

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。血漿、赤血球及び脾臓中における放射能分布が表 3 に示されている。

表 3 血漿、赤血球及び脾臓中における放射能分布 (%TRR)

	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 TRR: (各試料中の) 総残留放射能

血漿中の中性水画分について酵素分解処理したところ、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 として遊離したため、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% が認められたが、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 時間後に赤血球中放射能に対する代謝物の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。phe-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、phe-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。

投与後 48 時間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 時間後の組織残留濃度は、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 B、Y 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 B、X、Y 及び Z 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、呼気中に排泄されたと考えられた。(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

ビフェナゼートまたは代謝物 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 phe-¹⁴C-ビフェナゼートまたは phe-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たと考えられた。ビフェナゼートは、①N-抱合化または B 環 4 位の水酸化 (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 O-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たと考えられた。

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 中 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	6 hr 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)	
	72 hr 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 0~48 hr	G のグルクロン酸または硫酸抱合体(10.6%TAR)、E の抱合体(2.0%TAR)	G のグルクロン酸または硫酸抱合体(20.7%TAR)
	糞中 0~72 hr (代謝物Bは0~48hr)	Z (6.6%TAR)、ピフェナゼート(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 0~24 hr	E のグルクロン酸または硫酸抱合体(11.6%TAR)、F、G、ピフェナゼート、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 のグルクロン酸または硫酸抱合(それぞれ7.5%TAR、3.6%TAR)
	血漿中 4 hr 後	残留放射能=8.94 μg/g:ピフェナゼート(0.5%TRR)、E (47.3%TRR)	残留放射能=11.3 μg/g:ピフェナゼート(<0.1%TRR)、E(30.1%TRR)
	肝中 4 hr 後	残留放射能=7.66 μg/g:ピフェナゼート(5.3%TRR)、E(10%TRR)、X(5.6%TRR)	残留放射能=4.5 μg/g:ピフェナゼート(1.3%TRR)、E(30.1%TRR)、G(9.3%TRR)
	脾中 4 hr 後	残留放射能=1.37 μg/g:ピフェナゼート(22.9%TRR)、E (26.8%TRR)、X(7.0%TRR)	残留放射能=0.89 μg/g:ピフェナゼート(0.3%TRR)、E(71.5%TRR)

2. 植物体内運命試験

(1) 温州みかん (phe-¹⁴C-ピフェナゼート)

phe-¹⁴C-ピフェナゼートを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0、28、56及び84日後に検体として果実及び葉を採取し、ピフェナゼートの温州みかん(学名:C. unshiu Marcovitch)における植物体内運命試験が実施された。

84日後のみかん果実の残留放射能濃度は0.28 mg/kgで、その分布は果皮で41%TRR、果肉で4.1%TRR、表面洗浄液に55%TRR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B、C、D及びHがいずれも2.6%TRR未滿、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日後のみかん葉の残留放射能濃度は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phe-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、C、D及びHが認められたが、いずれも3.4%TRR未滿であった。

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他、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 (phe-¹⁴C-ピフェナゼート及びcar-¹⁴C-ピフェナゼート)

phe-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植物体内運命試験が実施された。

各試料中における放射能分布は表5に示されている。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位置の違いによる差はなく、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6、11)

表5 各試料中における放射能分布 (%TAR)

		phe- 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)

(3) オレンジ

phe-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(品種:バレンシアオレンジ種)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0、43、184、274及び442日後に検体として成熟果実及び葉を採取し、ピフェナゼートの植物体内運命試験が実施された。

43日後の成熟オレンジ果実の残留放射能量は通常施用区で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%TRR、果皮で20.2%TRR、果肉で0.9%TRR、ジュース(果汁)で1.2%TRRであり、果皮と表面洗浄液での含量としてピフェナゼートが74.2%TRR(0.26 mg/kg)、主要代謝物としてBが7.4%TRR(0.026

mg/kg)、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。果肉及びジュース(果汁)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。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

phe-¹⁴C-ピフェナゼートを移植 9 年後のりんご樹(品種: Granny Smith 種)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 0、31 及び 101 日後に検体として果実及び葉を採取し、ピフェナゼートの植物体内運命試験が行われた。

101 日後の通常施用区の全果実における放射能分布が表 6 に示されている。

表 6 101 日後の全果実における放射能分布(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 未満)
ジュース(果汁)	10.4	0.1 未満	B、C 及び D(0.1 未満)

※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代謝物及び結合体残留物へと広範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植物体内運命試験

phe-¹⁴C-ピフェナゼートの 200 µg/ml アセトニトリル溶液 100 µL を、6 葉期なす(品種: 千両 2 号)の第 4 葉の表側に処理し、処理 3、7 及び 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植物体内運命試験が実施された。

14 日後の検体全体の残留放射能濃度は 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 6.0% TRR、

11.7%TRR 認められた。また、処理葉以外の合計で 1.0%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、C、D、F、G、K 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

phe-¹⁴C-ピフェナゼートを 1000 g ai/ha 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、処理 7、14、21 及び 28 日後に検体として果実、へた、花、葉及び茎を採取し、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残留放射能濃度は果実で 5.3 mg/kg、葉及び茎で 52.0mg/kg、花で 12.9 mg/kg といずれも 0.3%TAR 以下であり、根から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、なす採取後の土壌中残留放射能濃度は 72.2%TAR あり、アセトニトリル及び塩酸酸性アセトニトリルにより 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、E 及び H 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：phe-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 phe-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、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。

処理直後でピフェナゼートは 85.0%TAR であり、0.5 時間後には 8.4%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 時間後には最高濃度(77.7%TAR)に達した後、急速に分解し、28 日後には 1.2%TAR となった。分解物 D、H 及び J が 1 日後に最高濃度(22.8%TAR、7.9%TAR 及び 5.6%TAR)に達した後、28 日後にそれぞれ 1.9%TAR、0.9%TAR 及び 0.5%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。

推定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、ピフェナゼートは処理直後で 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、処理直後の 4.6%TAR から 0.5 時間後には最高濃度(73.5%TAR)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 の推定半減期は 12.6 日であった。分解物 D 及び H は処理直後から緩やかに増加し、14 日後には 8.6% TAR 及び 3.1% 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反応により分解物 B に酸化され、次いで主に生物学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) 好氣的土壌中運命試験 (米国土壌)

好氣的土壌 (砂壤土 : 米国) において phe-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、好氣的土壌中運命試験が実施された。

処理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 時間後に最高濃度 (92% TAR) に達した後、急速に分解し、28 日後には 2.8% TAR となった。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 1.1% TAR が認められた。

推定半減期はビフェナゼートで 0.5 時間以内、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、腐植物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) 好氣的土壌中運命試験 (日本土壌 : car-¹⁴C-ビフェナゼート)

好氣的土壌 (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壌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 2.4% 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 7.1% TAR、24 時間後で 5.5% TAR、144 時間後で 1.7% 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、いずれも 3.1% 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 0.2% TAR、24 時間後に 3.3% TAR に増加した後、144 時間後には 2.1% 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壌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壌中で速やかに脱離し、CO₂ になると考えられた。(参照 18)

(4) 嫌氣的湛水底質中運命試験

米国オハイオ州の池より採取した表面水と底質による実験系（水：底質=3：1）を窒素雰囲気中において嫌気状態とし、その水相に phe-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 ヶ月間インキュベートし、嫌氣的湛水底質中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、推定半減期は 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 及び 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 が生成した。また、分解物 E や底質の結合性残留物の生成も考えられた。（参照 19）

（5）分解物 D の土壌吸着試験（日本土壌）

ビフェナゼート及びその主要代謝物 B は土壌中の半減期が短いため、土壌中で比較的安定な主要分解物 D について、重植土（茨城）、砂質植壤土（愛知）、シルト質植壤土（熊本）及び壤質砂土（宮崎）を用いて土壌吸着試験が実施された。

Freundlich の吸着係数 K_{ads} は 31~2520、有機炭素補正による吸着係数 K_{oc} は 2790~19400 であった。分解物 D の土壌中での移動性は極めて小さいと考えられた。（参照 20）

（6）土壌カラムリーチング試験（米国土壌）

米国 4 土壌（シルト質壤土、砂壤土×2、シルト質植壤土）を用いて土壌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 の土壌カラムに 520 g ai/ha の割合で phe-¹⁴C-ビフェナゼートを処理後、25±1°Cの暗条件下、雨量換算 100 mm/日で 5 日間溶出したところ、いずれの土壌カラムにおいても全溶出液中で 3%TAR 未満であり、放射能の多くは土壌カラムの 0~6 cm 部分に存在したことから、ビフェナゼートの土壌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

phe-¹⁴C-ビフェナゼートを pH 4（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°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 pH 4 では 25 及び 35°Cでそれぞれ 21.5 日及び 13.1 日、pH 7 ではそれぞれ 50.7 時間及び 16.1 時間、pH 9 ではそれぞれ 6.7 時間及び 3.1 時間

であり、主要分解物として B 及び J が認められた

加水分解によるビフェナゼートの減衰は全ての pH で 2 相性を示し、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

phe-¹⁴C-ビフェナゼートをアセトニトリルに溶解し 1 µg/mL となるように pH 4, 5 (酢酸緩衝液)、7 (リン酸緩衝液) 及び 9 (ホウ酸緩衝液) の滅菌緩衝液に添加し、暗所、25°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。

pH 4、5、7 及び 9 のそれぞれの推定半減期は 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、α 相は緩やかに、β 相は速やかに進んだ。α 相では各 pH に共通の分解物 B、D 及び J が生成した。その他、10% TRR を超えて認められた分解物は pH 7 と 9 の緩衝液中で J の 2 量体であった。また、β 相では pH 4 以外で H が 7% TRR 未満認められた。

(参照 23)

(3) 水中光分解試験

phe-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 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 12 時間、河川水については 2 時間キセノン光照射(450±10 W/m²、波長範囲：290~800 nm)し、ビフェナゼートの水中光分解試験が実施された。

推定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。

河川水中における 2 時間後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 C、D 及び H は 2% TAR 未満であった。

滅菌蒸留水中における 12 時間後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 C、D 及び H 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 B に光分解され、さらに C、D、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 (pH 5 滅菌酢酸緩衝液)

phe-¹⁴C-ビフェナゼートを pH 5 の滅菌酢酸緩衝液に 1 mg/L となるように加えた後、25°C、150 時間(明暗各 12 時間間隔)キセノンランプの疑似太陽光(7000 W、波長範囲：250~400 nm、380~750 nm)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。

ビフェナゼートの推定半減期及び 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。初期主要分解物 B は、78 時間後に暗所区で最大の 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。光照射区では分解物 D 及び J が 24 時間後に 3.5% TAR 及び 5.4% 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 pH 7 滅菌緩衝液における水中光分解

phe-¹⁴C-ビフェナゼートを濾過滅菌した自然水(河川水、米国オハイオ州)及び pH 7 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°C、12 時間キセノンランプ(7000 W、波長範囲: 250~400 nm、380~750 nm)の疑似太陽光を照射し、自然水及び pH 7 滅菌緩衝液における水中光分解試験が実施された。

推定半減期及び 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、光照射区の自然水で 1.2% 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)

phe-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 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(450±10 W/m²、波長範囲: 290~800 nm)し、分解物 B の水中光分解試験が実施された。

推定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 時間後の河川水の分解物 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 C、D、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 を分析対象化合物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	1200 g 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、圃場試験でフロアブルを使用

6. 作物残留試験

果実、野菜、茶等を用いて、ビフェナゼート及び代謝物Bまた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。

結果は別紙3に示されている。

ビフェナゼートの最高値はぶどう(果皮)を除くと、最終散布44~45日後に収穫したぶどう(果実)の1.41 mg/kgであった。(参照29~31、66)

別紙3の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が表8に示されている。なお、本推定摂取量の算定は、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、今回申請されたかんしょ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ビ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: 16.8 kg)		妊婦 (体重: 55.6 kg)		高齢者(65歳以上) (体重: 54.2 kg)	
		ff (g/人/日)	摂取量 (g/人/日)	ff (g/人/日)	摂取量 (g/人/日)	ff (g/人/日)	摂取量 (g/人/日)	ff (g/人/日)	摂取量 (g/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3)。

- ・「[Ⅱ]」：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、かんしょ、やまいも、スイカ及びメロンは全データが定量限界未満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

マウス及び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 一般薬理試験概要

試験の種類	動物種	動物数 匹/群	投与量 (mg/kg 体重) (投与経路)	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 (Irwin 法)	ICR マウス	雄 3 雌 3	0、320、 800、2000、 5000 (経口投与)	2000	5000	興奮性症状と抑制 性症状を混在した 非特異的的症状。雌 1 例 8 日に死亡。
					320	800	
	一般状態	SD ラット	雄 5	0、800、 2000、5000 (経口投与)	5000	—	影響なし
					800	2000	軽度な減少、3 日 までに回復
					5000	—	影響なし
体重							
体温							

	ヘキバルピタ ール睡眠	ICR マウス	雄 8	0、3.28、 8.19、20.5、 51.2、128、 320、800、 2000、5000 (経口投与)	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	SD ラット	雄 5	0、800、 2000、5000 (経口投与)	5000	—	影響なし
自律神経系	瞳孔径						
消化器系	小腸炭末 輸送能	ICR マウス	雄 8	0、128、320、 800、2000、 5000 (経口投与)	320	800	炭末輸送能低下
骨格筋	握力	SD ラット	雄 5	0、800、 2000、5000 (経口投与)	5000	—	影響なし
血液	溶血 凝固		雄 5 雌 5	0、320、800、 2000、5000 (経口投与)			投与後1日に測定 した結果におい て、影響なし

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

8. 急性毒性試験

ピフェナゼート及び各種代謝物を用いた急性毒性試験が実施された。結果は表 10 及び 11 に示されている。(参照 33~38)

表 10 急性毒性試験結果概要 (原体)

投与 経路	動物種 (溶媒)	LD ₅₀ (mg/kg 体重)		症状
		雄	雌	
経口	SDラット 一群雌雄各5匹 (0.5% CMC-Na 水溶液)	>4950	>4950	症状及び死亡例なし

経口	ICR マウス 一群雌雄各 5 匹 (0.5% Tween80 水溶液)	>4950	>4950	雄：腹部膨満 雌：外陰部被毛湿潤 雄 1 匹で死亡例あり
経皮	SD ラット 一群雌雄各 5 匹 (0.9% 生理食塩水)	>5000	>5000	症状及び死亡例なし
吸入	SD ラット 一群雌雄各 5 匹	LC ₅₀ (mg/L)		暴露終了直後には湿性ラッセル音と分泌物（紅涙、赤色/褐色鼻汁）が認められたが、これらの症状は暴露後 1 週間以内にすべて消失した。 死亡例なし
		>4.4	>4.4	

表 1 1 急性毒性試験結果概要（代謝物）

検体	投与経路	動物種 (溶媒)	LD ₅₀ (mg/kg 体重)		症状
			雄	雌	
代謝物 B	経口	SD ラット (0.5% CMC-Na 水溶液)	>5000	>5000	全動物で立毛、円背位、よろめき/ふらつき歩行、四肢退色及び眼球暗調化、部分的眼瞼閉鎖及び腹部膨満が認められた。 死亡例なし
代謝物 D	経口	SD ラット (0.5% CMC-Na 水溶液)	>5000	>5000	症状及び死亡例なし

9. 眼・皮膚に対する刺激性及び皮膚感作性試験

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、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 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、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 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 及び 400 ppm : 平均検体摂取量は表 12 参照) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

表 1 2 90日間亜急性毒性試験 (ラット) 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毒性所見は表 13 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かった。

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 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 13 90日間亜急性毒性試験(ラット)で認められた所見

投与群	雄	雌
400 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制及び摂餌量減少 ・RBC 及び Hb 減少 ・脳(脳幹を含む)、脾、精巢(精巢上体を含む)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 ・赤脾髓色素沈着増加
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 ・赤脾髓色素沈着増加 ・副腎皮質束状帯空胞化 	<ul style="list-style-type: none"> ・小葉中心性肝細胞肥大 ・体重増加抑制及び摂餌量減少 ・RBC 及び Hb の減少 ・脳(脳幹を含む)、脾、腎及び肝比重量増加
40 ppm	毒性所見無し	毒性所見無し

(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 及び 150 ppm: 平均検体摂取量は表 14 参照)投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

表 14 90日間亜急性毒性試験(マウス)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、いずれの投与群の雄からも検体投与による影響は認められず、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 及び 1000 ppm: 平

均検体摂取量は表 15 参照) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

表 15 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	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毒性所見は表 16 に示されている。

本試験において、400 ppm 以上投与群の雌雄で肝比重量増加等が認められたので、無毒性量は雌雄とも 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 16 90日間亜急性毒性試験(イヌ)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 ・ 網状赤血球数増加 ・ 血漿中 Chol 及び ALP 増加 ・ 肝細胞小葉中心性またはび慢性肥大 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制
400 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ RBC、Hb 及び Ht 減少 ・ MCV、MCH 及び PLT 増加 ・ β1-Glob 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 Bil 増加 	<ul style="list-style-type: none"> ・ RBC、Hb 及び Ht 減少 ・ MCV、MCH 及び PLT 増加 ・ β1-Glob 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 ・ 肝細胞小葉中心性またはび慢性肥大
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 及び 1000 mg/kg 体重/日)投与による 21 日間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附し、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 Hb 減少、脾比重量増加が、雄で体重増加抑制、PLT 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 RBC 及び Ht の減少、血漿中 T.Bil 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及び1000 ppm：平均検体摂取量は表17参照）投与による1年間慢性毒性試験が実施された。

表17 1年間慢性毒性試験（イヌ）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 Hb 及び Ht 減少、血漿中 $\alpha 2$ -Glob 増加が、雌で WBC 及び Lym 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、RBC 減少、網状赤血球数、MCV、有核赤血球数及び PLT 増加、血漿中 T. Bil 増加、 $\beta 1$ -Glob 減少、尿の褐色化及び Bil 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、WBC、分葉 Neu 及び Lym の増加が、雌で MCH 増加、Hb 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及び200（雄）、160（雌） ppm：平均検体摂取量は表18参照）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18 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	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 T. Chol 減少が、160 ppm 投与群の雌で Hb 及び Ht 減少、脾色素沈着程度の増加が認められた。

本試験において、80 ppm 以上投与群の雄で脾色素沈着程度の増加が、雌で体重増加抑制、摂餌量減少、RBC の減少が認められたので、無毒性量は雌雄とも 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及び225（雄）、

175 (雌) ppm : 平均検体摂取量は表 19 参照) 投与による 18 ヶ月間発がん性試験が実施された。

表 19 18 ヶ月間発がん性試験 (マウス) の平均検体摂取量

投与群		10	100	225/175
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、RBC 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 WBC 及び Lym 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 (ラット)

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

表 20 2 世代繁殖試験① (ラット) の平均検体摂取量

投与群			20	80	200
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ため、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 (ラット)

SD ラット (一群雌雄各 30 匹) を用いた混餌 (原体 : 0、7.5、15 及び 20 ppm : 平

均検体摂取量は表 21 参照) 投与により、2 世代繁殖試験 (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 2 1 2 世代繁殖試験② (ラット) の平均検体摂取量

投与群			7.5	15	20
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、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ため、無毒性量は親動物の雌雄とも 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 及び 500 mg/kg 体重/日 溶媒: 0.5% CMC 溶液) 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ため、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 及び 200 mg/kg 体重/日 溶媒: 0.5% CMC 溶液) 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ため、無毒性量は、母動物及び胎児とも 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)

1.3. 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。

試験結果は表 22 に示されており全て陰性であった。ビフェナゼートに遺伝毒性はないものと考えられた。(参照 53~58)

表 22 遺伝毒性試験結果概要 (ビフェナゼート原体)

試験		対象	処理濃度・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> (WP2 <i>uvrA</i> 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 マウス骨髓細胞 (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

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 23)。

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 23)。(参照 59~62)

表 2 3 遺伝毒性試験結果概要 (代謝物)

被験物質	試験	対象	処理濃度・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 µg/mL (-S9)、 30~100 µg/mL (+S9)	陰性
	小核試験	ICR マウス骨髄細胞 (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 : 代謝活性化系存在下

1.4. 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 及び 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 RBC、Hb 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 及び 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 RBC 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 6、64）

III. 総合評価

参照に挙げた資料を用いて農薬「ビフェナゼート」の食品健康影響評価を実施した。

ラットを用いた動物体内運命試験において、単回投与後の血漿中濃度は低用量群で5~6時間後に、高用量群で18~24時間後に C_{max} に達した。組織内では T_{max} 付近で肝、血漿、全血、膀胱及び腎で比較的高濃度に認められた。主な排泄経路は糞中であつた。尿中からはビフェナゼートは認められず、主要代謝物としてU、V及びWが認められた。糞中からはビフェナゼート及び主要代謝物としてB、E、R、X及びY等が認められた。胆汁中からは主要代謝物としてE、F及びR等が認められた。主要代謝経路はアゾ化の後、O-脱メチル化、A環の水酸化及びヒドラジン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であると考えられる。

温州みかん、オレンジ、りんご及びなすを用いた植物体内運命試験が実施されており、主要成分としてビフェナゼート、代謝物B、C及びD等が認められた。

土壤中運命試験が実施されており、ビフェナゼートの土壤中推定半減期は好氣的条件下で0.5時間未満、嫌氣的条件下で77.9日であり、好氣的条件下での主要分解物はB及びD、嫌氣的条件下でE及びZであつた。

水中運命試験が実施されており、加水分解試験でのビフェナゼートの推定半減期はpH 7では25及び35°Cでそれぞれ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。水中光分解試験でのビフェナゼートの推定半減期は滅菌蒸留水及び河川水でそれぞれ春期における東京(北緯35°)の太陽光換算で21.8時間及び0.9時間であり、主要分解物としてBが認められた。

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を分析対象化合物とした土壌残留試験(容器内及び圃場)が実施されており、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日であつた。

果実、野菜、茶等を用いて、ビフェナゼート及び代謝物Bまた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ており、最高値は温州みかん(果皮)を除くと、最終散布44~45日目後に収穫したぶどう(果実)の1.41 mg/kgであつた。

ビフェナゼートの急性経口 LD_{50} はラットの雌雄で4950 mg/kg 体重超、マウスの雌雄で4950 mg/kg 体重超、経皮 LD_{50} はラットの雌雄で5000 mg/kg 体重超、吸入 LC_{50} はラットの雌雄で4.4 mg/L 超であつた。代謝物B及びDの急性経口 LD_{50} は、ともにマウスの雌雄で5000 mg/kg 体重超であつた。

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の結果、眼及び皮膚に対する刺激性は認められなかつた。また、モルモットを用いた皮膚感作性試験の結果、軽度の皮膚感作性が認められた。

亜急性毒性試験で得られた無毒性量は、ラットで2.7 mg/kg 体重/日、マウスで10.3 mg/kg 体重/日、イヌで0.9 mg/kg 体重/日であつた。

慢性毒性試験で得られた無毒性量はイヌで1.0 mg/kg 体重/日であつた。ラットの慢性毒性/発がん性併合試験、マウスの発がん性試験で得られた無毒性量は、それぞれラットで1.0 mg/kg 体重/日、マウスで1.5 mg/kg 体重/日であつた。発がん性は認められなかつた。

各種毒性試験で認められた貧血については、骨髄で過形成像が認められ骨髄機能に対する抑制作用がないこと、脾または肝で髄外造血像が認められたこと、マウスを用いたハインツ小体確認試験において、投与期間の経過に伴いハインツ小体の出現頻度が明瞭に増加したことから、ビフェナゼートにおける貧血機序は赤血球に対する酸化作用に起因する溶血性貧血に関連する変化であると考えられた。

2世代繁殖試験については、ラットで2つの試験が実施されており、一方の試験の一部で無毒性量が求められていないものの、両試験を総合的に考慮して無毒性量を親動物で1.1 mg/kg 体重/日、児動物で15.3 mg/kg 体重/日とした。繁殖能に対する影響は認められなかった。

発生毒性試験で得られた無毒性量は、ラットの母動物で10 mg/kg 体重/日、胎児で500 mg/kg 体重/日、ウサギの母動物及び胎児とも200 mg/kg 体重/日であった。いずれも催奇形性は認められなかった。

遺伝毒性試験として、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ており、試験結果は全て陰性であった。

代謝物Bの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ており、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。

各種毒性試験結果から、ビフェナゼート投与による影響は主に血液及び肝臓に認められた。

各種試験結果から、農産物中の暴露評価対象物質をビフェナゼート(親化合物)及びそのアゾ体(代謝物B)と設定した。

各試験における無毒性量及び無影響量は表24に示されている。イヌの90日間亜急性毒性試験における0.9 mg/kg 体重/日が最小値であるものの、より長期のイヌの1年間慢性毒性試験で1.0 mg/kg 体重/日であること及びラット2年間慢性毒性/発がん性併合試験でも同じ1.0 mg/kg 体重/日であることから、1.0 mg/kg 体重/日をADI設定根拠とした。