

14日後の処理葉で、ビフェナゼートが12.0%TRR (0.50 mg/kg)、代謝物としてB、K、C、G、D、F及び少なくとも8種類の未知代謝物が認められたが、いずれも6%TRR未満であった。(参照14)

②土壌処理後のなすへの吸収、移行及び代謝

Ph-¹⁴C ビフェナゼートを100 g ai/10aとなるようになす(品種：千両2号)を栽培しているポットの土壌表面に灌注し、散布後7、14、21、28日後に検体として果実、へた、花、葉及び茎を採取し、土壌表面に落下したビフェナゼートのなすにおける吸収、移行及び代謝試験が実施された。

28日後のなすにおける放射能濃度は果実中で5.3 mg/kg、葉及び茎で52 mg/kg、花で12.9 mg/kgといずれも0.3%TAR以下であり、なすの根からの土壌中のビフェナゼート及びその代謝物の地上部への移行は少ないと考えられた。なお、なす採取後の土壌には残留放射能が72 mg/kg認められ、アセトニトリル、アセトニトリル塩酸抽出により7.5%TARが抽出された。抽出液からビフェナゼート、代謝物B、D、H及びEが認められた。(参照15)

3. 土壌中運命試験

(1) 好氣的土壌中運命試験(日本土壌：Ph-¹⁴C ビフェナゼート)

好氣的土壌(軽埴土：静岡、滅菌及び非滅菌)においてPh-¹⁴C ビフェナゼートを、乾土当たり約0.4 mg/kgとなるように均一に分布させて、25℃の暗条件下で28日間インキュベートし、ビフェナゼートの好氣的土壌中運命試験が実施された。

非滅菌土壌において、抽出可能画分は添加直後の99.6%TARから28日後には13.6%TARに減少し、抽出残渣は28日後で72.8%TARとなった。

施用直後でビフェナゼートは85.0%TARであり、0.5時間後には8.37%TARに減少した。ビフェナゼートの分解に伴い、分解物Bが急速に増加し、0.5時間後には77.7%TARと最高濃度に達した後、急速に分解し、28日後には1.19%TARとなった。分解物D、H及びJが1日後にそれぞれ22.8%TAR、7.9%TAR及び5.59%TARと最高濃度に達した後、28日後にそれぞれ1.93%TAR、0.84%TAR及び0.48%TARに減少した。土壌から発生する放射性気体については、28日後までにCO₂として17.1%TAR認められた。

半減期はビフェナゼートのみでは分解が急速であったため求められず、ビフェナゼートと分解物Bを合わせたもので8.6時間、分解物Bで8.0時間、分解物Dで5.2日であった。

滅菌土壌において、抽出可能画分は添加直後の102%TARから28日後には65.7%TARに減少し、抽出残渣は28日後で34.1%TARとなった。

滅菌土壌において、ビフェナゼートは施用直後で93.8%TARであり、0.5時間後には20.7%TARに減少した。ビフェナゼートの分解に伴い、分解物Bが急速に増加し、施用直後の4.6%TARから0.5時間後には73.5%TARと最高濃度に達した後、速やかに分解し、28日後には34.6%TARとなった。非滅菌土壌と分解物生成のパターンが類似していたが、全体的な分解速度は遅く、分解物Bの半減期は12.6日であった。分解物D及びHは施用直後から緩やかに増加し14日後には8.59%TAR及び3.13%TAR認められた。土壌から発生する放射性気体は認められなかった。

ビフェナゼートは主に非生物的な機構により分解物 B に酸化され、次いで主に生物的な反応により分解物 D に分解され、H や J を生成し、これらのビフェニル基を有する主要分解物はさらに微生物によって分解され、最終的に CO₂ に無機化されるか、腐植物質中に取り込まれるか、もしくは腐植物質自体に代謝されて結合性残留物となると考えられた。(参照 16)

(2) 好氣的土壤中運命試験 (米国土壤)

好氣的土壤 (砂壤土: 米国) において Ph-¹⁴C ビフェナゼートを、乾土当たり約 0.4 mg/kg となるように均一に分布させて、25±1°C の暗条件下で 28 日間インキュベートし、ビフェナゼートの好氣的土壤中運命試験が実施された。

非滅菌土壤においては、施用直後でビフェナゼートは 93.2% TAR であり、0.5 時間後には 2.8% TAR に減少した。ビフェナゼートの分解に伴い分解物 B が急速に増加し、0.5 時間後には 92% TAR と最高濃度に達した後、急速に分解し、28 日後には 2.8% TAR となった。土壤から発生する放射性気体については、28 日後までに CO₂ として 1.1% TAR が認められた。

≒減期はビフェナゼートで 0.5 時間未満、分解物 B で 7.3 時間、分解物 D で 60 日であった。

ビフェナゼートは分解物 B に酸化された後、芳香族ラジカル中間体に分解し、分解物 D を生成するほか、腐植質に取り込まれて結合性残留物を生成すると考えられた。(参照 17)

(3) 好氣的土壤中運命試験 (日本土壤: Car-¹⁴C ビフェナゼート)

好氣的土壤 (埴壤土: 岩手) において Car-¹⁴C ビフェナゼートを乾土当たり 1.2 mg/kg となるように均一に分布させて、25°C の暗条件下で 144 時間インキュベートし、Car-¹⁴C ビフェナゼートの土壤中運命試験が実施された。

ビフェナゼートは添加直後で 88.9% TAR、24 時間後で 2.38% TAR、144 時間後で 1% TAR 未満に減少した。5% TAR を超えて生成した分解物は B のみであった。

分解物 B は添加直後で 7.08% TAR、24 時間後で 5.50% TAR、144 時間後で 1.66% TAR と減少した。その他 9 種類以上の分解物が認められたが、3.10% TAR 以下であり、これらは経時的に減少した。残渣中放射能は添加直後で 0.15% TAR、24 時間後に 3.31% TAR に増加した後、144 時間後には 2.14% TAR に減少したので、ビフェナゼートあるいはカルボニル基を有する分解物が土壤中に残留することは少ないと考えられた。CO₂ が 24 時間後までで 77.5% TAR、144 時間後までで 86.2% TAR 認められたので、ビフェナゼートのカルボニル部分は土壤中で速やかに脱離し、CO₂ になると考えられた。(参照 18)

(4) 嫌氣性湛水中底質運命試験

米国オハイオ州の池より採取した表面水と底質の実験系 (水/底質=3:1) を窒素雰囲気中において嫌氣状態とし、その水相に Ph-¹⁴C ビフェナゼートを約 1 mg/kg となるように添加した後、攪拌して水と底質に分布させ、25±1°C の暗条件下で 12 ヶ月インキュベートし、嫌氣性湛水底質 (米国底質土) における運命試験が実施された。

12 ヶ月後には可溶性画分は 47.2% TAR に減少し、結合性残留物は 51.5% TAR に増加し

た。CO₂と揮発性物質は12ヶ月の試験期間中に少量(0.5% TAR 未満)認められた。

ビフェナゼートは、28日後で70.5% TAR、12ヶ月後で4.8% TARが残存し、半減期は77.9日であった。分解物としてはZ(Bの脱メチル体)、Eが認められ、それぞれ8ヶ月後、10ヶ月後に最高濃度に達し14.7% TAR、24.8% TARであり、12ヶ月後には11.4% TAR及び21.6% TARに減少した。

結合性残留物を酸加水分解したところ、分解物E等が認められたが、個別の放射能領域では10% TAR以下であった。有機物画分では放射能の多く(40% TAR)がフミン画分に認められた。

嫌気条件下で、ビフェナゼートはメチル基の脱離とN=N結合の形成により、分解物Zが生成し、分解物E又は底質の結合性残留物を生成したと考えられた。(参照19)

(5) 分解物Dの土壤吸着試験(日本土壤)

ビフェナゼート及びその主要代謝物Bは土壤中の半減期が短いため、土壤中で比較的安定な主要分解物Dについて、重埴土、砂質埴壤土、シルト質埴壤土及び壤質砂土を用いて土壤吸着試験が実施された。

K=31~2520、K_{oc}=2790~19400であった。分解物Dの土壤中での移動性は極めて小さいと考えられた。(参照20)

(6) 土壤カラムリーチング試験(米国土壤)

米国4土壤(シルト質壤土、砂壤土×2、シルト質埴壤土)を用いて土壤カラムリーチング試験が実施された。

内径4.8 cm×高さ30 cmの土壤カラムに520 g ai/haの割合でPh-¹⁴Cビフェナゼートを処理後、25±1℃の暗条件下、雨量換算100 mm/日で5日間溶出したところ、いずれの土壤カラムにおいても全溶出液中で3% TAR未満であり、放射能の多くは土壤カラムの0~6 cm部分に存在したことから、ビフェナゼートの土壤中でのリーチング性は低いと考えられた。(参照21)

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(フタル酸)、7(リン酸)及び9(ホウ酸)の各滅菌緩衝液に1 mg/Lとなるように加えた後、25及び35℃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では25及び35℃でそれぞれ21.5日及び13.1日、pH7では25及び35℃で50.7時間及び16.1時間、pH9では25及び35℃で50.7時間及び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22)

(2) 加水分解試験②

Ph-¹⁴CビフェナゼートをpH4、5(酢酸)、7(リン酸)及び9(ホウ酸)の滅菌緩衝液

中、暗所、25℃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。

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23)

(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(元荒川:埼玉県蓮田市)に濃度1 mg/Lとなるように加えた後、25℃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(290~800 nmの範囲で450±10 W/m²)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た。(参照24)

(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の滅菌酢酸緩衝液に1 mg/Lとなるように加えた後、25℃、150時間(明暗各12時間間隔)キセノンランプの疑似太陽光を照射し、ビフェナゼートの水中光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、暗所区で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の半減期は光照射区で41時間、暗所区で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25)

(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のリン酸緩衝液にそれぞれ1 mg/Lとなるように加えた後、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試験が実施された。

半減期及び90%消失時間は光照射区の自然水で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) 及び 2.8%TAR (12 時間後)、J が 11.7%TAR (4 時間後) 及び 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、照射区区の自然水で 1.16%TAR、緩衝液で 0.40%TAR 認められた。(参照 26)

(6) 水中光分解試験 (分解物 B)

Ph-¹⁴C 分解物 B を滅菌蒸留水及び河川水 (元荒川：埼玉県蓮田市) に濃度 1 mg/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 時間キセノン照射 (290~800 nm の範囲で 450±10 W/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。

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た。(参照 27)

5. 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、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 (表 7)。(参照 28)

表 7 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	1.2 mg/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	1.2 kg 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

6. 作物残留試験

果実、野菜及び茶を用いて、ピ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。

果皮を除いた場合のピフェナゼート及び代謝物 B の含量の最高値は 500 g ai/ha で 2 回散布し、最終散布後 1 日目に収穫したいちご（果実）の 2.00 mg/kg であった。（別紙 2）（参照 29～31、66）

作物残留試験の含量分析値を用いて、ピ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が表 8 に示されている。

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ピ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、今回適用拡大申請された作物（うめ、ピーマン、あんず（基準値変更）、さといも、やまいも）を含む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。（参照 29, 30, 31, 66）

表 8 食品中より摂取されるピフェナゼート及びそのアゾ体の含量の推定摂取量

作物名	残留値 (mg/kg)	国民平均 (体重:53.3 kg)		小児(1~6 歳) (体重:15.8 kg)		妊婦 (体重:55.6 kg)		高齢者(65 歳以上) (体重:54.2 kg)	
		Ff (µg/人日)	摂取量 (µg/人日)	ff (µg/人日)	摂取量 (µg/人日)	ff (µg/人日)	摂取量 (µg/人日)	ff (µg/人日)	摂取量 (µg/人日)
トマト	0.17	24.3	4.13	16.9	2.87	24.5	4.17	18.9	3.21
ピーマン	0.41	4.4	1.80	2	0.82	1.9	0.78	3.7	1.52
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 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	0.02	1.4	0.21	0.2	0.03
うめ	0.66	1.1	0.73	0.3	0.20	1.4	0.92	1.6	1.06
おうとう	0.38	0.1	0.04	0.1	0.04	0.1	0.04	0.1	0.04
いちご	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	0.76	3.5	1.89	4.3	2.32
合計			51.5		45.1		41.6		49.4

- 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ピ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 80~82)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ピフェナゼートの推定摂取量(μg/人/日)
 ・みかん以外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0.30 mg/kgを用いた。
 ・さといも、やまいも、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算はしていない。
 ・その他の果実にはいちじくの残留値を用いた。

7. 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9に示されている。(参照 32)

表9 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	無作用量 mg/kg 体重	作用量 mg/kg 体重	結果概要				
中枢神経系	一般状態	マウス 雄 3 雌 3	0, 320, 800, 2000, 5000	2000	5000	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。				
							体重	320	800	軽度な減少、14日までに回復
	一般状態	ラット 雄 5	0, 800, 2000, 5000	5000	—	影響なし				
							体重	800	2000	軽度な減少、3日までに回復
							体温	5000	—	影響なし
	ベキバブルナル睡眠	マウス	雄 8	0, 3.28, 8.19, 20.5, 51.2, 128, 320, 800, 2000, 5000	8.19	20.5-320 2000-5000	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	320	800	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 溶血		雄 5	0, 320, 800, 2000,			—	投与後1日に測 定した結果におい て、影響なし
		雌 5	5000				
凝固							

・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。

8. 急性毒性試験

ピフェナゼートの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>4950 mg/kg体重、マウスの雌雄で>4950 mg/kg体重、経皮LD₅₀はラットの雌雄で>5000 mg/kg体重、吸入LC₅₀はラットの雌雄で>4.4 mg/Lであった。(参照33~36)

代謝物B及びDについてICRマウスを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>5000 mg/kg体重であった。(参照37~38)

9. 眼・皮膚に対する刺激性及び皮膚感作性

NZW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、ピ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39~40)

Hartley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、ピ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41)

10. 亜急性毒性試験

(1) 90日間亜急性毒性試験(ラット)

SDラット(一群雌雄各10匹)を用いた混餌(原体:0、40、200、400ppm:平均検体摂取量は表10参照)投与による90日間の亜急性毒性試験が実施された。

表10 ラット90日間亜急性毒性試験の平均検体摂取量

投与群		40 ppm	200 ppm	400 ppm
検体摂取量 (mg/kg体重/日)	雄	2.7	13.8	27.7
	雌	3.2	16.3	32.6

各投与群で認められた主な所見は表11に示されている。

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

った。

本試験において、200 ppm 以上投与群の雌雄で小葉中心性肝細胞肥大等が認められたので、無毒性量は雌雄ともに 40 ppm (雄：2.7 mg/kg 体重/日、雌：3.2 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 42)

表 11 ラット90日間亜急性毒性試験で認められた所見

投与群	雄	雌
400 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ 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)及び腎体比重量増加 ・ 肝及び脾の髓外造血亢進 ・ 肝クッパー細胞色素沈着 	<ul style="list-style-type: none"> ・ Ht 減少 ・ 副腎比重量増加 ・ 赤脾髄色素沈着増加
200 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ 小葉中心性肝細胞肥大 ・ 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 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 小葉中心性肝細胞肥大 ・ 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、腎及び肝比重量増加
40 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

(2) 90日間亜急性毒性試験(マウス)

ICR マウス(一群雌雄各 10 匹)を用いた混餌(原体:0、50、100、150 ppm:平均検体摂取量は表 12 参照)投与による 90 日間の亜急性毒性試験が実施された。

表 12 マウス90日間亜急性毒性試験の平均検体摂取量

投与群		50 ppm	100 ppm	150 ppm
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	8.0	16.2	24.0
	雌	10.3	21.7	32.9

本試験において、100 ppm 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ので、無毒性量は雄で 150 ppm(24.0 mg/kg 体重/日)、雌で 50 ppm (10.3 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 43)

(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)を用いた混餌(原体:0、40、400、1000 ppm:平均検体摂取量は表 13 参照)投与による 90 日間の亜急性毒性試験が実施された。

表 13 イヌ 90 日間亜急性毒性試験の平均検体摂取量

投与群		40 ppm	400 ppm	1000 ppm
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	0.9	10.4	25.0
	雌	1.3	10.7	28.2

各投与群で認められた主な所見は表 14 に示されている。

本試験において 400 ppm 以上の投与群において、肝比重量増加等が認められたので、無毒性量は雌雄で 40 ppm (雄 : 0.9 mg/kg 体重/日、雌 : 1.3 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 44)

表 14 イヌ 90 日間亜急性毒性試験で認められた所見

投与群	雄	雌
1000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制 ・ 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 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制
400 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ 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 ・ 尿の褐色化及びビリルビンの増加 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 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 ・ 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
40 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

(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 : 0、80、400、1000 mg/kg 体重/日) 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。

1000 mg/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、脾の髓外造血亢進が、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。

本試験において、400 mg/kg 体重/日以上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ので、無毒性量は雌雄で 80 mg/kg 体重/日であると考えられた。(参照 45)

1 1. 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:0、40、400、1000 ppm:平均検体摂取量は表15参照)投与による1年間の慢性毒性試験が実施された。

表15 イヌ1年間慢性毒性試験の平均検体摂取量

投与群		40 ppm	400 ppm	1000 ppm
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	1.01	8.95	23.9
	雌	1.05	10.4	29.2

1000 ppm 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。

本試験において、400 ppm 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 減少が認められたので、無毒性量は雌雄で 40 ppm(雄:1.01 mg/kg 体重/日、雌:1.05 mg/kg 体重/日)であると考えられた。(参照 46)

(2) 2年間慢性毒性/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:平均検体摂取量は表16参照)投与による2年間の慢性毒性/発がん性併合試験が実施された。

表16 ラット104週間慢性毒性/発がん性併合試験の平均検体摂取量

投与群		20 ppm	80 ppm	200/160 ppm
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	1.0	3.9	9.7
	雌	1.2	4.8	9.7

200 ppm 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、160 ppm 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た。

本試験において、80 ppm 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ので、無毒性量は雌雄で 20 ppm(雄:1.0 mg/kg 体重/日、雌:1.2 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 47)

(3) 18ヶ月間発がん性試験(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:平均検体摂取量は表 17 参照)投与による 18ヶ月間の発がん性試験が実施された。

表 17 マウス 18ヶ月間発がん性試験の平均検体摂取量

投与群		10 ppm	100 ppm	225/175 ppm
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	1.5	15.4	35.1
	雌	1.9	19.7	35.7

225 ppm 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、175 ppm 投与群の雌で肝比重量増加が認められた。

本試験において、100 ppm 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ので、無毒性量は雌雄で 10 ppm(雄:1.5 mg/kg 体重/日、雌:1.9 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 48)

1.2. 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:平均検体摂取量は表 18 参照)投与による 2世代繁殖試験が実施された。

表 18 ラット 2世代繁殖試験の平均検体摂取量

投与群			20 ppm	80 ppm	200 ppm
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	P 世代	雄	1.5	6.1	15.3
		雌	1.7	6.9	17.2
	F ₁ 世代	雄	1.7	6.9	17.4
		雌	1.9	7.8	19.4

親動物では、200 ppm 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)が認められた。

本試験において、80 ppm 以上投与群の雄で体重増加抑制(F₁)が、20 ppm 以上投与群の雌で体重増加抑制(F₁)が認められ、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ので、無毒性量は親動物の雄で 20 ppm(P 雄:1.5 mg/kg 体重/日、F₁ 雄:1.7 mg/kg 体重/日)、雌で 20 ppm 未満(P 雌:1.7 mg/kg 体重/日未満、F₁ 雌:1.9 mg/kg 体重/日未満)、児動物の雌雄で 200 ppm(F₁ 雄:15.3 mg/kg 体重/日、F₁ 雌:17.2 mg/kg 体重/日、F₂ 雄:17.4 mg/kg 体重/日、F₂ 雌:19.4 mg/kg 体重/日)であると考えられた。繁殖能に対する影響は認められなかった。(参照 49)

(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、20 ppm:平均検体

摂取量は表 19 参照) 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(12. (1) 参照) で認められた親動物の 20 ppm 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った。

表 19 ラット 2 世代繁殖試験の平均検体摂取量 (追加試験)

投与群			7.5 ppm	15 ppm	20 ppm
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	P 世代	雄	0.6	1.1	1.5
		雌	0.6	1.3	1.7
	F ₁ 世代	雄	0.6	1.1	1.5
		雌	0.6	1.2	1.7

本試験において、親動物では、20 ppm 投与群の雄で肝及び精巣上体尾部比重量増加(P)、雌で胸腺比重量の増加(P)が認められ、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。無毒性量は親動物の雌雄で 15 ppm(P 雄: 1.1 mg/kg 体重/日、P 雌: 1.3 mg/kg 体重/日、F₁ 雄: 1.1 mg/kg 体重/日、F₁ 雌: 1.2 mg/kg 体重/日)、児動物の雌雄で 20 ppm(F₁ 雄: 1.5 mg/kg 体重/日、F₁ 雌: 1.7 mg/kg 体重/日、F₂ 雄: 1.5 mg/kg 体重/日、F₂ 雌: 1.7 mg/kg 体重/日)であると考えられた。繁殖能に対する影響は認められなかった。(参照 50)

(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、500 mg/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認められた。

本試験において、母動物では 100 mg/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、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。無毒性量は母動物で 10 mg/kg 体重/日、胎児で 500 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 51)

(4) 発生毒性試験 (ウサギ)

NZW 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。

本試験において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。無毒性量は、母動物及び胎児で 200 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 52)

13. 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、ピフェナゼートに遺伝毒性はないものと考えられた。(表 20) (参照 53~58)

表 20 遺伝毒性試験結果概要 (ピフェナゼート原体)

試験	対象	投与量	結果	
<i>in vitro</i>	DNA 修復試験	<i>B. subtilis</i> H17, M45 株	1500~24000 µg/7° レート (+/-S9)	陰性
	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537 株 <i>E. coli</i> WP2uvrA 株	10~5000 µg/7° レート (+/-S9)	陰性
	遺伝子突然変異試験	マウスリンパ腫由来培 養細胞(L5178Y)	15~50 µg/mL (-S9) 、 25~500 µg/mL (+S9)	陰性
	染色体異常試験	チャイニーズハムスタ ー卵巣由来培養細胞株 (CHO)	12~375 µg/mL (-S9) 、 20~1250 µg/mL (+S9)	陰性
<i>in vivo</i>	肝 UDS 試験	SD ラット (一群雄 3 匹)	0、500、2000 mg/kg 体 重 (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 mg/kg 体重 雌 : 0、50、100、200 mg/kg 体重 (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、

-S9 : 代謝活性化系非存在下、+S9 : 代謝活性化系存在下

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 13)

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た。

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 21) (参照 59~62)

表 2 1 遺伝毒性試験結果概要 (代謝物)

被験物質	試験	対象	投与量	結果
B	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538 株	100~5000 µg/7 ^レ ト (+/-S9)	陽性 (+S9) TA98株
	遺伝子突然変異試験	マウスリンパ腫由来培養細胞 (L5178Y)	5.0~200 µg/mL (-S9)、 30~100 µg/mL (+S9)	陰性
	小核試験	ICR マウス (一群雄 5 匹)	0、164、260 mg/kg 体重 (単回腹腔内投与)	陰性
D	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537 株 <i>E. coli</i> WP2uvrA 株	156~5000 µg/7 ^レ ト (+/-S9)	陰性

注) +/-S9 : 代謝活性化系存在下及び非存在下、

-S9 : 代謝活性化系非存在下、 +S9 : 代謝活性化系存在下