減少として認められた。

③ 発生毒性試験 (ラット) (ii)

Wistar Hannover ラット (CrI:WI(HAN)、一群雌 25 匹) の妊娠 6~19 日に強制経口 (原体 : 0、20、80 及び 750 mg/kg 体重/日、溶媒 : 0.5% CMC 水溶液) 投与する発生毒性試験が実施された。本試験は、先に実施された発生毒性試験(i) [8. (6)②] の 1,000 mg/kg 体重/日投与群において認められた、小眼球症及び第 14 肋骨 (痕跡または点) の増加について、これらが母動物の毒性に起因して、試験に用いた動物の系統に依存した自然発生性の変化を増加させたものであることを明らかにするために実施した。本試験では自然発生性の小眼球症が少ないとされる系統のラットを用いた。

各投与群において認められた毒性所見は表 39 に示されている。

胎児における外表検査では、小眼球症はいずれの試験群においても認められなかった。眼球に対する精査の結果、眼球の重量、角膜の直径及び面積、眼球の直径及び長さにおいて、対照群と各投与群との間に差は認められなかった。

骨格検査では、750 mg/kg 体重/投与群で第 14 肋骨の痕跡の発生頻度が増加した。第 14 肋骨は骨格変異であり、骨格異常に分類される所見が発現していないことから、催奇形性を示唆するものではないと判断した。

本試験において、750 mg/kg 体重/日投与群の母動物で体重増加抑制、摂餌量減少等、胎児で第 14 肋骨 (痕跡) の発生頻度増加が認められたので、無毒性量は母動物及び胎児で 80 mg/kg 体重/日と考えられた。(参照 40)

表 39 発生毒性試験（ラット）（ii）で認められた毒性所見

投与群	母動物	胎児
750 mg/kg 体重/日	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制 ・ 摂餌量減少 ・ 飲水量増加 ・ BUN、T.Chol 及び ALP 増加 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 第 14 肋骨（痕跡）増加
80 mg/kg 体重/日 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

④ 発生毒性試験（ラット）（iii）

Wistar Hannover ラット（CrI:WI(HAN)、一群雌 29～30 匹）の妊娠 6～19 日に経皮 [I. 原体群（原体：1,000 mg/kg 体重/日、原体純度 98.8%、湿らせた原体のみ）、II. 乳剤群（プロチオコナゾール 25%、有効成分 250 mg/kg 相当）、III. 乳剤希釈群（乳剤を脱イオン水で 4 倍希釈、有効成分 62.5 mg/kg 相当）、IV. 対照群（0 mg/kg 体重/日、脱イオン水のみ）、6 時間/日] 投与する発生毒性試験が実施された。

母動物及び胎児で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。

本試験における無毒性量は、母動物及び胎児で本試験の最高用量 1,000 mg/kg 体重/日と考えられた。催奇形性は認められなかった。（参照 41）

⑤ 発生毒性試験（ウサギ）

チンチラウサギ（一群雌 24 匹）の妊娠 6～27 日に強制経口（原体：0、10、30、80 及び 350 mg/kg 体重/日、溶媒：0.5%CMC 水溶液）投与する発生毒性試験が実施された。

母動物において、350 mg/kg 体重/日投与群では、体重増加抑制及び摂餌量減少が認められた。同群では、流産動物数及び全吸収胚動物が各 3 例に認められた結果として着床後死胚数（初期）及び率の増加、生存胎児数減少が認められ、母動物に対する毒性の結果によるものと考えられた。

胎児において、350 mg/kg 体重/日投与群の雌雄に低体重が認められ、低体重に関連したと考えられる第 5 胸骨体及び後肢末節骨の骨化遅延が認められた。

本試験における無毒性量は、母動物及び胎児で 80 mg/kg 体重/日であると考えられた。催奇形性は認められなかった。（参照 42）

(7) 遺伝毒性試験

プロチオコナゾール原体の細菌を用いた復帰突然変異試験、チャイニーズハムスター肺由来培養細胞を用いた染色体異常試験及び遺伝子突然変異試験、ラット肝初代培養細胞を用いた *in vitro* 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験、

ラットを用いた *in vivo* UDS 試験及びマウス骨髄細胞を用いた小核試験が実施された。

試験結果は表 40 に示されている。その結果、染色体異常試験において、構造的染色体異常が増加し、ラット肝初代培養細胞を用いた UDS 試験では弱い DNA 損傷性が疑われた。しかし、*in vivo* における UDS 試験、小核試験ではすべて陰性であったことを考慮すると、プロチオコナゾールに生体にとって問題となる遺伝毒性はないと考えられた。(参照 43~49)

表 40 遺伝毒性試験概要 (原体)

試験	対象	処理濃度・投与量	結果	
<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537 株)	①16~5,000 µg/7° レト (+/-S9) ②1.6~500µg/7° レト (+/-S9)	陰性
	染色体異常試験	チャイニーズハムスター肺由来培養細胞 (V79)	4 時間処理 : 75~150 µg/mL (+/-S9) 4 時間処理 (追加試験) : 50~100 µg/mL (+/-S9)	陽性*
	遺伝子突然変異試験 (HPRT 前進突然変異試験)	チャイニーズハムスター肺由来培養細胞 (V79)	①25~175 µg/mL (-S9) ②5~150 µg/mL (-S9) ①②75~200 µg/mL (+S9)	陰性
	UDS 試験	ラット肝初代培養細胞	①1~40 µg/mL ②0.5~20 µg/mL	陽性**
<i>in vivo</i> / <i>in vitro</i>	UDS 試験	Wistar ラット (肝細胞) (一群雄 4 匹)	2,500、5,000 mg/kg (単回経口投与) 投与 4、16 時間後	陰性
<i>in vivo</i>	小核試験	NMRI マウス (骨髄細胞) (一群雌雄各 5 匹)	250 mg/kg 体重 (単回腹腔内投与) 投与 16、24、48 時間後	陰性
	小核試験	NMRI マウス (骨髄細胞) (一群雄 5 匹)	50、100、200 mg/kg 体重 (2 回腹腔内投与) 最終投与 24 時間後	陰性

注) +/-S9 : 代謝活性化系存在下及び非存在下

* : 染色体の構造的異常が認められた (数的異常の増加はなし)。

** : 用量相関性がないものの、修復期細胞の有意な増加 (1 回目試験 5 及び 10 µg/mL、2 回目試験 10 及び 15 µg/mL で有意に増加) が認められた。

9. 代謝物 M17 を用いた毒性試験

(1) 急性毒性試験

代謝物 M17 を用いた急性毒性試験が実施された。結果は表 41 に示されている。(参照 50~52)

表 41 急性毒性試験結果概要 (代謝物 M17)

投与経路	動物種 性別・匹数	LD ₅₀ (mg/kg 体重)		観察された症状
		雄	雌	
経口*	Wistar ラット 雌雄各 5 匹	2,806	2,506	雄 500 mg/kg 体重以上、雌 1,000 mg/kg 体重以上で、運動性低下、立毛、負過呼吸、反射の低下 雄 2,500 mg/kg 体重、雌 2,000 mg/kg 体重以上で死亡例
経皮	Wistar ラット 雌雄各 5 匹	>5,000	>5,000	症状及び死亡例なし
吸入	Wistar ラット 雌雄各 5 匹	LC ₅₀ (mg/L)		症状及び死亡例なし
		>5.07	>5.07	

* : 溶媒として 1% Cremophor EL 水溶液を用いた。

(2) 眼・皮膚に対する刺激性及び皮膚感作性試験

NZW ウサギ (一群雌 3 匹) を用いた眼及び皮膚刺激性試験が実施された。眼及び皮膚に対する刺激性は認められなかった。(参照 53、54)

DH モルモットを用いた皮膚感作性試験 (Buehler 法) が実施された。皮膚感作性は陰性であった。(参照 55)

(3) 亜急性毒性試験

① 90 日間亜急性毒性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 10 匹) を用いた混餌 (代謝物 M17 : 0、30、125、500 及び 2,000 ppm : 平均検体摂取量は表 42 参照) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。0 及び 2,000 ppm 投与群 (一群雌雄各 10 匹) については別途回復群を設け、5 週間の回復期間を設定した。

表 42 90 日間亜急性毒性試験 (ラット) の平均検体摂取量

投与群		30 ppm	125 ppm	500 ppm	2,000 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	2.2	9.7	37.2	162
	雌	3.0	12.4	50.9	212

各投与群で認められた毒性所見は表 43 に示されている。

肝臓中の肝薬物代謝酵素測定において、N-DEM が雄の全投与群、O-DEM が雄の 30 及び 125 ppm 投与群及び雌の 30 ppm 投与群、また、P450 が雄の 30 ppm 投与群で減少したが、毒性学的意義は不明であった。さらに、P450 が雌の 125 ppm 投与群、肝臓中 TG が 125 及び 30 ppm 投与群で増加したが、肝重量の変動または肝の形態学的変化が認められていないことから、これらの変化の毒性学的意義も不明であった。

本試験において、125 ppm 投与群の雄で肝細胞肥大及び空胞化等、500 ppm 投与群の雌で肝比重量増加、肝細胞肥大等が認められたので、無毒性量は雄で 30 ppm (2.2 mg/kg 体重/日)、雌で 125 ppm (12.4 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 56)

表 43 90 日間亜急性毒性試験 (ラット) で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
2,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制 ・ AST、ALT、ALP 及び GLDH 増加 ・ O-DEM 増加 ・ 肝絶対及び比重量増加 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制 ・ ALT 及び T.Chol 増加 ・ 肝絶対重量増加 ・ 肝腫大 ・ 肝細胞空胞化 (3 例)、び慢性肝細胞脂肪化 (2 例)、小葉中間帯/中心性肝細胞脂肪化 (1 例)
500 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ TG 減少 ・ P450 増加 ・ 肝臓中 TG 増加 ・ 肝腫大及び退色 	<ul style="list-style-type: none"> ・ N-DEM、O-DEM、P450 及び肝臓中 TG 増加 ・ 肝比重量増加 ・ 肝細胞肥大
125 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ 肝細胞肥大、肝細胞空胞化、小葉中間帯/中心性肝細胞脂肪化 	125 ppm 以下毒性所見なし
30 ppm	毒性所見なし	

② 90 日間亜急性毒性試験 (マウス)

B6C3F1 マウス (一群雌雄各 10 匹) を用いて混餌 (代謝物 M17 : 0、40、200、1,000 及び 5,000 ppm : 平均検体摂取量は表 44 参照) 投与し、90 日間亜急性毒性試験が実施された。

表 44 90 日間亜急性毒性試験 (マウス) の平均検体摂取量

投与群		40 ppm	200 ppm	1,000 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	11.5	58.9	294
	雌	16.0	79.5	392

各投与群で認められた毒性所見は表 45 に示されている。

5,000 ppm 投与群の雌雄では、投与開始後うずくまり、活動低下、一般状態の悪化が認められ、投与開始 1 週後までに全動物が死亡または切迫殺した。

肝臓中の肝薬物代謝酵素測定において、40 ppm 投与群の雄で EROD 及び ALD の増加が認められたが、同群においては、肝重量の変動または肝の形態学的変化が伴っていないことから、毒性学的意義は不明であった。また、40 及び 200 ppm 投与群の雄において GST の減少が認められたが、この変化についても毒性学的意義は不明であった。

本試験において、200 ppm 投与群の雄で体重増加抑制、肝細胞肥大等、40

ppm 投与群の雌で肝細胞肥大が認められたので、無毒性量は雄で 40 ppm (11.5 mg/kg 体重/日)、雌で 40 ppm (16.0 mg/kg 体重/日) 未満であると考えられた。(参照 57)

表 45 90 日間亜急性毒性試験 (マウス) で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
5,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・全動物死亡または切迫と殺 ・うずくまり、活動低下、一般状態悪化 ・肝細胞空胞化 (主に雄)、肝細胞壊死 ・脾ろ胞萎縮、赤脾髄細胞数減少、色素貪食マクロファージ ・腺胃部多発性びらん (雄 1 例、雌 2 例) 	
1,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・RBC、Ht 及び MCV 減少、MCH 及び MCHC 増加 ・AST、ALT、GLDH 及び TG 増加、T.Chol 減少 ・肝小葉構造明瞭化 ・小葉中心性肝細胞空胞化 (脂肪化)、限局性肝細胞壊死 	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・AST、ALT、GLDH 及び BUN 増加、T.Chol 減少 ・GST 増加 ・肝小葉構造明瞭化 ・限局性肝細胞壊死 ・卵巣出血性変化
200 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・ALP 増加、Alb 減少 ・ECOD 及び EROD 増加 ・肝絶対及び比重量増加、脾絶対及び比重量増加 ・肝細胞肥大 	<ul style="list-style-type: none"> ・ECOD 及び EROD 増加 ・肝絶対及び比重量増加 ・肝細胞単細胞壊死
40 ppm	毒性所見なし	・肝細胞肥大

③ 90 日間亜急性毒性試験 (イヌ)

ビーグル犬 (一群雌雄各 4 匹) を用いて混餌 (代謝物 M17 : 0、40、200 及び 1,000 ppm : 平均検体摂取量は表 46 参照) 投与し、90 日間亜急性毒性試験が実施された。

表 46 90 日間亜急性毒性試験 (イヌ) の平均検体摂取量

投与群		40 ppm	200 ppm	1,000 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	1.58	7.81	37.8
	雌	1.62	8.53	42.8

各投与群で認められた毒性所見は表 47 に示されている。

本試験において、1,000 ppm 投与群の雌雄で肝細胞細胞質好酸性化等が認められたので、無毒性量は雌雄とも 200 ppm (雄 : 7.81 mg/kg 体重/日、雌 : 8.53 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 58)

表 47 90 日間亜急性毒性試験（イヌ）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
1,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ N-DEM、O-DEM、P450、TG、ECOD、EH 及び GST 増加 ・ 肝細胞細胞質好酸性化 	<ul style="list-style-type: none"> ・ N-DEM、O-DEM、P450、TG、ECOD 及び EH 増加 ・ 肝絶対及び比重量増加 ・ 肝細胞細胞質好酸性化
200 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

④ 30 週間亜急性毒性試験（イヌ）

ビーグル犬（一群雌雄各 4 匹）を用いて混餌（代謝物 M17：0、40、300 及び 2,000 ppm：平均検体摂取量は表 48 参照）投与し、30 週間亜急性毒性試験が実施された。

表 48 30 週間亜急性毒性試験（イヌ）の平均検体摂取量

投与群		40 ppm	300 ppm	2,000 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	1.35	10.1	69.8
	雌	1.54	11.1	77.2

各投与群で認められた毒性所見は表 49 に示されている。

本試験において、2,000 ppm 投与群の雌雄で ALP 増加、肝細胞細胞質好酸性化等が認められたので、無毒性量は雌雄とも 300 ppm（雄：10.1 mg/kg 体重/日、雌：11.1 mg/kg 体重/日）であると考えられた。（参照 60）

表 49 30 週間亜急性毒性試験（イヌ）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
2,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ ALP 増加 ・ N-DEM、O-DEM、P450 及び肝臓中 TG 増加 ・ 肝絶対及び比重量増加 ・ 肝細胞細胞質好酸性化 ・ T₄ 減少 	<ul style="list-style-type: none"> ・ ALP 増加 ・ N-DEM、O-DEM、P450 及び肝臓中 TG 増加 ・ 肝絶対及び比重量増加 ・ 肝細胞細胞質好酸性化 ・ T₄ 減少
300 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

(4) 慢性毒性試験及び発がん性試験

① 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験（ラット）

Wistar ラット（一群雌雄各 60 匹）を用いた混餌（代謝物 M17：0、20、140 及び 980 ppm：平均検体摂取量は表 50 参照）投与による 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験が実施された。

表 50 2年間慢性毒性/発がん性併合試験（ラット）の平均検体摂取量

投与群		20 ppm	140 ppm	980 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	1.1	8.0	57.6
	雌	1.6	11.2	77.4

各投与群で認められた毒性所見は表 51 に示されている。

病理組織学的検査において、980 ppm 投与群の雌で、卵巣のう胞の増加及び萎縮の発生頻度減少が認められ、卵巣の比重量増加と関連した変化であるが、加齢性変化の遅延に伴った所見と考えられた。また、同群の雌に認められた脳の側頭葉圧迫及び水頭症/脳室拡張の発生頻度減少は、下垂体腫瘍の発生頻度の減少に関連した変化と考えられた。この他に、980 ppm 投与群の雄で下垂体前葉のう胞の発生頻度増加が認められたが、その発生頻度は背景データの範囲内 (3/50~11/50 匹) であり、毒性変化ではないと考えられた。また、雌で脊髄の神経根神経症発生頻度増加が認められたが、その他の神経組織において増加した病変はないことから自然発生病変である可能性が高く、毒性学的意義に乏しい変化と考えられた。

腫瘍性病変の発生頻度に検体投与の影響は認められなかった。

本試験において、140 ppm 以上投与群の雌雄で肝細胞空胞化及び脂肪化等が認められたので、無毒性量は雌雄とも 20 ppm (雄: 1.1 mg/kg 体重/日、雌: 1.6 mg/kg 体重/日) であると考えられた。発がん性は認められなかった。(参照 59)

表 51 2年間慢性毒性/発がん性試験（ラット）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
980 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ Hb、Ht 及び MCHC 減少 ・ TG 減少 ・ 肝絶対及び比重量増加 ・ 肝腫大 ・ 小葉中心性肝細胞脂肪化、肝細胞肥大、肝細胞細胞質好酸性化 ・ 変異肝細胞巢（明細胞）及び胆管過形成減少 ・ 甲状腺 C 細胞限局性過形成 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制 ・ RBC、Hb 及び Ht 減少 ・ 肝比重量増加 ・ 肝小葉像明瞭化（1例）、肝のう胞 ・ 肝細胞肥大、肝細胞細胞質好酸性化 ・ 肺泡沫細胞集簇 ・ 甲状腺コロイド内鈣質沈着 ・ 副腎皮質限局性肥大
140 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ 肝退色（140 ppm 投与群では 2例） ・ 肝細胞空胞化、肝細胞脂肪化（単細胞） 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 肝細胞空胞化、肝細胞脂肪化（単細胞）
20 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

② 2年間発がん性試験（マウス）

B6C3F1 マウス（一群雌雄各 60 匹、うち、一群雌雄各 10 匹：12 カ月と

殺群) を用いて混餌 (代謝物 M17 : 0、12.5、50 及び 200 ppm : 平均検体摂取量は表 52 参照) 投与し、2 年間発がん性試験が実施された。

表 52 2 年間発がん性試験 (マウス) の平均検体摂取量

投与群		12.5 ppm	50 ppm	200 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	3.1	12.8	51.7
	雌	5.1	20.3	80.0

各投与群で認められた毒性所見は表 53 に示されている。

血液生化学的検査では、雄の全投与群において TG の減少が 12 及び 24 カ月時に認められた。12 カ月時における TG の減少は、明らかな用量相関性がないこと及び背景データに比べ対照群が高値を示していたことから、偶発的な変化であると考えられた。また、24 カ月時における TG の減少は、明らかな用量相関性がないこと及び各投与群の個体値はいずれも背景データ値の範囲内にあることから、偶発的な変化であると考えられた。

腫瘍性病変の発生頻度に検体投与の影響は認められなかった。

本試験において、50 ppm 以上投与群の雌雄で小葉中心性肝細胞脂肪化が認められたので、無毒性量は雌雄とも 12.5 ppm (雄 : 3.1 mg/kg 体重/日、雌 : 5.1 mg/kg 体重/日) であると考えられた。発がん性は認められなかった。(参照 61)

表 53 2 年間発がん性試験 (マウス) で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
200 ppm	・肝比重量増加	・肝細胞肥大 (12 カ月時のみ)
50 ppm 以上	・小葉中心性肝細胞脂肪化	・小葉中心性肝細胞脂肪化
12.5 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

(5) 生殖発生毒性試験

① 2 世代繁殖試験 (ラット)

SD ラット (一群雌雄各 30 匹) を用いた混餌 (代謝物 M17 : 0、40、160 及び 640 ppm : 平均検体摂取量は表 54 参照) 投与による 2 世代繁殖試験が実施された。

表 54 2 世代繁殖試験 (ラット) の平均検体摂取量

投与群			40 ppm	160 ppm	640 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	P 世代	雄	2.7	10.4	42.6
		雌	3.0	12.0	49.5
	F ₁ 世代	雄	2.5	10.0	41.2
		雌	4.8	18.6	72.6

各投与群で認められた毒性所見は表 55 に示されている。

親動物では 640 ppm 投与群において難産が認められた (P 世代で 4 例、F₁ 世代で 3 例)。

児動物においては、640 ppm 投与群 F₁ 動物の剖検所見で、腎盂拡張、尿管拡張及び肝肥大の発生頻度が出生 0~4 日後の児動物で増加したが、哺乳 21 日後の児動物及び F₂ 動物には認められなかったので、検体投与の影響ではないと考えられた。

本試験において、親動物では 160 ppm 投与群の雄 (P 及び F₁) で肝細胞空胞化 (小葉中心性肝細胞脂肪化)、640 ppm 投与群の雌 (P 及び F₁) で難産、肝細胞空胞化 (小葉中心性肝細胞脂肪化) 等、児動物では 640 ppm 投与群の雌雄で同腹児数減少、体重増加抑制等が認められたので、無毒性量は親動物の雄で 40 ppm (P 雄: 2.7 mg/kg 体重/日、F₁ 雄: 2.5 mg/kg 体重/日)、雌で 160 ppm (P 雌: 12.0 mg/kg 体重/日、F₁ 雌: 18.6 mg/kg 体重/日)、児動物は雌雄とも 160 ppm (P 雄: 10.4 mg/kg 体重/日、F₁ 雄: 10.0 mg/kg 体重/日、P 雌: 12.0 mg/kg 体重/日、F₁ 雌: 18.6 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 62)

表 55 2 世代繁殖試験 (ラット) で認められた毒性所見

	投与群	親: P、児: F ₁		親: F ₁ 、児: F ₂	
		雄	雌	雄	雌
親動物	640 ppm	・肝絶対及び比重量増加	・難産、切迫と殺 (4 例) ・摂餌量減少 ・肝絶対及び比重量増加 ・肝細胞空胞化 (小葉中心性肝細胞脂肪化) ・肝細胞壊死	・体重増加抑制	・難産、切迫と殺 (3 例) ・肝絶対及び比重量増加 ・肝細胞空胞化 (小葉中心性肝細胞脂肪化) ・肝細胞壊死
	160 ppm 以上	・肝細胞空胞化 (小葉中心性肝細胞脂肪化)	160 ppm 以下毒性所見なし	・肝細胞空胞化 (小葉中心性肝細胞脂肪化)	160 ppm 以下毒性所見なし
	40 ppm	毒性所見なし		毒性所見なし	
児動物	640 ppm	・同腹児数減少 ・出生 4 日後生存率減少 ・体重増加抑制		・同腹児数減少 ・出生 4 日後生存率減少 ・体重増加抑制	
	160 ppm 以下	毒性所見なし		毒性所見なし	

② 発生毒性試験 (ラット) (i)

Wistar ラット (一群雌 25 匹: 妊娠 21 日帝王切開群、一群雌 10 匹: 妊娠 16 日帝王切群) の妊娠 6~15 日に経口 (代謝物 M17: 0、10、30 及び 100 mg/kg

体重/日、溶媒：0.5% Cremophor EL 水溶液) 投与する発生毒性試験が実施された。

各投与群で認められた毒性所見は表 56 に示されている。

妊娠 16 日で帝王切開した母動物については、肝機能検査 (ALT 及び AST 測定) 及び肝の病理組織学的検査を実施した、その結果、ALT 及び AST 活性に影響は認められなかった。

本試験において、100 mg/kg 体重/日以上投与群の母動物で体重増加抑制等、10 mg/kg 体重/日以上投与群の胎児で第 14 肋骨の増加が認められたので、無毒性量は母動物で 30 mg/kg 体重/日、胎児で 10 mg/kg 体重/日未満であると考えられた。(参照 63)

表 56 発生毒性試験 (ラット) (i) で認められた毒性所見

投与群	母動物	胎児
100 mg/kg 体重/日	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制 a,b ・ 摂餌量減少 a,b ・ 肝絶対及び比重量増加 a ・ 肝炎症巣程度増加 a、小葉中心性肝細胞肥大 a、小葉中心性肝細胞脂肪化 a ・ 着床後死胚数及び率増加 b、生存胎児数減少 b 	
30 mg/kg 体重/日以上	30 mg/kg 体重/日以下 毒性所見なし	<ul style="list-style-type: none"> ・ 胸骨体、第 1 頸椎体、四肢の基節骨の不完全骨化または未骨
10 mg/kg 体重/日以上		<ul style="list-style-type: none"> ・ 第 14 肋骨増加

a : 妊娠 16 日帝王切開群

b : 妊娠 21 日帝王切開群

③ 発生毒性試験 (ラット) (ii)

Wistar ラット (一群雌 25 匹) の妊娠 6~19 日に経口 (代謝物 M17 : 0、1 及び 3 mg/kg 体重/日、溶媒 : 0.5% Cremophor EL 水溶液) 投与する発生毒性試験が実施された。本試験は、先に実施された発生毒性試験 (i) [9. (6) ②] で 10 mg/kg 体重/日投与群の胎児において第 14 肋骨増加が認められ、胎児の無毒性量が設定できなかつたので、無毒性量を得るために、さらに低用量を設定した。

母動物においては、検体投与の影響は認められなかった。

胎児における骨格検査で、3 mg/kg 体重/日投与群で第 14 肋骨の発生頻度が増加した (左側 25%、右側 26%)。しかし、この発生頻度は背景データ (左 : 5~32%、右 : 3~27%) の範囲内にあること、この変化を有する胎児をもつ母動物に有意差はなかつたことから、この発生頻度増加は検体投与に関連しない偶発的な所見と考えられた。

本試験における無毒性量は、母動物及び胎児で本試験の最高用量 3 mg/kg 体重/日と考えられた。(参照 64)

④ 発生毒性試験（ラット）＜第 14 肋骨の再評価＞

先に実施されたラットを用いた発生毒性試験(i)[9. (6)②]及び(ii)[9. (6)③]において、第 14 肋骨の発生頻度増加が認められたが、その程度については検査されていなかった。したがって、この第 14 肋骨の程度を骨格標本から再度精査した。

過剰肋骨の長さから、正常肋骨の半分以上の長さのものを過剰肋骨、それに満たない長さの点状あるいはコマ状のものを痕跡とした。

第 14 肋骨の再評価の結果は表 57 に示されている。

表に示されているように、第 14 肋骨は各群ともほとんどが痕跡に分類された。過剰肋骨に分類されたのは、各群で 0~2 例であり、低頻度であった。この発生頻度に用量相関性もみられず、検体投与の影響とは考えられなかった。また、痕跡については 3 mg/kg 体重/日投与群で発生頻度が増加したが、本試験の対照群の発生頻度と同等であること、及び背景データ内であること、さらに第 14 肋骨を有する胎児をもつ母動物数に有意差はないことから、検体投与の影響とは考えられなかった。(参照 65)

表 57 発生毒性試験における第 14 肋骨の再評価

試験	本試験	追加試験		
		0	1	3
投与群 (mg/kg 体重/日)	0	0	1	3
各試験における検査胎児数	156	146	133	155
第 14 肋骨を有した胎児数	38	17	19	43
痕跡	35(22.4%)	16(11.0%)	19(14.3%)	43(27.7%)
過剰肋骨	2 (1.3%)	0 (0.0%)	1 (0.75%)	2 (1.3%)
計	35(22.4%)	16(11.0%)	19(14.3%)	43(27.7%)

⑤ 発生毒性試験（ラット）(iii)

Wistar ラット(群構成は表 58 参照)の妊娠 6~15 日に経口(代謝物 M17: 0 及び 30 mg/kg 体重/日、溶媒: 0.5% Cremophor EL 水溶液)投与する発生毒性試験が実施された。本試験は、先に実施された発生毒性試験(i)[9. (6)②]において 10 mg/kg 体重/日投与群の胎児で認められた第 14 肋骨が、出生後の発育過程でどのように推移するかを調べる目的で実施された。したがって、妊娠 20 日の胎児(帝王切開群)と生後 6 週児(生育群)について、第 14 肋骨の発現が精査された。

表 58 発生毒性(ラット)(iii)における群構成

投与量 (mg/kg 体重/日)	0	30*
帝王切開群	15	16
生育群	15	23

*：当初、各群 30 匹で開始したが死亡や十分な児動物が得られなかったことから 9 匹を追加した。

母動物においては、帝王切開群及び生育群ともに一般状態、体重変化、摂餌量、剖検所見、受胎率及び妊娠率に検体投与の影響は認められなかった。帝王切開群、生育群ともに哺育率が減少した。これは、生後 6 日以内に 21 匹中 5 匹の雌の同腹児がすべて死亡したことによるものであった。その他に、帝王切開群では胎盤重量増加、数例に胎盤のうっ血及び壊死状の辺縁部、また、生育群では同腹児減少がみられ、その後も児動物の死亡が認められ、これらの児動物ではミルクスポットがみられなかったことから、母動物の哺育能への影響が示唆された。

児動物では、生育群の哺育 21 日の生存率が 30 mg/kg 体重/日投与群で減少した。

胎児における骨格検査で、30 mg/kg 体重/日投与群の帝王切開群ですべての胎児において、第 14 の位置に痕跡または過剰肋骨が認められ、その発生頻度は有意に高かった（痕跡：対照群 50.0%、投与群 57.1%、過剰肋骨：対照群 7.1%、投与群 42.9%）。また、第 15 及び 16 位においても 30 mg/kg 体重/日投与群では低頻度に痕跡が認められた。第 14 肋骨の発生頻度増加以外にも、口蓋裂、前肢の骨異形成、胸骨や舌骨等での骨化遅延が認められた。生育群において、第 14 の位置に痕跡または過剰肋骨が認められ、その発生頻度は有意に高かった（痕跡：対照群 15.4%、投与群 18.8%、過剰肋骨：対照群 0%、投与群 56.3%）。しかし、第 15 及び 16 位には痕跡はなかった。

生後 6 週時の結果と帝王切開時の結果を比較すると、過剰肋骨の頻度に差はみられなかったが、痕跡については、対照群及び投与群ともに生後 6 週時において発生頻度が減少した。また、投与群で低頻度ながら発現していた第 15 及び 16 位の痕跡も生後 6 週時には認められなかった。

本試験において、妊娠 20 日にみられる肋骨の痕跡（コンマ状及び点状）は生後の発育過程でその多くが消失することが示唆された、また、過剰肋骨は発育過程でほとんど消失しないと考えられた。（参照 66）

⑥ 発生毒性試験（ウサギ）

Himalayan ウサギ（一群雌 15 匹）の妊娠 6～18 日に経口（代謝物 M17：0、2、10 及び 50 mg/kg 体重/日、溶媒：0.5% Cremophor EL 水溶液）投与する発生毒性試験が実施された。

母動物においては、50 mg/kg 体重/日投与群で3例に血液様排泄物（全吸収胚あるいはほとんどが吸収胚であったことに関連）、体重増加抑制、肝の病理組織学的検査において肝細胞肥大、受胎率減少、着床後死胚数及び死胚率増加及び生存胎児数の減少が認められた。

10 mg/kg 体重/日以上投与群において肝臓のクッパー細胞集簇、円形細胞浸潤（限局性）及び肝細胞細胞質の好酸性化が認められた。

2及び10 mg/kg 体重/日投与群においては、着床後死胚数及び死胚率の増加が認められたが、用量相関性がないこと及び背景データ内であることから、これらの変化については検体投与の影響とは考えられなかった。

胎児においては、50 mg/kg 体重/日投与群で5例（2腹）に口蓋裂、10 mg/kg 体重/日投与群で2例に重複奇形（2腹）及び5例（3腹）に関節湾曲が認められ、10 mg/kg 体重/日以上投与群で奇形を有する1腹あたりの胎児数が増加した（対照群：0.13、10 mg/kg 体重/日投与群：0.54、50 mg/kg 体重/日投与群：0.70）。関節湾曲については、10 mg/kg 体重/日投与群で5例、50 mg/kg 体重/日投与群で1例の発生であり、用量相関性がないこと、及び背景データとの比較により、胎児単位ではわずかに高値（背景データ最高値：5.6%、本試験：7.6%）を示したが、腹単位では背景データ以下であった（背景データ最高値：31.3%、本試験：23.1%）ことから、検体投与との関連性は低いものと考えられた。口蓋裂については、胎児単位及び腹単位とも背景データより高値を示した。口蓋裂の認められた50 mg/kg 体重/日投与群においては、母動物に体重増加抑制、肝細胞肥大等の母毒性が認められた。また、口蓋裂は、ラットよりウサギの方が発生率が高く、母動物に毒性的影響を与える投与量でその発生が増加しやすい奇形の1つであると考えられている。したがって、本試験で認められた口蓋裂の増加は、自然発生性の奇形が検体投与に起因した母毒性によって増幅されたものと考えられた。

その他の奇形及び変異の発生頻度に検体投与の影響は認められなかった。

本試験における無毒性量は、母動物及び胎児で2 mg/kg 体重/日であると考えられた。（参照 67）

⑦ 発達神経毒性試験（ラット）

Wistar ラット（一群雌 30 匹）の妊娠 6～哺育 21 日に混餌（代謝物 M17：0、40、160 及び 500 ppm：平均検体摂取量は表 59 を参照）投与する発達神経毒性試験が実施された。

表 59 発達神経毒性試験（ラット）における平均検体摂取量

投与群		40 ppm	160 ppm	500 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	妊娠期間	3.6	15.1	43.3
	哺乳期間	8.1	35.7	105

母動物において、500 ppm 投与群では、繁殖率の低下、妊娠期間の延長及び 3 例に難産（死亡胎児を有していた。妊娠 22 日にと殺。）が認められた。妊娠 13 及び 20 日に実施した FOB では検体投与の影響は認められなかった。

児動物において、500 ppm 投与群の 3 母動物で各 1 例の死産児が認められた。160 ppm 以上投与群において不正咬合（腹側切歯）、500 mg/kg 体重/日投与群において吻合部（鼻口部）の変位が認められた。しかし、これらの異常の発生頻度増加については、代謝物 M17[9. (5)①]及び親化合物[8. (6)①]の 2 つの繁殖試験において再現性がみられなかったこと、及び認められた不正咬合の発生頻度の状況から、遺伝的なバリエーションが原因で発現した可能性が高いことから、これらの所見は検体投与に起因したものではないと考えられた。その他の検査項目（体重変化、性成熟指標、FOB、自発運動量及び移動運動量、聴覚性驚愕反応、受動的回避、水迷路、眼科学的検査、剖検、脳の肉眼的及び組織学的形態計測ならびに病理組織検査）に検体投与の影響は認められなかった。

本試験において、母動物では 500 ppm 投与群で繁殖率の低下及び難産動物が認められ、児動物では検体投与の影響は認められなかったため、無毒性量は母動物で 160 ppm (15.1 mg/kg 体重/日)、児動物で 500 ppm (43.3 mg/kg 体重/日) と考えられた。発達神経毒性は認められなかった。（参照 68）

(6) 遺伝毒性試験

代謝物 M17 の細菌を用いた復帰突然変異試験、チャイニーズハムスター由来卵巣細胞を用いた染色体異常試験及びチャイニーズハムスター肺由来培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験、ラット肝初代培養細胞を用いた *in vitro* UDS 試験及びマウスを用いた小核試験が実施された。

試験結果は表 60 に示されているとおり、すべて陰性であった。（参照 69～73）

表 60 遺伝毒性試験概要 (代謝物 M17)

試験	対象	処理濃度・投与量	結果	
<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、TA1535、 TA1537 株)	8~5,000 µg/プレート (+/-S9) 150~2,400 µg/プレート (+/-S9)	陰性
	染色体異常試験	チャイニーズハムスター 由来卵巣細胞 (CHO)	4 時間処理： 5~125 µg/mL (+/-S9)	陰性
	遺伝子突然変異試験 (HPRT 前進突然変異試験)	チャイニーズハムスター 肺由来培養細胞 (V79)	5 時間処理： 12.5~250 µg/mL (-S9) 50~500 µg/mL (+S9)	陰性
	UDS 試験	ラット肝初代培養細胞	5~60 µg/mL	陰性
<i>in vivo</i>	小核試験	NMRI マウス (骨髄細胞) (一群雌雄各 5 匹)	350 mg/kg 体重 (単回腹腔内投与) 投与後 16、24、48 時間後	陰性

注) +/-S9 : 代謝活性化系存在下及び非存在下

10. 代謝物 M07 のカリウム塩を用いた毒性試験

(1) 急性毒性試験

代謝物 M07 のカリウム塩の Wistar ラット (一群雌雄各 3 匹) を用いた急性経口毒性試験が実施された。代謝物 M07 のカリウム塩の LD₅₀ は雄で >200 mg/kg 体重、雌で 200~2,000 mg/kg 体重であった。2,000 mg/kg 体重投与群の雌で不調歩行、負荷呼吸、活動性及び反応性低下が認められ、3 例全例が投与翌日までに死亡した。200 mg/kg 体重投与群では雌雄とも死亡例は認められなかった。(参照 74)

(2) 90 日間亜急性毒性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 10 匹) を用いた混餌 (代謝物 M07 のカリウム塩 : 0、30、125、500 及び 2,000 ppm : 平均検体摂取量は表 61 参照) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

表 61 90 日間亜急性毒性試験 (ラット) の平均検体摂取量

投与群		30 ppm	125 ppm	500 ppm	2,000 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	2.1	8.7	34.3	136
	雌	2.6	9.7	40.4	163

雌においては、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。雄においては、2,000 ppm 投与群において膀胱の移行上皮過形成の発生頻度増加が認められた。また、2,000 ppm 投与群で EH 及び UDP-GT、500 ppm 以上投与群で GST の増加が認められたが、肝重量の変動または肝の形態学的変化が認められていないことから、毒性学的意義は低いと考えられた。

本試験における無毒性量は、雄で 500 ppm (34.3 mg/kg 体重/日)、雌で本試験の最高用量 2,000 ppm (163 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 75)

(3) 発生毒性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌 25 匹) の妊娠 6~20 日に強制経口 (代謝物 M07 のカリウム塩:0、30、150 及び 750 mg/kg 体重/日、溶媒:0.5% Cremophor EL 水溶液) 投与する発生毒性試験が実施された。

母動物において、750 mg/kg 体重/日投与群で体重増加抑制、摂餌量減少、全吸収胎動物 (3 例)、着床後死胚数及び死胚率増加が認められた。

児動物において、750 mg/kg 体重/日投与群で低体重及び四肢の指骨の未骨化の増加が認められた。

本試験における無毒性量は、母動物及び胎児で 150 mg/kg 体重/日であると考えられた。催奇形性は認められなかった。(参照 76)

(4) 遺伝毒性試験

代謝物 M07 のカリウム塩の細菌を用いた復帰突然変異試験が実施された。試験結果は表 62 に示されているとおり、陰性であった。(参照 77)

表 62 遺伝毒性試験概要 (代謝物 M07)

	試験	対象	処理濃度・投与量	結果
<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、TA102、 TA1535、TA1537 株)	16~5,000 µg/プレート (+/-S9)	陰性

注) +/-S9: 代謝活性化系存在下及び非存在下

11. その他の代謝物

(1) 急性毒性試験

代謝物 M08、M24、M25 及び M47 のアグリコンのラットを用いた急性経口毒性試験が実施された。

結果は表 63 に示されている。(参照 78~81)

表 63 急性毒性試験結果概要（代謝物）

化合物	投与経路*	動物種 性別・匹数	LD ₅₀ (mg/kg 体重)		観察された症状
			雄	雌	
代謝物 M08	経口	Wistar ラット 雌雄各 3 匹	>2,000	>2,000	活動性低下、反応性低下、不調和歩行及び負荷呼吸 2,000 mg/kg 体重で雄 1 例死亡
代謝物 M24	経口	Wistar ラット 雌雄各 3 匹	>2,000	>2,000	活動性低下、反応性低下、不調和歩行及び負荷呼吸 死亡例なし
代謝物 M25	経口	Wistar ラット 雌雄各 3 匹	>2,000	>2,000	立毛、活動性低下、反応性低下及び不調和歩行 死亡例なし
代謝物 M47 のアグリコン	経口	Wistar ラット 雌雄各 3 匹	>2,000	>2,000	雌：流涎 雄：症状なし 死亡例なし

*：溶媒として 2% Cremophor EL 水溶液を用いた。

(2) 変異原性試験

プロチオコナゾールの代謝物 M08、M24、M25 及び M47 のアグリコンの細菌を用いた復帰突然変異試験が実施された。

結果は表 64 に示されているとおり、すべて陰性であった。(参照 82~85)

表 64 遺伝毒性試験概要（代謝物）

被検物質	試験	対象	処理濃度・投与量	結果
代謝物 M08	復帰突然変異 試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、TA102、 TA1535、TA1537 株)	16~5,000 µg/7 [°] レット (+/-S9)	陰性
			1.6~500 µg/7 [°] レット (+/-S9)	
代謝物 M24			16~5,000 µg/7 [°] レット (+/-S9)	陰性
代謝物 M25			16~5,000 µg/7 [°] レット (+/-S9)	陰性
代謝物 M47 のアグリコン			16~5,000 µg/7 [°] レット (+/-S9) 4~256 µg/7 [°] レット (+/-S9)	陰性

注) +/-S9：代謝活性化系存在下及び非存在下