

要 約

ヒドラジン骨格を有する殺虫剤である「ビフェナゼート」(IUPAC: イソプロピル=2-(4-メトキシビフェニル-3-イル)ヒドラジノホルマート)について、各種毒性試験成績等を用いて食品健康影響評価を実施した。

評価に供した試験成績は、動物体内運命(ラット)、植物体内運命(温州みかん、オレンジ、りんご、なす)、土壌中運命、水中運命、作物残留、土壌残留、急性毒性(ラット、マウス)、亜急性毒性(ラット、マウス、イヌ)、慢性毒性(イヌ)、慢性毒性/発がん性(ラット)、発がん性(マウス)、2世代繁殖(ラット)、発生毒性(ラット、ウサギ)、遺伝毒性試験等である。

試験結果から、発がん性、繁殖能に対する影響、催奇形性及び遺伝毒性は認められなかった。

各試験の無毒性量の最小値はイヌを用いた90日間亜急性毒性試験の0.9 mg/kg 体重/日であったが、より長期の1年間慢性毒性試験では1.0 mg/kg 体重/日であり、この差は用量設定の違いによると考えられた。また、ラットを用いた慢性毒性/発がん性併合試験の無毒性量も1.0 mg/kg 体重/日であったので、これらを根拠として、安全係数100で除した0.01 mg/kg 体重/日を一日摂取許容量(ADI)とした。

1 評価対象農薬の概要

1. 用途

殺虫剤(殺ダニ剤)

2. 有効成分の一般名

和名：ビフェナゼート

英名：bifenazate (ISO名)

3. 化学名

IUPAC

和名：イソプロピル=2-(4-メトキシビフェニル-3-イル) ヒドラジノホルマート

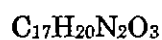
英名：isopropyl 2-(4-methoxybiphenyl-3-yl)hydrazinoformate

CAS(No.149877-41-8)

和名：1-メチルエチル=2-(4-メトキシ[1,1'-ビフェニル]-3-イル) ヒドラジンカルボキシラート

英名：1-methylethyl 2-(4-methoxy[1,1'-biphenyl]-3-yl)-hydrazinecarboxylate

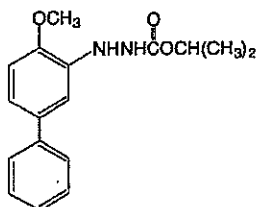
4. 分子式



5. 分子量

300.36

6. 構造式



7. 開発の経緯

ビフェナゼートは、1992年に米国ユニロイヤル社により開発されたヒドラジン骨格を有する殺虫剤(殺ダニ剤)であり、ハダニやサビダニに対し速効的な効果を示す。

ビフェナゼートは、米国、オーストラリア、韓国、アルゼンチン、チリ等で、果樹類、野菜類等に登録されており、我が国では2000年8月17日に果実、野菜、茶等を対象に初めて登録され、原体ベースで年間47.5トン(平成14農業年度)輸入されている。(参照1)

2005年3月24日に日産化学工業株式会社(以下「申請者」という。)より農薬取締法に基づくうめ、ピーマン等への適用拡大登録申請がなされ、参照2~66の資料が提出されている。

II. 試験結果概要

各種運命試験 (II-1~4) は、ビフェナゼートのビフェニルの A 環を ^{14}C で標識したもの (Ph- ^{14}C ビフェナゼート)、ヒドラジンカルボン酸エステル部分のカルボニル基炭素を ^{14}C で標識したもの (Car- ^{14}C ビフェナゼート)、ビフェナゼートのヒドラジン酸化体 (以下「アゾ体」又は「代謝物 B」という) のビフェニルの A 環を ^{14}C で標識したもの (Ph- ^{14}C 代謝物/分解物 B) を用いて実施された。放射能濃度及び代謝物濃度は特に断りがない場合ビフェナゼートに換算した。代謝物/分解物略称及び検査値等略称は別紙 1 及び 2 に示した。

1. ラットにおける動物体内運命試験

(1) 吸収・分布・代謝・排泄 (Ph- ^{14}C ビフェナゼート)

SD ラットに Ph- ^{14}C ビフェナゼートを 10 mg/kg 体重 (低用量)、1000 mg/kg 体重 (高用量) の用量で単回強制経口投与し、ビフェナゼートの吸収・分布・代謝・排泄試験が実施された。

血漿中放射能濃度推移については、血漿中最高濃度到達時間 (T_{\max}) が低用量投与群で 5~6 時間、高用量投与群で 18~24 時間、血漿中放射能最高濃度 (C_{\max}) が低用量投与群で 5.6~6.4 $\mu\text{g/g}$ 、高用量投与群で 71~119 $\mu\text{g/g}$ 、消失半減期 ($T_{1/2}$) が低用量投与群で 12~13 時間、高用量投与群で 12~16 時間であった。

投与後 168 時間までの糞及び尿中排泄率はそれぞれ低用量投与群で総投与放射能 (TAR) の 66% 及び 24~25%、高用量投与群でそれぞれ 82~83% TAR 及び 8~9% TAR であった。胆汁排泄率は、投与後 72 時間までで低用量投与群で 69~74% TAR、高用量投与群で 21~26% TAR であった。吸収率 (胆汁中排泄率 + 尿中排泄率) は低用量投与群で 79~85% TAR、高用量投与群で 22~29% TAR であった。性差は認められなかった。

単回投与における主要組織の残留放射能が表 1 に示されている。

表 1 単回投与における主要組織の残留放射能濃度 ($\mu\text{g/g}$)

投与条件		T_{\max} 時付近 [*]	投与 168 時間後
Ph- ^{14}C 低用量	雄	肝臓(7.61), 血漿(6.29), 膀胱(5.04), 全血(4.09), 腎臓(3.96), 赤血球(3.40)	全ての組織で 0.42 以下
	雌	血漿(4.83), 肝臓(4.71), 膀胱(4.12), 腎臓(3.90), 全血(3.78), 赤血球(2.61)	
Ph- ^{14}C 高用量	雄	腸間膜脂肪(114), 血漿(105), 全血(81.2), 腎臓(73.6), 肝臓(66.8), 赤血球(57.4), 膀胱(57.4), 肺(36.0), 心臓(28.8), 脾臓(17.8)	赤血球(28.9), 脾臓(25.3), 全血(15.4), 肝臓(11.1), 腎臓(10.8), 心臓(4.86), 肺(4.49)
	雌	膀胱(73.0), 血漿(48.9), 全血(45.0), 赤血球(38.1), 肝臓(35.5), 腎臓(33.5), 肺(21.2), 心臓(16.6), 脾臓	脾臓(68.2), 赤血球(47.2), 肝臓(18.0), 全血(14.8), 腎臓(14.6), 心臓(7.88), 肺(6.08)

	(9.86)	
--	--------	--

※低用量：投与 6 時間後、高用量：投与 18 時間後

尿、糞及び胆汁中で認められた代謝物が表 2 に示されている。

表 2 尿、糞及び胆汁中における代謝物

投与条件及び 排泄箇所		時間 (hr)	ビフェナゼート (%TAR)	代謝物 (%TAR)
Ph- ¹⁴ C 低用量 10 mg/kg 体重	尿	0~96	N.D.	V(9.0~12), U(4.2~9.5), W(0.2~4.8)
	糞	0~96	4.8~7.2	R* (6.3~8.9), E(5.5~7.1), X(3.6~6.8), Y(2.4~5.6), B(4.2~5.0), その他(3.5 未満)
	胆汁	0~24	N.D.	E(17~20), F(17~19), R*(9.2~12.1), G, X 及び Y(7.6 未満)
Ph- ¹⁴ C 高用量 1000 mg/kg 体重	尿	0~96	N.D.	U(4.4~5.4), その他(2.3 未満)
	糞	0~96	48~61	X(2.4~6.6), R(4.7~5.6), その他(2.1 未満)
	胆汁	0~72	0.4~0.6	R*(9.0~13.4), F, E, G 及び X(2.8 未満), Y(N.D.)

※代謝物 R：ビフェナゼートのグルクロン酸抱合体

N.D.:検出されず

ビフェナゼートは、速やかなヒドラジン部位のグルクロン酸抱合化及び B 環の水酸化と共に、ヒドラジン酸化（以下「アゾ化」という。）され、*o*-脱メチル化、ベンゼン環の水酸化及びヒドラジカルボン酸部位の脱離による分子開裂及びグルクロン酸または硫酸抱合反応を受け体外に排泄されることが考えられた。（参照 3）

(2) 雌ラットにおける組織内濃度 (Ph-¹⁴C ビフェナゼート)

Ph-¹⁴C ビフェナゼートを 1000 mg/kg 体重（高用量）の用量で SD ラットの雌（一群各 2 匹）に単回強制経口投与し、組織内濃度（脾、血液、血漿、血球及び肝）の測定が実施された。

高用量投与群の雌の脾臓において、投与後 168 時間まで経時的に放射能濃度が増加したため（1. (1) 参照）、脾臓及び投与 168 時間後の残留濃度が高い血液、血漿、血球及び肝臓についての組織内濃度が 30 日後まで調べられたところ、脾臓では 14 日後の 47 µg/g を最高値として 21 日及び 30 日後にはそれぞれ 36 µg/g、13 µg/g に減少し、その他については投与 1 日後が最高濃度となり、30 日後には肝臓で 1.3 µg/g、血液、血漿及び血球につ

いては検出限界以下に減少した。(参照 4)

(3) 血漿、赤血球及び脾臓中代謝物

SD ラットに Ph-¹⁴C ビフェナゼートを 10 mg/kg 体重 (低用量) 及び 200 mg/kg 体重 (高用量) の用量で単回強制経口投与し、組織 (血漿、赤血球、脾) 中の代謝物が分析された。

血漿、赤血球及び脾臓中の組織中残留濃度は、低用量投与群でそれぞれ 5.7~8.96、0.7~1.3 及び 0.6~1.2 µg/g、高用量投与群でそれぞれ 45~68、10~12 及び 5.8~12 µg/g であった。代謝物等の比率が表 3 に示されている。

表 3 血漿、赤血球及び脾臓中における代謝物

	低用量 (投与 4 時間後)			高用量 (投与 6 時間後)		
	血漿	赤血球	脾臓	血漿	赤血球	脾臓
酢酸エチル画分 ビフェナゼート	0.4~0.8	48~50	17~27	N.D.	35~36	45~49
E	55~59	N.D.	32~51	47~49	N.D.	27~28
X	0.2	25~28	9.0~12	N.D.	2.9~6.0	2.6~4.8
水画分	34~37	8.5~13	4.1	44~48	25~32	N.D.
抽出残渣	—	11~13	5.7~7.7	—	27~33	11

N.D.: 検出されず —: 該当なし

注) 単位は試料中放射能に対する割合(%)

血漿中の中性水画分について酵素分解したところ、低及び高用量投与群でそれぞれ血漿中放射能の 84%及び 91%が代謝物 E として遊離したので、血漿中代謝物の多くが E のグルクロン酸/硫酸抱合体であると考えられた。

赤血球では高用量投与群で水画分に赤血球中放射能の 25~32%、抽出残渣に 27~33%認められたが、水画分はプロテアーゼ分解及び凍結乾燥/メタノール抽出を、抽出残渣は酸性/アルカリ性下加熱加水分解を試みたが、いずれの処理においても放射性化合物はほとんど遊離しないので、赤血球成分に強固に結合していると考えられた。また、Car-¹⁴C ビフェナゼートを高用量投与し 6 時間後に赤血球中の代謝物比率が分析されたところ、ビフェナゼートが赤血球中放射能の 85.4%、代謝物 X が 4.4%、水画分に 4.8%、残渣に 4.1%認められた。Ph-¹⁴C ビフェナゼート投与後の水画分及び抽出残渣比率 (それぞれ約 30%) が Car-¹⁴C ビフェナゼート投与後よりも高いことから、Ph-¹⁴C ビフェナゼート投与後の赤血球中水画分及び抽出残渣中代謝物はカルボニル部位を有しないビフェニル代謝物に由来するものと考えられた。(参照 5~6)

(4) 吸収・分布・代謝・排泄 (Car-¹⁴C ビフェナゼート)

SD ラットに Car-¹⁴C ビフェナゼートを 10 mg/kg 体重 (低用量)、1000 mg/kg 体重 (高用量) の用量で単回強制経口投与し、ビフェナゼートの吸収・分布・代謝・排泄試験が実施された。

投与 48 時間後までに低用量投与群では呼気中、糞中及び尿中にそれぞれ 36.8%TAR、

48.2%TAR 及び 4.5%TAR が、高用量投与群では呼気中、糞中及び尿中にそれぞれ 4.9%TAR、85.8%TAR 及び 0.6%TAR が排泄された。

72 時間後の組織残留量は、肝臓において低用量投与群で 0.27 µg/g、高用量投与群で 4.2 µg/g であり最も組織内濃度が高かったが、他の組織での残留濃度は低く、組織残留性は認められなかった。

投与後 24 時間までの低及び高用量投与群における尿中への排泄は、ビフェナゼート及び代謝物ともに、ほとんど認められなかった。投与後 48 時間までの低用量投与群の糞中への排泄は、ビフェナゼートが 7.1%TAR、代謝物として X、Z がそれぞれ 7.4%TAR、5.9%TAR、その他の代謝物として Y、B 等が認められたが、いずれも 1.3%TAR 未満であった。投与後 48 時間までの高用量投与群の糞中への排泄は、ビフェナゼートが 77.0%TAR、代謝物として X、B、Z 及び Y 等が認められたが、いずれも 1.6%TAR 以下であった。

カルボニル部分は代謝分解により CO₂ となり、呼気中に排泄されると考えられた。(参照 7)

(5) ラット門脈血漿中のビフェナゼート及び代謝物 B の分析

ビフェナゼート又は代謝物 B を 10 mg/kg 体重の用量で強制経口投与した SD ラットの門脈中の血漿を採取し、ビフェナゼート及び代謝物 B の分析が行われた。

ビフェナゼート投与 0.5~2 時間後にビフェナゼートと代謝物 B の合計にしめる代謝物 B の存在率 2%以上を示す試料が 18 試料中 6 試料認められた。これは、ラット体内でビフェナゼートから代謝物 B への変換を示していると考えられた。

代謝物 B 投与 1 時間後の門脈血漿中からビフェナゼート及び代謝物 B は認められなかった。これは、代謝物 B が腸管吸収時に分解されたためと考えられた。(参照 8)

(6) ビフェナゼート及び代謝物 B のラットにおける吸収、分布、代謝及び排泄

SD ラットに Ph-¹⁴C ビフェナゼート又は Ph-¹⁴C 代謝物 B を 10 mg/kg 体重の用量で強制経口投与し、ビフェナゼート及び代謝物 B の吸収、分布、代謝及び排泄試験が実施された。

ビフェナゼート及び代謝物 B の吸収、分布、代謝及び排泄の結果が表 4 に示されている。

ビフェナゼート投与の場合、血漿、肝及び脾からビフェナゼート及び代謝物 X (ベンゼン環の水酸化) が認められたので、ビフェナゼートとして吸収されると考えられた。ビフェナゼートは、①N-抱合化又はベンゼン環水酸化 (X) に続く抱合体形成後、胆汁を介し糞中へ排泄、②アゾ化(B)を経た脱メチル体(Z)として糞中へ排泄、③ヒドラジンカルボン酸エステルの脱離により生成したビフェニル関連代謝物が抱合体形成後、尿及び糞中に排泄されると考えられた。

代謝物 B 投与の場合、アゾカルボン酸エステル部分を有する代謝物はほとんど認められず、分子開裂が速やかに起こると考えられた。ビフェナゼートの場合と比べ、生成したビフェニル関連代謝物のうち G の生成比率が増加し、その抱合体が尿中に多く排泄されたので、ビフェナゼート及び代謝物 B における尿及び糞の排泄比率に違いが生じたと考えられた。(参照 9)

表4 ビフェナゼート及び代謝物Bの吸収、分布、代謝及び排泄の結果

		ビフェナゼート	代謝物 B
排泄	糞中(%TAR) 0~72hr	62.8	44.3
	尿中(%TAR) 0~72hr	28.8	46.8
	胆汁中(%TAR) 0~24hr	55.4	22.9
血漿濃度推移	C _{max} (µg/g)	6.96	13.2
	T _{max} (hr)	5.77	5.81
	T _{1/2} (hr)	6.52	7.23
組織分布	6hr 後 (µg/g)	血漿(8.32)、肝(6.55)、血液(6.23)、副腎(3.61)、腎(3.51)、脂肪(2.75)及び肺(2.59)、その他 (1.7未満)	
	72hr 後 (µg/g)	肝(0.72)、腎(0.34)、肺(0.18)、血液(0.17)、その他 (0.1未満)	肝(0.28)、副腎(0.25)、腎(0.13)、血液(0.12)、その他(0.1未満)
代謝	尿中 0~48hr	G のグルクロン酸又は硫酸抱合体 (10.6%TAR)、E の抱合体(2.0%TAR)	G のグルクロン酸又は硫酸抱合体 (20.7%TAR)
	糞中 0~72hr (代謝物Bは0~48hr)	Z (6.6%TAR)、A (5.8%TAR)、E 及び X (それぞれ 3.0%TAR 程度)、その他の代謝物 (2%TAR 未満)	D、G (それぞれ 4%TAR 程度)
	胆汁中 0~24hr	E のグルクロン酸又は硫酸抱合体 (11.6%TAR)、F、G、A、Y の抱合体 (それぞれ 3~5%TAR 程度)、その他の代謝物 (2%TAR 未満)	G 及び E のグルクロン酸又は硫酸抱合 (それぞれ 7.5%TAR、3.6%TAR)
代謝	血漿中 4hr 後	TRR=8.94 µg/g : ビフェナゼート (0.5%TRR)、E (47.3%TRR)	TRR=11.3 µg/g : ビフェナゼート (<0.1%TRR)、E(30.1%TRR)
	肝中 4hr 後	TRR=7.66 µg/g : ビフェナゼート (5.3%TRR)、E(10%TRR)、X(5.6%TRR)	TRR=4.5 µg/g : ビフェナゼート (1.3%TRR)、E(30.1%TRR)、G(9.3%TRR)
	脾中 4hr 後	TRR=1.37 µg/g : ビフェナゼート (22.9%TRR)、E (26.8%TRR)、X(7.0%TRR)	TRR=0.89 µg/g : ビフェナゼート (0.3% TRR)、E(71.5%TRR)

2. 植物体内運命試験

(1) 温州みかん (Ph-¹⁴C ビフェナゼート)

Ph-¹⁴C ビフェナゼートを5年生の果実肥大後期~着色初期のみかん樹全面に 420 g ai/ha で散布し、散布後 0、28、56、84 日後に検体として果実及び葉を採取し、ビフェナゼート

の温州みかん（品種：C. unshiu Marcovitch）における代謝試験が実施された。

84日後のみかん果実の総残留放射能（TRR）は0.28 mg/kgで、その分布は果皮で41%、果肉で4.1%、表面洗浄液に55%であった。果皮と表面洗浄液でピフェナゼートが50%TRR(0.14 mg/kg)、代謝物としてD、B、H及びCがいずれも2.6%TRR未満、果皮で水溶性物質が3.3%TRR認められた。果肉ではピフェナゼートが0.42%TRR(0.001 mg/kg)、水溶性物質が2.6%TRR認められたほか、代謝物はほとんど認められなかった（0.01%TRR以下）。

84日後のみかん葉のTRRは16.5 mg/kgで、そのうち表面洗浄液に71%であり、みかん葉に処理されたPh-¹⁴Cピフェナゼートの浸透移行速度は果実より遅かった。葉における代謝は果実中と同様であり、葉と表面洗浄液でピフェナゼートが55%TRR(9.15 mg/kg)、代謝物としてB、D、C及びHが認められたがいずれも3.4%TRR未満であった。

ピフェナゼートはみかん果実において、代謝物B及びCに酸化され、代謝物BはさらにD及びHに代謝され、これらは水酸化ビフェニル誘導体やその一部は糖抱合体に変換され高極性の水溶性代謝物に代謝されるほか、植物体構成成分に取り込まれると考えられた。

（参照 10）

（2）温州みかん（Ph-¹⁴Cピフェナゼート及びCar-¹⁴Cピフェナゼート）

Ph-¹⁴C及びCar-¹⁴Cピフェナゼートをみかん果実表面に処理し、14日後に検体として果実を採取し、ピフェナゼートの温州みかんにおける代謝試験が実施された。

試験結果は表5に示すとおり標識位置による大きな違いは認められなかった。その他の代謝物は標識体間に差はなく、ただビフェニル部分のみを有する代謝物Dが微量検出された。ヒドラジンカルボン酸エステル部分のみの代謝物は認められなかった。（参照 11、6）

表5 みかんにおけるPh-¹⁴C及びCar-¹⁴Cピフェナゼートの代謝比較

		Ph- ¹⁴ Cピフェナゼート	Car- ¹⁴ Cピフェナゼート
表面洗浄液		76	81
果皮		18	9.5
果肉		<0.1	<0.1
表面洗浄液	ピフェナゼート	68	66
及び果皮中	代謝物	B(2.0), D(<0.1)	B(1.6), D(<0.1)

※単位は%TRR

（3）オレンジ

Ph-¹⁴Cピフェナゼートを4回目の結実期を迎えるオレンジ樹に420 g ai/ha（通常施用区）及び2240 g ai/ha（過剰施用区）となるように散布し、散布後0、43、184、274、442日に検体として成熟果実及び葉を採取し、ピフェナゼートの代謝試験が実施された。

43日後の成熟オレンジ果実のTRRは通常施用区で0.35 mg/kg、過剰施用区で1.47 mg/kgであった。通常処理区では、表面洗浄液中で77.8%、果皮で20.2%、果肉で0.9%、ジュースで1.2%であり、果皮と表面洗浄液ではピフェナゼートが75%TRR(0.266 mg/kg)、主要代謝物としてBが7.4%TRR(0.026 mg/kg)、果肉及びジュースからはピフェナゼート

のみが認められ、0.2%TRR(0.001 mg/kg)及び0.7%TRR(0.003 mg/kg)であった。微量代謝物としてC、D及びHが同定されたが、いずれも1%TRR未満であった。過剰施用区についても、通常施用区と同様の傾向が認められた。

施用されたピフェナゼートは大部分が果実表面に残留し、少量が緩やかに果実内部に浸透し、代謝物Bに酸化され、最終的に極性代謝物及び結合体残留物として存在すると考えられた。(参照12)

(4) りんご

Ph-¹⁴C ピフェナゼートを1987年に移植したりんご樹(品種:Granny Smith)に420 g ai/ha(通常施用区)及び2240 g ai/ha(過剰施用区)となるように茎葉散布し、散布後0、31、101日後に検体として果実及び葉を採取し、ピフェナゼートの代謝試験が行われた。

101日後の通常施用区の全果実における残留放射能及びその内容が表6に示されている。

表6 101日後の果実における残留放射能(通常施用区)

試料部位	部位別分布 (%)	ピフェナゼート (%TRR)	代謝物 (%TRR)
表面洗浄液	54.8	33.0	B(4.8), C及びD(1.0未満)
絞りかす	34.9	0.6	B(0.8), C及びD(0.1以下)
ジュース	10.4	0.1未満	B, C及びD(0.1以下)

※果実全体のTRRは0.088 mg/kg (2本の果樹から得られた値の平均値)

101日後の通常施用区の葉では、TRRが9.3 mg/kgであり、ピフェナゼートと代謝物Bが認められた。

過剰施用区でも、残留放射能及びその内容については通常施用区と同様の傾向が認められたが、全果実中から微量代謝物としてIが0.3%TRR(0.001 mg/kg)認められた。

ピフェナゼートの果実中への浸透はきわめて少量であり、果実中に浸透した少量のピフェナゼートは代謝物Bに酸化され、最終的に多数の極性産物及び結合体残留物へと広範囲に代謝されると考えられた。(参照13)

(5) なす

① なす幼植物における代謝試験

Ph-¹⁴C ピフェナゼートをアセトニトリル溶液200 µg/mlに調製したもの100 µLを、6葉期まで栽培したなす(品種:千両2号)の第4葉の表側に処理し、処理後3、7、14日後に処理葉、処理葉より上部、処理葉より下部及び根部を検体として、ピフェナゼートのなす幼植物における代謝試験が実施された。

14日後の検体全体のTRRは4.4 mg/kgであり、処理葉の表面洗浄液画分で71.7%TRR、有機溶媒抽出画分で15.5%TRR、水画分及び残渣でそれぞれ5.95%、11.7%TRR認められた。また、処理葉以外の合計で1.04%TRRであったことから、処理葉からそれ以外の植物体へ移行するピフェナゼート及び代謝物の量は極めて少ないと考えられた。

14日後の処理葉で、ピフェナゼートが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 ピフェナゼートを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ピ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ピ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。抽出液からピフェナゼート、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 ピフェナゼート)

好氣的土壌(軽埴土：静岡、滅菌及び非滅菌)においてPh-¹⁴C ピフェナゼートを、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、ピ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。

施用直後でピフェナゼートは85.0%TARであり、0.5時間後には8.37%TARに減少した。ピ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。

半減期はピ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、ピ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、ピ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。ピ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。

半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すぐに脱離し、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、Koc=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4.8cm×高さ30cmの土壤カラムに520g ai/haの割合でPh-¹⁴Cビフェナゼートを処理後、25±1°Cの暗条件下、雨量換算100mm/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0~6cm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では25及び35°Cでそれぞれ21.5日及び13.1日、pH7では25及び35°Cで50.7時間及び16.1時間、pH9では25及び35°C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未滿認められた。(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未滿であった。

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未滿であった。

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、光照射区の自然水で 1.16%TAR、緩衝液で 0.40%TAR 認められた。(参照 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 となるように加えた後、25°C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 (290~800 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。

半減期は光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に分解されることが考えられた。(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 @/人/日	摂取量 (µg/人/日)	ff @/人/日	摂取量 (µg/人/日)	ff @/人/日	摂取量 (µg/人/日)	ff @/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 かみきつ	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	0.76	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)。

- ・「f」：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
ヘキサバルビタール睡眠	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,			5000	—	投与後 1 日に測 定した結果におい て、影響なし
	凝固		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。

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、400 ppm : 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 1 3 イヌ 9 0 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 1 4 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、蒸留水で湿らせたビ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、脾の髓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)

12. 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化、+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 につい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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (+/-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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (-S9)、 30~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (+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> WP2 <i>uvrA</i> 株	156~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (+/-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

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、500 ppm）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。

500 ppm 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。ビ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た。（参照 63）

(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、200 mg/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。

200 mg/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。200 mg/kg 体重/日は溶血性貧血を誘発する用量と考えられた。（参照 64、6）