

4. 水中運命試験

(1) 加水分解試験①

Ph-¹⁴C ビフェナゼートを pH4、7 及び 9 の各滅菌緩衝液に 1mg/L となるように加えた後、25 及び 35°C でインキュベートし、ビフェナゼートの加水分解試験が実施された。

ビフェナゼートの半減期は pH4、25 及び 35°C でそれぞれ 21.5 日、13.1 日、pH7、25 及び 35°C で 50.7 時間、16.1 時間、pH9、25 及び 35°C で 50.7 時間、16.1 時間であり、主要分解物として B 及び J が認められた

加水分解反応は試験を行った全ての pH で 2 相性が認められ、試験の前半の分解速度は緩やかで、後半の分解速度が上昇する現象が観察された。(参照 25)

(2) 加水分解試験②

Ph-¹⁴C ビフェナゼートを pH4、5、7 及び 9 の滅菌緩衝液中、暗所、25°C でインキュベーションし、ビフェナゼートの加水分解試験が実施された。

pH4、5、7 及び 9 のそれぞれの半減期は 218 時間、130 時間、20 時間、1.6 時間、90% 分解時間は 504 時間、264 時間、28 時間、2.0 時間であった。分解過程は 2 相性を示し、第 1 相は緩やかに、第 2 相は速やかに進んだ。第 1 相では各 pH に共通の分解物 B、J 及び D が生成した。その他、10% を超えて認められた分解物は pH7 と 9 の緩衝液中で J の 2 量体であった。また、第 2 相では pH4 以外で H が 7% TAR 未満認められた。(参照 26)

(3) 水中光分解試験

Ph-¹⁴C ビフェナゼートを滅菌蒸留水及び河川水に濃度 1mg/L となるように加えた後、25°C で滅菌蒸留水については 12 時間、河川水については 2 時間キセノン光照射 (290 ~ 800nm の範囲で $450 \pm 10 \text{ W/m}^2$) し、ビフェナゼートの水中光分解試験が実施された。

半減期は光照射区で滅菌蒸留水が 4.8 時間、河川水が 0.2 時間、春期における東京 (北緯 35°) の太陽光換算でそれぞれ、21.8 時間及び 0.9 時間であり、暗所区で 12 時間以上及び 2 時間以上であった。

2 時間後の河川水中のビフェナゼートは 1.9% TAR であり、主要分解物として B が 72.3% TAR、その他の分解物 H、D 及び C は 2% TAR 未満であった。

12 時間後の滅菌蒸留水中のビフェナゼートは 5.0% TAR であり、主要分解物として B が 55.8% TAR、その他、分解物 WS-3 が 5.5% TAR、分解物 H、D 及び C は 3% TAR 未満であった。

光照射によりビフェナゼートは水中で速やかに消失し、B に光分解され、さらに D、C、H 及び WS-3 へと分解されると考えられる。(参照 27)

(4) 水中光分解試験 (pH5 滅菌緩衝液)

Ph-¹⁴C ビフェナゼートを pH5 の酢酸緩衝液に 1mg/L となるように加えた後、25°C、150 時間 (12 時間間隔) キセノンランプの疑似太陽光を照射し、ビフェナゼートの pH5 滅菌緩衝液における水中加水分解試験が実施された。

ビフェナゼートの半減期及び 90% 消失時間は光照射区で 17 時間及び 41 時間、暗所で

58 時間及び 96 時間であった。初期主分解物 B は、78 時間後最大の 54.3% TAR に達した後減衰した。分解物 B の半減期は照射区で 41 時間、暗所で 43 時間であった。分解物 J 及び D は 24 時間後に 5.4% TAR 及び 3.5% TAR が認められた。分解物 J は 150 時間後に 15.8% TAR に増加した。D は 54 時間後に 13.1% TAR に増加し、150 時間後に 2.1% TAR に減衰した。H は徐々に増加して 150 時間後に 30.4% TAR に達した。CO₂ が 4% TAR 認められた。(参照 28)

(5) 自然水及び pH7 滅菌緩衝液における水中光分解

Ph-¹⁴C ビフェナゼートを濾過滅菌した自然水及び pH7 の緩衝液にそれぞれ 1mg/L とするように加えた後、25℃、12 時間キセノンランプの疑似太陽光を照射し、自然水及び pH7 滅菌緩衝液における水中光分解が実施された。

半減期及び 90% 消失時間は照射区の自然水で 0.7 時間及び 2.5 時間、緩衝液で 9.8 時間及び 11.8 時間、暗所区の自然水で 9.9 時間及び 11.7 時間、緩衝液で 11.8 時間であった。なお、暗所区の 90% 消失時間は 12 時間照射で 40% TAR が残存したため計算しなかった。

自然水中及び緩衝液中の主要分解物として B が最大でそれぞれ 58.4% TAR (2 時間後) 及び 66% TAR (12 時間後)、D が 12.8% TAR (9 時間後)、2.8% TAR (12 時間後)、J が 11.7% TAR (4 時間後)、2.1% TAR (12 時間後)、H が 17.2% TAR (12 時間後) であった。CO₂ は投与 12 時間後までに、照射区の自然水で 1.16% TAR、緩衝液で 0.40% TAR 認められた。(参照 29)

(6) 水中光分解試験 (代謝物 B)

Ph-¹⁴C 代謝物 B を滅菌蒸留水及び河川水に濃度 1mg/L とするように加えた後、25℃ で滅菌蒸留水については 48 時間、河川水については 5 時間キセノン光照射 (290~800nm の範囲で 450±10W/m²) し、分解物 B の水中光分解試験が実施された。

半減期は照射区で滅菌蒸留水が 20.1 時間、河川水が 2.2 時間、春期における東京 (北緯 35°) の太陽光換算でそれぞれ、91.5 時間及び 10.0 時間であり、暗所区で 43.0 時間及び 4.6 時間であった。

5 時間後の滅菌蒸留水中の分解物 B は 19.9% TAR であり、主要分解物として H が 5.2% TAR、その他ビフェナゼート、分解物 D 及び H がいずれも 5.0% TAR 未満、未知分解物が最大で 7.9% TAR 認められた。CO₂ が 5 時間後で 1.0% TAR 認められた。

48 時間後の滅菌蒸留水中の分解物 B は 17.6% TAR であり、主要分解物として D が 5.2% TAR、その他ビフェナゼート、分解物 C 及び H が認められたが、いずれも 5.0% TAR 未満であった。CO₂ が 48 時間後で 5.4% TAR 認められた。

光照射により分解物 B は水中で D、C、H 及び CO₂ に分解されると考えられる。(参照 30)

5. 作物残留試験

果実、野菜、及び茶を用いて、ビフェナゼート及び代謝物 B 又はその含量を分析対象化合物とした作物残留試験が実施された。分析法は磨砕抽出、アスコルビン酸による還元、精製後、蛍光検出器付き HPLC で定量するものであるが、還元前に分離することによりビフェナ

ゼートと代謝物 B の個別定量も可能である。

ビフェナゼートで最高値は 800g ai/ha で 1 回散布し、最終散布後 7 日目に収穫した茶（荒茶）の 22.7mg/kg であったが、14 日目及び 21 日目には、それぞれ 0.78mg/kg 及び 0.05mg/kg と減衰した。代謝物 B は最高で、最終散布 7 日後の茶（荒茶）で 1.43 mg/kg（ビフェナゼートの 6.3%）検出された。（別紙 2）（参照 31～33）

作物残留試験の含量分析値を用いて、ビフェナゼート及びそのアゾ体（代謝物 B）を暴露評価対象化合物として国内で栽培される農産物から摂取される推定摂取量を表 7 に示した。

なお、本推定摂取量の算定は、登録されている又は申請された使用方法からビフェナゼート及びそのアゾ体の含量が最大の残留を示す使用条件で、全ての適用作物に使用され、加工・調理による残留農薬の増減が全くないと仮定の下に行った。

表 7 食品中より摂取されるビフェナゼート及びそのアゾ体の含量の推定摂取量（単位：μg/人/日）

作物名	残留値 (ppm)	国民平均		小児 (1~6 歳)		妊婦		高齢者 (65 歳以上)	
		ff	摂取量	ff	摂取量	ff	摂取量	ff	摂取量
トマト	0.17	24.3	4.13	16.9	2.87	24.5	4.17	18.9	3.21
ナス	0.5	4	2	0.9	0.45	3.3	1.65	5.7	2.85
きゅうり	0.1	16.3	1.63	8.2	0.82	10.1	1.01	16.6	1.66
みかん	0.02	41.6	0.83	35.4	0.71	45.8	0.92	42.6	0.85
みかん以外 のかんきつ	0.3	2.7	0.81	1.7	0.51	3.7	1.11	2.5	0.75
りんご	0.72	35.3	25.4	36.2	26.1	30	21.6	35.6	25.6
なし	0.9	5.2	4.68	4.5	4.05	5.4	4.86	5.2	4.68
もも	0.01	0.5	0.01	0.7	0.01	4	0.04	0.1	0.00
すもも	0.15	0.2	0.03	0.1	0.015	1.4	0.21	0.2	0.03
おうとう	0.38	0.1	0.04	0.1	0.04	0.1	0.04	0.1	0.04
イチゴ	1.11	0.3	0.33	0.4	0.44	0.1	0.11	0.3	0.33
ぶどう	0.93	5.8	5.39	4.4	4.09	1.6	1.49	3.8	3.53
その他の果実 (いちじく)	0.54	3.9	2.11	5.9	3.19	1.4	0.76	1.7	0.92
茶	0.54	3	1.62	1.4	0.756	3.5	1.89	4.3	2.32
合計			49.0		44.1		39.9		46.8

注) ・残留値は、申請されている使用時期・使用回数による各試験区の平均残留値のうちビフェナゼート及びそのアゾ体の含量の最大値を用いた（参照 別紙 2）。

- ・「ff」：平成 10 年～12 年の国民栄養調査（参照 34～36）の結果に基づく農産物摂取量（g/人/日）
- ・「摂取量」：残留値及び農産物残留量から求めたビフェナゼートの推定摂取量（μg/人/日）
- ・その他のかんきつにはなつみかん、カボス、スダチが含まれるが、残留値の最も高かったカボスの 0.30mg/kg を用いた。
- ・スイカ及びメロンは全データが検出限界以下であったため摂取量の計量はしていない。
- ・その他の果実にはいちじくの残留値を用いた。

6. 土壌残留試験

火山灰埴壤土及び洪積埴壤土を用いて、ビフェナゼートと分解物 B の含量及び分解物 D を分析対象としたビフェナゼートの土壌残留試験（容器内及び圃場）が実施された。

推定半減期は各条件で表 8 のとおりであり、ビフェナゼートと分解物 B の含量としては 2 時間～2 日、分解物 D で 4～19 日、3 成分の合計では 5 時間～10 日であった。（参照 37）

表 8 土壌残留試験成績（推定半減期）

試験	濃度*	土壌	ビフェナゼートと分解物 B の含量	分解物 D	3成分合計
容器内試験	1.2mg/kg	火山灰埴壤土	2 日	12 日	10 日
		洪積埴壤土	2 日	4 日	3 日
圃場試験	1.2kg ai/ha	火山灰埴壤土	2 時間	7 日	5 時間
		洪積埴壤土	2 時間	19 日	5 時間

※容器内試験で純品、圃場試験で SC を使用

7. 急性毒性試験

ビフェナゼートの SD ラットを用いた急性経口毒性試験、急性経皮毒性試験、急性吸入毒性試験、ICR マウスを用いた急性経口毒性試験が実施された。急性経口 LD₅₀ はラットの雌雄で >4946mg/kg 体重、マウスの雌雄で >4946mg/kg 体重、経皮 LD₅₀ はラットの雌雄で >5000mg/kg 体重、吸入 LC₅₀ はラットの雌雄で >4.4mg/L であった。（参照 38～41）

代謝物 B 及び D について ICR マウス用いた急性経口毒性試験が実施された。

代謝物 B 及び D の急性経口 LD₅₀ は、ともに ICR マウスの雌雄で >5000mg/kg 体重であった。（参照 42～43）

8. 眼・皮膚に対する刺激性及び皮膚感作性

ニュージーランド白色ウサギを用いた眼一次刺激性試験及び皮膚一次刺激性試験が実施されており、ビフェナゼート原体の眼及び皮膚に対する刺激性は認められなかった。（参照 44～45）

ハートレー系モルモットを用いた皮膚感作性試験（Maximization 法）が実施されており、ビフェナゼート原体に軽度の皮膚感作性が認められた。（参照 46）

9. 亜急性毒性試験

（1）13 週間亜急性毒性試験（マウス）

ICR マウス（一群雌雄 10 匹）を用いた混餌（原体：0、50、100、150 ppm）投与による 13 週間の亜急性毒性試験が実施された。

100ppm 以上投与群の雌で、脾での色素沈着の発生頻度及び程度の増加が認められた。本試験における無毒性量は雄で 150ppm(24.0mg/kg 体重/日)、雌で 50ppm(10.3mg/kg 体重/日) であると考えられる。(参照 47)

(2) 13 週間亜急性毒性試験 (ラット)

SD ラット (一群雌雄 10 匹) を用いた混餌 (原体 : 0、40、200、400 ppm) 投与による 13 週間の亜急性毒性試験が実施された。

各投与群で認められた主な所見は表 9 に示すとおり。

なお、神経行動学的検査として投与 8 週及び 13 週に全動物を対象として、苦悶反応、旋回、振戦等の機能観察検査を実施したところ、検体投与と考えられる影響は認められなかった。

本試験における無毒性量は雌雄で 40ppm (雄 : 2.7mg/kg 体重/日、雌 : 3.2mg/kg 体重/日) であると考えられる。(参照 48)

表 9 ラット 13 週間亜急性毒性試験で認められた所見

400ppm 投与群	雄	体重増加抑制、摂餌量減少、赤血球数及びヘモグロビンの減少、脳(脳幹を含む)、脾、精巣 (精巣上体を含む) 及び腎体比重重量 (以下「比重量」という) 増加、肝及び脾の髄外造血亢進、肝クッパー細胞色素沈着
	雌	Ht ³ 減少、副腎比重重量増加、赤脾髄色素沈着増加
200ppm 以上投与群	雌雄	小葉中心性肝細胞肥大
	雄	肝単細胞壊死、リンパ組織球性細胞浸潤、赤脾髄色素沈着増加、副腎皮質束状帯の空胞化
	雌	体重増加抑制、摂餌量減少、赤血球数及びヘモグロビンの減少、脳(脳幹を含む)、脾、腎及び肝比重重量増加

(3) 13 週間亜急性毒性試験 (イヌ)

ビーグル犬 (一群雌雄各 4 匹) を用いた混餌 (原体 : 40、400、1000 ppm) 投与による 13 週間の亜急性毒性試験が実施された。

各投与群で認められた主な所見は表 10 に示すとおり。

本試験における無毒性量は雌雄で 40ppm (雄 : 0.9mg/kg 体重/日、雌 : 1.3mg/kg 体重/日) であると考えられる。(参照 49)

³ 検査値等の略称は別紙 3 参照 (以下同じ)

表 10 イヌ 13 週間亜急性毒性試験で認められた所見

1000ppm 投与群	雌雄	体重増加抑制
	雄	網状赤血球数の増加、血漿中コレステロール及び ALP の増加、肝細胞の小葉中心性又はびまん性の肥大
400ppm 以上投与群	雌雄	赤血球数、ヘモグロビン及び Ht の減少、MCV、MCH 及び血小板数の増加、 β 1-グロブリン減少、肝比重量増加、クッパー細胞褐色色素沈着
	雄	尿の褐色化及びビリルビンの増加
	雌	摂餌量減少、網状赤血球数増加、肝細胞の小葉中心性又はびまん性の肥大

(4) 21 日間亜急性経皮毒性試験 (ラット)

SD ラット (一群雌雄各 10 匹) を用いた経皮 (原体: 80、400、1000 mg/kg 体重) 投与による 21 日間の亜急性毒性試験が実施された。

剪毛・剃毛したラットの背部皮膚に、蒸留水で湿らせたピフェナゼート原体を塗布し、投与部位をガーゼで閉塞貼付し、6 時間後に投与部位を湯で洗浄した。

1000mg/kg 体重/日投与群の雌雄でヘモグロビン減少、脾比重量増加が、雄で体重増加抑制、血小板数増加、尿比重増加、副腎比重量増加、脾の髄外造血亢進が、雌で赤血球数及び Ht の減少、血漿中総ビリルビンの増加が認められた。

400mg/kg 体重/日以上以上の投与群の雌雄で摂餌量減少が、雄で尿量減少が、雌で体重増加抑制、脾の髄外造血亢進が認められた。

本試験における無毒性量は雌雄で 80mg/kg 体重/日であると考えられる。(参照 50)

10. 慢性毒性試験及び発がん性試験

(1) 1 年間慢性毒性試験 (イヌ)

ビーグル犬 (一群雌雄各 5 匹) を用いた混餌 (原体: 40、400、1000 ppm) 投与による 1 年間の慢性毒性試験が実施された。

1000ppm 投与群の雄でヘモグロビン及び Ht 減少、血漿中 α 2-グロブリン増加が、雌で白血球数及びリンパ球数増加、肝比重量増加が認められた。

400ppm 以上投与群の雌雄で体重増加抑制傾向、赤血球数減少、網状赤血球数、MCV、有核赤血球数及び血小板数増加、血漿中総ビリルビン増加、 β 1-グロブリン減少、尿の褐色化及びビリルビン増加、大腿骨、肋骨及び胸骨の骨髓過形成、腎の近位尿細管上皮褐色色素沈着、肝クッパー細胞内褐色色素沈着が、雄で摂餌量減少傾向、白血球数、分葉好中球数及びリンパ球数の増加が、雌で MCH 増加、ヘモグロビン及び Ht 減少が認められた。

本試験における無毒性量は雌雄で 40ppm (雄: 1.0mg/kg 体重/日、雌: 1.1mg/kg 体重/日) であると考えられる。(参照 51)

(2) 104 週間慢性毒性/発がん性併合試験 (ラット)

SD ラット (一群雌雄各 60 匹) を用いた混餌 (原体: 0、20、80、200 (雄)、160 (雌) ppm) 投与による 104 週間の慢性毒性/発がん性併合試験が実施された。

200ppm 投与群の雄で体重増加抑制、摂餌量減少、血漿中総コレステロール減少が、160ppm 投与群の雌でヘモグロビン及び Ht 減少、脾色素沈着の程度の増強が認められ、80ppm 以上投与群の雄で脾色素沈着の程度の増強が、雌で体重増加抑制、摂餌量減少、赤血球数の減少が認められた。

本試験における無毒性量は雌雄で 20ppm (雄: 1.0mg/kg 体重/日、雌: 1.2mg/kg 体重/日) であると考えられる。発がん性は認められない。(参照 52)

(3) 78 週間発がん性試験 (マウス)

ICR マウス (一群雌雄各 50 匹) を用いた混餌 (原体: 0、10、100、225 (雄)、175 (雌) ppm) 投与による 78 週間の発がん性試験が実施された。

225ppm 投与群の雄で体重増加抑制、摂餌量減少、赤血球数減少、肝比重量増加が、175ppm 投与群の雌で肝比重量増加が、100ppm 投与群の雄で白血球及びリンパ球数減少、腎比重量減少が、雌で体重増加抑制が認められた。

本試験における無毒性量は雌雄で 10ppm (雄: 1.5mg/kg 体重/日、雌: 1.9mg/kg 体重/日) であると考えられる。発がん性は認められない。(参照 53)

1 1. 生殖発生毒性試験

(1) 2 世代繁殖試験①

SD ラット (一群雌雄各 30 匹) を用いた混餌 (原体: 0、20、80、200 ppm) 投与による 2 世代繁殖試験が実施された。

親動物では、200ppm 投与群の雌雄で体重増加抑制(P)、雌で脳、腎、脾、卵巣及び副腎比重量増加 (P 及び F₁) が、80ppm 以上投与群の雄で体重増加抑制 (F₁) が、20ppm 以上投与群の雌で体重増加抑制 (F₁) が認められた。

児動物ではビフェナゼート投与の影響は認められなかった。

本試験の無毒性量は親動物の雄で 20ppm(P 雄: 1.5mg/kg 体重/日、F₁ 雄: 1.7mg/kg 体重/日)、雌で 20ppm 未満 (P 雌: 1.7mg/kg 体重/日未満、F₁ 雌: 1.9mg/kg 体重/日未満)、児動物の雌雄で 200ppm(F₁ 雄: 15.3mg/kg 体重/日、F₁ 雌: 17.2mg/kg 体重/日、F₂ 雄: 17.4mg/kg 体重/日、F₂ 雌: 19.4mg/kg 体重/日) であると考えられる。繁殖に対する影響は認められない。(参照 54)

(2) 2 世代繁殖試験②

SD ラット (一群雌雄各 30 匹) を用いた混餌 (原体: 0、7.5、15、20ppm) 投与により、2 世代繁殖追加試験が実施された。本試験は 2 世代繁殖試験① (1 1. (1) 参照) で認められた親動物の 20ppm 投与群の F₁ 雌で認められた体重への影響を確認するために実施されたものである。

親動物では、20ppm 投与群の雄で肝及び精巣上部尾部比重量増加(P)、雌で胸腺比重量の増加(P)が認められた。体重への影響は認められなかった。

児動物ではビフェナゼート投与の影響は認められなかった。

本試験の無毒性量は親動物の雌雄で 15ppm(P 雄: 1.1mg/kg 体重/日、P 雌: 1.3mg/kg 体重/日、F₁ 雄: 1.1mg/kg 体重/日、F₁ 雌: 1.2mg/kg 体重/日)、児動物の雌雄で 20ppm(F₁ 雄: 1.5mg/kg 体重/日、F₁ 雌: 1.7mg/kg 体重/日、F₂ 雄: 1.5mg/kg 体重/日、F₂ 雌: 1.7mg/kg 体重/日)であると考えられる。(参照 55)

(3) 発生毒性試験 (ラット)

SD ラット (一群雌 25 匹) の妊娠 6~15 日に強制経口 (原体: 0、10、100、500 mg/kg 体重/日) 投与して発生毒性試験が実施された。

母動物では、500mg/kg 体重/日投与群で、四肢の退色、糞量減少、膣からの褐色流出物が、100mg/kg 体重/日以上投与群で体重増加抑制、摂餌量減少、鼻周囲の赤色汚れ・付着物が認められた。胎児ではビフェナゼート投与の影響は認められなかった。

本試験の無毒性量は母動物で 10mg/kg 体重/日、胎児で 500mg/kg 体重/日であると考えられる。催奇形性は認められない。(参照 56)

(4) 発生毒性試験 (ウサギ)

ニュージーランドホワイトウサギ (一群雌 20 匹) の妊娠 7~19 日に強制経口 (原体: 0、10、50、200 mg/kg 体重/日) 投与して発生毒性試験が実施された。ビフェナゼート投与の影響は親動物、胎児ともに認められなかった。

本試験の無毒性量は、母動物及び胎児で 200mg/kg 体重/日と考えられる。催奇形性は認められない。(参照 57)

12. 遺伝毒性試験

ビフェナゼートの細菌を用いた DNA 修復試験、復帰突然変異試験、マウスリンパ腫由来培養細胞(L5178Y)を用いた遺伝子突然変異試験、チャイニーズハムスター卵巣由来培養細胞 (CHO) を用いた染色体異常試験、ラットを用いた *in vivo* 肝不定期 DNA 合成(UDS) 試験、マウスを用いた小核試験が実施された。試験結果は全て陰性であった。

従って、ビフェナゼートに遺伝毒性はないものと考えられる。(表 11) (参照 58~63)

表 11 遺伝毒性試験結果概要 (ビフェナゼート原体)

試験	対象	投与量 (mg/kg 体重)	結果	
<i>in vitro</i>	DNA 修復試験 (±S9)	<i>B. subtilis</i> H17, M45 株	陰性	
	復帰突然変異試験 (±S9)	<i>S. typhimurium</i> TA98,TA100,TA1535, TA1537 株 <i>E. coli</i> WP2uvrA 株	陰性	
	遺伝子突然変異 試験 (±S9)	マウスリンパ腫由来培 養細胞(L5178Y)	陰性	
	染色体異常試験 (±S9)	チャイニーズハムスタ ー卵巣由来培養細胞株 (CHO)	陰性	
<i>in vivo</i>	肝 UDS 試験	SD ラット (一群雄 3 匹)	0、500、2000 (単回強制経口投与)	陰性
	小核試験	ICR マウス (一群雌雄各 5 匹)	雄：0、96、192、384 雌：0、50、100、200 (単回腹腔内投与)	陰性

注) ±S9：代謝活性化系存在下及び非存在下

代謝物 B に関して細菌を用いた復帰突然変異試験、マウスリンパ腫由来培養細胞 (L5178Y) を用いた遺伝子突然変異試験及びマウスを用いた *in vivo* 小核試験が実施された。代謝物 B の細菌を用いた復帰突然変異試験で S9mix 存在下の TA98 株で弱い陽性反応が認められたが、その他の試験は全て陰性であった。(表 12)

代謝物 B の細菌を用いた復帰突然変異試験で陽性反応が認められたが、マウスリンパ腫由来培養細胞(L5178Y)を用いた遺伝子突然変異試験で陰性であったこと及びマウスを用いた *in vivo* 小核試験の結果が陰性であったことを考え合わせると、生体において問題となるような遺伝毒性が発現することはないものと考えられる。

代謝物 D に関しても細菌を用いた復帰突然変異試験が行われており、結果は陰性であった。(表 12) (参照 64~67)

表 12 遺伝毒性試験結果概要 (代謝物)

被験物質	試験	対象	投与量 (mg/kg 体重/日)	結果
B	復帰突然変異試験 (±S9)	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538 株		陽性 (+S9) TA98 株
	遺伝子突然変異試験 (±S9)	マウスリンパ腫由来培養 細胞(L5178Y)		陰性
	小核試験	ICR マウス (一群雄 5 匹)	0、164、260 (単回腹腔内投与)	陰性
D	復帰突然変異試験 (±S9)	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537 株 <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> 株		陰性

注) ±S9 : 代謝活性化系存在下及び非存在下、+S9 : 代謝活性下系存在下

13. 一般薬理試験

マウス又はラットを用いた一般薬理試験が実施された。結果は表 13 に示すとおり。(参照 68)

表 13 一般薬理試験

試験の種類	動物種	動物数 匹/群	投与量 mg/kg 体重	作用量 mg/kg 体重	無作用量 mg/kg 体重	結果概要
中枢神経系	マウス	雄 3 雌 3	0, 320, 800, 2000, 5000	5000	2000	興奮性症状と抑制性症状を混在した非特異的症状。雌 1 例 8 日に死亡。
				800	320	
	ラット	雄 5	0, 800, 2000, 5000	—	5000	影響なし
				2000	800	軽度な減少、3 日までに回復
				—	5000	影響なし
マウス	雄 8	0, 3.28, 8.19, 20.5, 51.2, 128, 320, 800, 2000, 5000	20.5-320 2000-5000	8.19	中間量で短縮 高用量で延長	
循環器系 血圧・心拍数	ラット	雄 5	0, 800, 2000, 5000	—	5000	影響なし
自律神経系 瞳孔径						
消化器系 小腸炭末輸 送能	マウス	雄 8	0, 128, 320, 800 2000, 5000	800	320	炭末輸送能低下
骨格筋 握力	ラット	雄 5	0, 800, 2000, 5000	—	5000	影響なし
血液		雄 5	0, 320, 800, 2000, 5000			投与後 1 日に 測定した結果に おいて、影響なし
			雌 5	5000		

・検体はピフェナゼート原体を 0.5%CMC に懸濁したものを単回経口投与した。

14. その他の毒性試験

(1) ハイנטツ小体確認試験

ICR マウス（一群雌雄各 5 匹）を用いた混餌（原体：0、500ppm）投与による 2 週間の溶血性貧血機序解明を目的としたハイנטツ小体確認試験が実施された。

500ppm 投与群の雌雄で赤血球中にハイנטツ小体形成、赤血球浸透圧抵抗性の減弱傾向及び脾鉄沈着が、雌の 1 例で赤血球数、ヘモグロビン及び Ht 減少、網状赤血球数増加、巨赤血球、涙滴赤血球及び大小不平等の形態異常、脾腫大及び比重量増加、が認められた。ピフェナゼート投与により認められた溶血性貧血の機序は、ヘモグロビンの酸化により形成されるハイנטツ小体が赤血球中で認められたことから、赤血球に対する酸化作用の関与が考えられる。（参照 69）

(2) 貧血確認試験

SD ラット（一群雌雄各 5 匹）を用いた強制経口（原体：0、200mg/kg 体重/日）投与による 1 週間の貧血確認試験が実施された。

200mg/kg 体重/日投与群の雌雄で体重増加抑制、ハイנטツ小体及びメトヘモグロビンの増加、脾鉄染色陽性領域の増加が、雄で Ht 値の減少及び脾比重量増加が、雌で MCHC 及び網状赤血球数の増加が認められた。200mg/kg 体重/日は溶血性貧血を誘発する用量と考えられる。（参照 70、9）