

安全性評価資料 アミカルバゾン

2016年7月

環境省水・大気環境局土壤環境課農薬環境管理室

目次

	頁
I. 評価対象農薬の概要	1
1. 物質概要	1
2. 作用機構等	1
3. 各種物性	2
II. 試験結果概要	2
1. 動物体内運命試験	2
(1) ラット ①	2
① 分布	2
② 代謝	3
③ 排泄	3
(2) ラット ②	4
① 吸収	4
② 分布	4
③ 代謝	6
④ 排泄	7
2. 環境中運命試験	9
3. 土壌残留性試験	11
4. 毒性試験	12
(1) 一般薬理試験	12
(2) 急性毒性試験	14
(3) 皮膚・眼に対する刺激性及び皮膚感作性試験	14
(4) 急性神経毒性試験	15
① 急性神経毒性試験（ラット）①	15
② 急性神経毒性試験 追試 1（ラット）②	16
③ 急性神経毒性試験 追試 2（ラット）③	17
(5) 亜急性毒性試験	17
① 90 日間亜急性毒性試験（ラット）	17
② 90 日間亜急性毒性試験（イヌ）	19
③ 21 日間亜急性経皮毒性試験（ラット）	20
④ 90 日間亜急性神経毒性試験（ラット）	21
(6) 慢性毒性試験及び発がん性試験	21
① 1 年間慢性毒性試験（イヌ）	21
② 1 年間反復経口投与毒性/発がん性併合試験（ラット）	22
③ 18 ヶ月間発がん性試験（マウス）	24
(7) 生殖発生毒性試験	24
① 2 世代繁殖毒性試験（ラット）	24
② 発生毒性試験（ラット）①	26
③ 発生毒性試験 追試（ラット）②	26
④ 発生毒性試験（ウサギ）①	27

⑤ 発生毒性試験 追試 (ウサギ) ②.....	28
(参考) 発達神経毒性試験 (ラット)	29
(8) 遺伝毒性試験.....	30
(9) その他の試験.....	30
① 甲状腺ホルモンに対する影響検討試験 (<i>in vitro</i>)	30
② 内分泌毒性機序検討試験 (ラット)	31
③ 免疫毒性試験 (ラット)	32
Ⅲ. 総合評価	33
<別紙 1> 代謝物略称.....	38
<別紙 2> 検査値等略称.....	40

<検討経緯>

2016 年 1 月 20 日 平成 27 年度非食用農作物専用農薬安全性評価検討会 (第 2 回)

2016 年 6 月 3 日 平成 28 年度非食用農作物専用農薬安全性評価検討会 (第 1 回)

<非食用農作物専用農薬安全性評価検討会名簿>

(2015 年 10 月 30 日から)

平塚 明 (座長)

浅野 哲 (座長代理)

石井 邦雄

上路 雅子

太田 敏博

佐藤 洋

長尾 哲二

平林 容子

鰐淵 英機

水質汚濁に係る農薬登録保留基準の設定に関する安全性評価資料

アミカルバジン

I. 評価対象農薬の概要

1. 物質概要

化学名 (IUPAC 名)	4-アミノ-N-tert-ブチル-4,5-ジヒドロ-3-イソプロピル-5-オキソ-1H-1,2,4-トリアゾール-1-カルボキサミド				
分子式	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ O ₂	分子量	241.3	CAS No.	129909-90-6
構造式					

2. 作用機構等

アミカルバジンは、トリアゾリノン系の除草剤であり、その作用機構は、葉緑体中の光化学系 II に存在する D1 タンパクに結合して、電子伝達を阻害することにより ATP や NADPH の産生を停止すると考えられている。

本邦では未登録である。

製剤は、粒剤及び水和剤が、適用農作物等は芝等として、登録申請されている。

3. 各種物性

アミカルバゾンの各種物性を表 1 に示した。

表 1 アミカルバゾンの物理化学的性状

外観・臭気	無色結晶、かすかな非特異的臭気	土壌吸着係数	$K_{F^{ads}OC} = 23-37$ (20°C、外国土壌) $K_{F^{ads}OC} = 10-20$ (25°C、日本土壌)
融点	137.5°C	オクタノール／水分配係数	$\log Pow = 1.14$ (20°C、超純水) $= 1.18$ (20°C、pH4) $= 1.23$ (20°C ; pH7、pH9)
沸点	高温で分解するため測定不能	生物濃縮性	—
蒸気圧	$1.3 \times 10^{-6} Pa$ (20°C) $3.0 \times 10^{-6} Pa$ (25°C)	密度	$1.1 g/cm^3$ (20°C)
加水分解性	30 日間安定 ($25 \pm 0.4^\circ C$; pH5、7) 半減期 65 日 ($25 \pm 0.4^\circ C$ 、pH9)	水溶解度	$4.6 \times 10^3 mg/L$ (20°C)
水中光分解性	12.2 日間安定 (滅菌緩衝液、pH7、 $25 \pm 1^\circ C$ 、 $678-697 W/m^2$ 、300-800 nm) 半減期 21.7 日 (春季太陽光換算 149 日) (自然水、pH8.4、 $25 \pm 1^\circ C$ 、 $671-694 W/m^2$ 、300-800 nm)		

II. 試験結果概要

アミカルバゾンの農薬登録申請資料を用いて試験結果の概要を整理した。代謝物及び検査値等の略称はそれぞれ別紙 1 及び別紙 2 に示した。

1. 動物体内運命試験

ラットを用いて、アミカルバゾンのトリアゾリノン環 3 位の炭素を ^{14}C で標識したもの（以下「標識体」という）を単回経口投与し、動物体内運命試験が実施された。

(1) ラット ①

① 分布

Fischer ラット（雄 4 匹）に標識体を $5 mg/kg$ 体重で単回経口投与し、投与後 72 時間の体内分布試験が実施された。主要臓器及び組織中の残留放射能濃度は表 2 のとおりである。

組織中残留放射能濃度はいずれの組織においても投与量の 1%未満であった。組織中残留放射能濃度は肝臓、次いで腎臓で高く、それぞれ平均 $0.073 \mu g Eq/g$ 及び $0.053 \mu g Eq/g$ であった。

表 2 主要臓器及び組織における残留放射能濃度 (単位: $\mu\text{g Eq/g}$)

投与量 (mg/kg 体重)	性別	投与 72 時間後
5	雄	肝臓 (0.073)、腎臓 (0.053)、血液 (0.018)、脾臓 (0.009)、脂肪 (0.004)

② 代謝

尿及び糞中排泄試験 [(1) ③] で採取した投与 24 時間までの尿及び糞を試料として代謝物の同定・定量試験が実施された。

投与後 24 時間における主要代謝物は表 3 のとおりである。

表 3 投与後 24 時間における尿及び糞中の主要代謝物 (%TAR)

設定投与量 (mg/kg 体重)	性別	試料	アミカル バゾン	代謝物
5	雄	尿	2	C (32)、D (11)、E (6)、I (3)、B (2)、G (1)、J (1)、H (< 1)、F (< 1)、その他* (< 7)
		糞	< 1	J (10)、D (4)、C (2)、E (< 1)、I (< 1)、B (< 1)、その他* (< 7)

* % TAR < 1 の 7 種の成分を含む

アミカルバゾンは 2 種の主要経路を経て代謝されると考えられる。一つの経路はグルクロン酸との直接抱合による N-グルクロン酸抱合体[J]の生成であり、この代謝物は主として糞中に排泄される。もう一方の経路は脱アミノ化及びその後の酸化による種々の水酸化代謝物を形成する経路であり、こちらは主に尿中に排泄される。

③ 排泄

Fischer ラット (雄 4 匹) に標識体を 5 mg/kg 体重で単回経口投与し、投与 72 時間まで経時的に尿及び糞を採取して排泄試験が実施された。各投与群における放射能の尿及び糞中累積排泄率は表 4 のとおりである。

アミカルバゾンの排泄は速やかであり、尿及び糞中の排泄率は投与後 24 時間で 87~95%TAR であり、投与後 72 時間で 88~95%TAR となった。主に尿中に排泄された。呼気への排泄はみられなかった。

表 4 尿及び糞中排泄率 (%TAR)

試料	72 時間後
尿*	65
糞	27
合計	92

* ; 尿トラップ洗浄液含む

(2) ラット ②

① 吸収

a. 血中濃度推移

SD ラット(一群雌雄各 3 匹)に標識体を 5 mg/kg 体重(低用量)又は 100 mg/kg 体重(高用量)の用量で単回経口投与後 72 時間の血中濃度推移が検討された。血漿中及び全血中動態パラメーターは表 5 のとおりである。

5 mg/kg 体重(低用量)投与群では投与後 1~2 時間で、100 mg/kg 体重(高用量)投与群では投与後 2~4 時間で最高濃度に達した後減少し、72 時間後には全血及び血漿中濃度はいずれも 0.023 µgEq/g 以下となった。AUC 値は両投与群とも雄よりも雌で高値を示した。

表 5 薬物動態学的パラメーター

用量 試料	5 mg/kg 体重				100 mg/kg 体重			
	全血		血漿		全血		血漿	
性別	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
T _{1/2} (hr)	4.60	14.90	19.21	15.76	3.03	5.97	2.88	5.65
T _{max} (hr)	2.0	1.0	1.0	1.0	2.0	4.0	4.0	4.0
C _{max} (µg Eq/g)	5.763	7.783	10.030	9.813	66.517	83.390	79.917	96.940
AUC ₀₋₇₂ (µg Eq×hr/g)	34.18	67.27	55.61	90.87	684.70	952.04	877.41	1219.41
AUC _{0-∞} (µg Eq×hr/g)	34.71	67.59	56.25	91.40	690.26	956.55	883.56	1223.84

b. 吸収率(推定)

胆汁中排泄試験 [(2) ④ 排泄 b.] における単回投与後 72 時間の胆汁、尿、及びカーカス¹中の残留放射能から推定された吸収率は、93.8~98.5%であった。

② 分布

SD ラット(一群雌雄各 3 匹。ただし、168 時間後は雌雄各 4 匹²)に標識体を 5 mg/kg 体重(低用量)又は 100 mg/kg 体重(高用量)で単回経口投与し、投与 168 時間後までの体内分布試験が実施された。各投与群の主要臓器及び組織中の残留放射能濃度は表 6 のとおりである。

残留放射能の分布に性別及び投与量の違いによる顕著な差は認められず、雌雄ともに T_{max} 付近で高い残留放射能濃度を示したのは、消化管、腎臓、肝臓、膀胱であった。投与 168 時間後におけるカーカスを含む組織及び臓器の残留放射能濃度の合計は、両投与群ともに<0.25% TAR であり、蓄積性は低いものと考えら

¹ 組織・臓器を取り除いた残渣のことをカーカスという(以下同じ。)

² 1 (2) ④の試験のラットを使用。5 mg/kg 体重(低用量)投与群の雄については、試験実施中に 1 例死亡のため、3 匹のみ。

れた。

表 6 主要臓器及び組織における残留放射能濃度 (単位 : $\mu\text{g Eq/g}$)

投与量 (mg/kg 体重)	性別	Tmax*1	投与 24 時間後	投与 168 時間後
5	雄	消化管 (32.834) 腎臓 (16.162) 膀胱 (10.284) 肝臓 (9.728) 血漿 (7.943) 血液 (5.766) 精巣 (5.400) 赤血球 (4.574)	消化管 (1.051) 肝臓 (0.291) 腎臓 (0.286) 前立腺 (0.077) 膀胱 (0.070) 皮膚*2 (0.068) 血漿 (0.067) 副腎 (0.057) 血液 (0.046) 腸間膜リンパ節 (0.034) 肺 (0.031) 心臓 (0.030) 赤血球 (0.030)	皮膚*2 (0.037) 腎臓 (0.026) 肝臓 (0.022) 肺 (0.004) 脾臓 (0.004) 心臓 (0.003) 膵臓 (0.003) 精巣 (0.003) 精巣上体 (0.002) 前立腺 (0.002) 腹部脂肪 (0.001)
	雌	消化管 (22.233) 腎臓 (12.858) 肝臓 (10.750) 下垂体 (9.107) 血漿 (8.999) 甲状腺 (7.159) 血液 (7.080) 副腎 (6.595) 膀胱 (5.720) 大脳 (5.612) 肺 (5.468) 赤血球 (5.329)	消化管 (0.478) 腎臓 (0.469) 肝臓 (0.225) 副腎 (0.095) 血漿 (0.088) 皮膚*2 (0.072) 血液 (0.071) 赤血球 (0.063)	腎臓 (0.081) 皮膚*2 (0.020) 赤血球 (0.018) 肝臓 (0.016) 副腎 (0.013) 脾臓 (0.006) 肺 (0.005) 心臓 (0.004) 眼 (0.004) 膵臓 (0.004) 腹部脂肪 (0.003)
100	雄	消化管 (883.705) 腎臓 (96.579) 肝臓 (96.367) 膀胱 (82.047) 血漿 (76.657) 血液 (60.544) 肺 (50.010) 前立腺 (46.344) 精巣 (46.189) 膵臓 (45.914) 心臓 (45.807) 赤血球 (44.295)	消化管 (115.915) 膀胱 (11.651) 腎臓 (9.330) 前立腺 (5.391) 肝臓 (4.469) 血漿 (2.937) 血液 (2.273) 精巣 (2.099) 皮膚*2 (1.568) 腸間膜リンパ節 (1.550) 副腎 (1.474) 赤血球 (1.384)	腎臓 (0.198) 脾臓 (0.042) 肺 (0.039) 心臓 (0.031) 膵臓 (0.019) 精巣 (0.018) 精巣上体 (0.014)

投与量 (mg/kg 体重)	性別	Tmax*1	投与 24 時間後	投与 168 時間後
	雌	消化管 (634.192) 腎臓 (163.773) 脾臓 (147.489) 肺 (140.372) 肝臓 (123.560) 副腎 (107.198) 血漿 (84.721) 脾臓 (80.245) 甲状腺 (79.285) 膀胱 (77.576) 子宮 (67.162) 血液 (66.122)	消化管 (226.169) 腎臓 (26.531) 肺 (11.552) 膀胱 (11.154) 肝臓 (8.564) 血漿 (7.139) 血液 (5.175) 子宮 (4.628) 副腎 (3.855) 卵巣 (3.808) 心臓 (3.789) 腸間膜リンパ節 (3.764) 赤血球 (3.537)	腎臓 (0.385) 眼 (0.136) 皮膚*2 (0.122) 脾臓 (0.114) 肺 (0.096) 心臓 (0.074) 子宮 (0.049) 脾臓 (0.042)

*1 ; 5 mg/kg 体重 : 投与 1 時間後、100 mg/kg 体重 : 投与 4 時間後

*2 ; 被毛を含む

③ 代謝

尿中及び糞中排泄試験 [(2) ④排泄 a] で採取した投与 168 時間までの尿及び糞、胆汁排泄試験 [(2) ④排泄 b] で採取した投与 72 時間までの胆汁を試料として、代謝物の同定・定量試験が実施された。その結果は表 7 のとおりである。

本試験において、8 つの代謝物が同定され 5%TAR を超えて検出された放射性成分は、尿中の C (21~39%TAR)、D (4~14%TAR)、B (3~11%TAR) 及び未変化体のアミカルバゾン (2~9%TAR)、糞及び胆汁中の J (それぞれ 6~46%TAR、28~48%TAR) であった。

表 7 尿、糞及び胆汁における主要代謝物 (%TAR)

設定投与量 (mg/kg 体重)	性別	試料	アミカル バゾン	代謝物
5	雄	尿*	2.01	C (33.69)、D (13.21)、U 及び E を含む複数成分 (7.39)、B (2.66)、I (2.39)
		糞	1.18	J (20.75)、C (0.57)、B (0.36)
		胆汁	NA	J (31.59)、K (3.38)、B (0.49)
	雌	尿*	5.08	C (38.74)、D (14.23)、U 及び E を含む複数成分 (8.35)、B (6.90)、I (2.88)
		糞	0.46	J (5.78)、C (0.58)、B (0.37)
		胆汁	0.32	J (28.14)、K (1.39)、B (0.85)
100	雄	尿*	3.03	C (20.73)、B (6.64)、U 及び E を含む複数成分 (4.41)、D (4.25)、I (0.68)
		糞	0.58	J (46.14)、C (0.70)、B (0.31)
		胆汁	0.32	J (48.02)、K (1.19)、B (0.49)

設定投与量 (mg/kg 体重)	性別	試料	アミカル バズン	代謝物
100	雌	尿*	9.05	C (21.81)、B (10.80)、U 及び E を含 む複数成分 (5.53)、D (4.15)、I (0.87)
		糞	0.47	J (32.36)、C (0.61)、B (0.29)
		胆汁	0.36	J (40.06)、K (1.21)、B (0.71)

* : 尿+ケージ洗浄液

アミカルバズンは 2 種の主要経路を経て代謝されることが考えられる。一つの経路はグルクロン酸との直接抱合による N-グルクロン酸抱合体[J]の生成であり、この代謝物は主として糞及び胆汁中に排泄される。もう一方の経路は酸化及び/又は脱アミノ化により、種々の水酸化化合物を形成する経路であり、尿及び糞中に排泄される。

④ 排泄

a. 尿中及び糞中排泄

SD ラット (一群雌雄各 4 匹³) に、標識体を 5 mg/kg 体重 (低用量) 又は 100 mg/kg 体重 (高用量) で単回強制経口投与し、投与 168 時間後まで経時的に尿及び糞を採取して排泄試験が実施された。各投与群における尿及び糞中累積排泄率は表 8 のとおりである。

投与 24 時間後までに尿及び糞中に 78.0% TAR 以上が排泄され、投与 168 時間後までの放射能の総排泄量は 96.3~99.6% TAR であった。100 mg/kg 体重投与群の雄の主要排泄経路は糞中排泄 (51.8% TAR) であったが、5mg/kg 体重 (低用量) 投与群の雌雄及び 100 mg/kg 体重 (高用量) 投与群の雌の主要排泄経路は尿中排泄 (59.3~87.7% TAR) であった。

³ 低用量群の雌 1 匹については、物質収支が 90% に満たなかったため、データを除外した。

表 8 尿及び糞中排泄率（%TAR）

採取時間 (hr)	投与量 (mg/kg 体重)	5		100		
		性別	雄	雌*2	雄	雌
0～8	尿*1		56.45	55.78	15.33	18.86
	糞		-	-	-	-
	合計		56.45	55.78	15.33	18.86
0～24	尿*1		68.93	85.49	40.92	49.87
	糞		24.37	10.09	44.22	28.20
	合計		93.30	95.58	85.14	78.07
0～48	尿*1		69.89	86.45	44.12	58.54
	糞		27.28	10.56	51.66	36.94
	合計		97.17	97.01	95.78	95.48
0～72	尿*1		70.38	86.82	44.32	58.90
	糞		27.35	10.62	51.76	37.16
	合計		97.73	97.44	96.08	96.05
0～96	尿*1		70.54	87.08	44.40	59.08
	糞		27.41	10.64	51.77	37.20
	合計		97.95	97.72	96.17	96.28
0～120	尿*1		70.58	87.35	44.47	59.14
	糞		27.43	10.66	51.77	37.22
	合計		98.01	98.01	96.23	96.36
0～144	尿*1		70.59	87.50	44.48	59.18
	糞		27.44	11.90	51.77	37.23
	合計		98.03	99.40	96.25	96.41
0～168	尿*1		70.63	87.68	44.50	59.28
	糞		27.45	11.90	51.77	37.23
総排泄量			98.08	99.58	96.27	96.52
消化管			0.01	NA	NA	0.03
組織			0.04	0.03	0.02	0.03
カーカス			0.21	0.24	0.15	0.19
総計			98.33	99.77	96.39	96.68

*1 ; 尿+ケージ洗浄液

*2 ; 5 mg/kg 体重投与群の雌 1 例は総回収率が低かったため、データから除外。表中の値は 3 例の平均値。

NA : 適用外

b. 胆汁排泄

胆管カニューレを装着した SD ラット (5 mg/kg 体重投与群の雌雄及び 100 mg/kg 体重投与群の雄は一群 4 匹、100 mg/kg 体重投与群の雌は 9 匹) に標識体を 5 mg/kg 体重 (低用量) 又は 100 mg/kg 体重 (高用量) の用量で単回強制経口投与した胆汁排泄試験が実施された。尿、糞、胆汁中排泄率は表 9 のとおりである。

投与 72 時間後までの総排泄量は 95.2~100.2 %TAR であった。100 mg/kg 体重投与群の雌雄では胆汁排泄がやや多く、雄で 52.0%TAR、雌で 44.2%TAR、次いで尿中排泄が多く雄で 41.6%TAR、雌で 52.5%TAR であった。5 mg/kg/day 投与群の雌雄では尿中排泄が主であり、雄で 59.6%TAR、雌で 63.2%TAR、次いで胆汁排泄が多く雄で 38.5%TAR、雌で 29.2%TAR であった。投与 72 時間後までの放射能の吸収率は 5 mg/kg 体重投与群では、94.1~98.5%TAR、100 mg/kg 体重投与群では 93.8~97.5%TAR であった。

表 9 尿、糞、胆汁中排泄率 (%TAR)

投与量	5 mg/kg 体重		100 mg/kg 体重	
	雄	雌	雄	雌
動物数*1	3	4	3	3
胆汁	38.55	29.19	51.98	44.20
尿*2	59.63	63.23	41.60	52.48
糞	1.99	2.73	2.35	2.75
総排泄量	100.17	95.15	95.94	99.43

*1 : 動物死亡のため高用量は雌雄各 3 例、低用量は雄 3 例、雌 4 例の個別別吸収率の平均値

*2 : 尿+ケージ洗浄液

*3 : 内容物を含む

2. 環境中運命試験

アミカルバズンについて、各種の環境中動態試験が実施された。本試験の結果の概要は表 10 のとおりである。

アミカルバズンは好氣的土壌中で中程度の速度で分解した。埴壤土、砂壤土、壤質砂土及び壤土、いずれの土壌においても代謝物 B 及び P が検出され、代謝物 B が主要代謝物であった。アミカルバズンは脱アミノ化により代謝物 B を生成し、その後、土壌微生物活性による同じ部位でのメチル化により代謝物 P を生成すると考えられた。リーチングはわずかであった。

水中では、酸性~中性の条件下では安定であるが、塩基性条件下では、緩やかに分解した。

表 10 アミカルバゾンの環境中動態試験概要

試験項目	試験条件			DT ₅₀	主な代謝分解物と最大検出量 ¹⁾
好氣的 土壌中 動態試験	トリアゾリ ノン環標識 体	埴壤土 (米国)	非滅菌 20 ± 1°C 暗条件 222 日間 (壤土のみ 221 日間)	70.0 日	B : 42.1%TAR (222 日 後) D-2 : 4.1%TAR (222 日後) P : 3.0%TAR (222 日後)
		砂壤土 (米国)		58.2 日	B : 44.2%TAR (222 日 後) P : 3.7%TAR (222 日後) D-2 : 3.5%TAR (222 日 後)
		壤質砂土 (米 国)		72.2 日	B : 59.4%TAR (92 日 後) D-1 : 24.0%TAR (125 日後) P : 3.7%TAR (61 日後)
		壤土 (米国)		59.2 日	B : 39.7%TAR (96 日 後) P : 8.6%TAR (221 日後) D-2 : 5.4%TAR (221 日後)
嫌氣的 土壌中 動態試験	トリアゾリ ノン環標識 体	シルト質壤土 (米国)	非滅菌 21 ± 1°C 暗条件 367 日間	1051 日	未同定 : 1.5%TAR (367 日後)
土壌 リーチング 試験	非標識体 70%アミカ ルバゾン顆 粒水和剤	トウモロコシ 圃場 シルト質埴壤 土 (米国)	降水量 : 57.9 インチ 540 日間	30.2 日	B : 0.087 µg/g (59 日後、 0-6 インチ層) P : 0.0084 µg/g (449 日 後、0-6 インチ層)
加水分解 動態試験	トリアゾリ ノン環標識 体	25 ± 0.4°C 暗条件 30 日間	pH 5 (酢酸ナト リウム/酢酸、 水酸化ナトリ ウム緩衝液)	30 日間 安定	—
			pH 7 (酢酸ナ	30 日間	—

試験項目	試験条件		DT ₅₀	主な代謝分解物と最大検出量 ¹⁾	
			トリウム/酢酸緩衝液)	安定	
			pH 9 (ホウ酸ナトリウム/酢酸緩衝液)	65 日	K : 28.5% (30 日後)
水中光分解試験	トリアゾリノン環標識体	光強度 : 678 ~ 697 W/m ² 測定波長 : 300~800 nm 温度 : 25±1°C 12.2 日間照射	滅菌緩衝液 (pH7)	—	B : 2.4%TAR (10.0 日後)
		光強度 : 671 ~ 694 W/m ² 測定波長 : 300~800 nm 温度 : 25±1°C 11.9 日間照射	自然水 (pH8.4)	21.7 日 (東京春季太陽光換算 : 149 日)	B : 15.9%TAR (11.9 日後) 代謝物 K : 8.8%TAR (10.0 日後)

¹⁾ 炭酸ガス (CO₂) を除く。

3. 土壌残留性試験

アミカルバゾンについて、火山灰埴壤土及び洪積埴壤土を用いて土壌残留試験が実施された。推定半減期は表 11 のとおりである。

表 11 アミカルバゾンの土壌残留性試験概要

試験形態	土壌条件と分析対象物		推定半減期
	土壌	分析対象	
圃場試験 水和剤 (70%) 100 g/200 L/10 a 1 回散布	火山灰/埴壤土	アミカルバゾン+脱アミノ体 (B) + N-メチル脱アミノ体 (P)	50.3 日
		アミカルバゾン	29.3 日
	洪積/埴壤土	アミカルバゾン+脱アミノ体 (B) + N-メチル脱アミノ体 (P)	60.8 日
		アミカルバゾン	41.7 日
圃場試験	火山灰/埴壤土	アミカルバゾン+脱アミノ体 (B) + N-メチル脱アミノ体 (P)	48.2 日

粒剤 (1%) 20kg/10 a		アミカルバゾン	32.1 日
	沖積/砂壤土	アミカルバゾン+脱アミノ体 (B) + N-メチル脱アミノ体 (P)	19.4 日
		アミカルバゾン	15.1 日

4. 毒性試験

(1) 一般薬理試験

アミカルバゾン原体について、ラット及びマウスを用いた一般薬理試験が実施された。

本試験の結果の概要は表 12 のとおりである。

表 12 アミカルバゾンの一般薬理試験概要

試験の種類		動物種	投与量 (mg/kg 体重) (投与経路)	最大無作用量 (最小作用量) (mg/kg 体重)	観察された作用
一般 状態	Irwin 変法	WU ラット (一群雄 6 匹)	0、1、20、100 (強制経口)	1 (20)	20 mg/kg 体重以上：眼瞼 下垂、流涎及び鎮静 100 mg/kg 体重：立毛、挙 尾及び腹臥位
	Irwin 変法	WU ラット (一群雄 6 匹)	0、2.5、5、10 (強制経口)	5 (10)	10 mg/kg 体重：眼瞼下垂、 流涎及び鎮静
	Irwin 変法	SD ラット (一群雌 5 匹)	0、80、400、 2,000 (強制経口)	80 (400)	400 mg/kg 体重以上：眼瞼 下垂及び流涎 2,000 mg/kg 体重：筋攣縮、 2 例死亡
中枢 神経系	ホット プレート法 (鎮痛)	NMRI マウス (一群雄 10 匹)	0、1、20、100 (強制経口)	20 (100)	100 mg/kg 体重：反応潜時 の延長、鎮静及び眼瞼下垂
	懸垂試験			20 (100)	100 mg/kg 体重：懸垂力低 下、鎮静及び眼瞼下垂
	バランス ロッド			20 (100)	100 mg/kg 体重：協調運動 障害、鎮静及び眼瞼下垂

試験の種類	動物種	投与量 (mg/kg 体重) (投与経路)	最大無作用量 (最小作用量) (mg/kg 体重)	観察された作用	
(続き) 中枢 神経系	電撃刺激 試験 (痙攣誘発作用)		20 (100)	抗痙攣作用あり (1 及び 20 mg/kg 体重で 各 1 例、100 mg/kg 体重で 4 例電撃刺激後に死亡) 100 mg/kg 体重：鎮静及び 眼瞼下垂	
	ペンチレンテ トラゾール試 験 (抗痙攣作用/ 痙攣誘発)		20 (100)	100 mg/kg 体重：抗痙攣作 用、鎮静及び眼瞼下垂	
	ヘキソバルビ タール試験 (睡眠作用)		20 (100)	睡眠時間に対する影響な し 100 mg/kg 体重：鎮静及び 眼瞼下垂	
	カタレプシー	WU ラット (一群雄 5 匹)	0、1、20、100 (強制経口)	>100	カタレプシーなし 20 mg/kg 体重以上：流涎、 鎮静及び眼瞼下垂 100 mg/kg 体重：挙尾及び 立毛
	体温	WU ラット (一群雄 6 匹)		20 (100)	100 mg/kg 体重：体温低下
	移動距離 (オープンフ ィールド)	WU ラット (一群雄 10 匹)		1 (20)	20 mg/kg 体重以上：移動 距離の低値
	休息时间 (オープンフ ィールド)			1 (20)	20 mg/kg 体重以上：休息 時間の高値
	立ち上がり回 数 (オープンフ ィールド)			1 (20)	20 mg/kg 体重以上：立ち 上がり回数の減少傾向又 は減少
呼吸器 系	SD ラット	0、80、400、 2,000		—	投与による影響なし

試験の種類		動物種	投与量 (mg/kg 体重) (投与経路)	最大無作用量 (最小作用量) (mg/kg 体重)	観察された作用
泌尿器系	尿量、 尿中電解質、 尿浸透圧	(一群雌 5 匹)	(強制経口)	80 (400)	400 mg/kg 体重以上：尿量 低下傾向、浸透圧の高値又 は高値傾向 (2,000 mg/kg 体重で 3/5 例死亡)

(2) 急性毒性試験

アミカルバゾン原体についてラットを用いた急性毒性試験(経口、経皮及び吸入)、製剤(70%水和剤)についてラットを用いた急性毒性試験(経口及び経皮)が実施された。

本試験の結果の概要は表 13 のとおりである。

表 13 アミカルバゾンの急性毒性試験概要

検体 種別	投与経路/観察期間/投与量 (mg/kg 体重)	動物種	LD ₅₀ (mg/kg 体重) 又は LC ₅₀ (mg/m ³)	
			雄	雌
原体	経口/14 日間/雄：98.4、 252、816、978、1,334、 1,710、3,388、5,210 (実 測量)；雌：98.4、252、 816、1,218、1,710、3,388、 5,210 (実測量)	SD ラット (一群雌雄各 5 匹)	1,300	1,015
	経皮/14 日間/2,000	SD ラット (一群雌雄各 6 匹)	>2,000	>2,000
	吸入(ダスト)/14 日間/ 2,242 mg/m ³ (実測濃度)	SD ラット (一群雌雄各 6 匹)	>2,242	>2,242
製剤 (70% 水和剤)	経口/14 日間/2,000	SD ラット (一群雌各 3 匹)	—	>2,000
	経皮/14 日間/2,000	SD ラット (一群雌雄各 5 匹)	>2,000	>2,000

(3) 皮膚・眼に対する刺激性及び皮膚感作性試験

アミカルバゾン原体及び製剤(70%水和剤)についてウサギを用いた眼刺激性試験、皮膚刺激性試験及びモルモットを用いた皮膚感作性試験が実施された。

本試験の結果の概要は表 14 のとおりである。

皮膚刺激性については、原体、製剤ともに認められなかった。

眼刺激性については、原体で極めて軽度の刺激性、製剤では中等度の刺激性が認められた。製剤については洗眼の効果が認められた。

皮膚感作性については、原体及び製剤ともに認められなかった。

表 14 アミカルバゾンの皮膚・眼に対する刺激性及び皮膚感作性試験概要

検体種別	試験の種類/観察期間	動物種	投与方法/投与量	試験の結果
原体	皮膚刺激性 /72 時間	NZW ウサギ (一群雄 6 匹)	貼付/0.5 g	刺激性なし
	眼刺激性 /72 時間	NZW ウサギ (一群雄 6 匹)	点眼/0.1 mL	極めて軽度の刺激性あり
	皮膚感作性 /48 時間	Hartley モルモット (検体群：一群雌 各 10 匹、対照群： 一群雌各 5 匹)	Maximization 法/ 感作： 皮内投与 - 1%オリーブ油溶 液、0.1 mL 経皮閉塞貼付 - 40%ワセリ ン溶液、0.2 mL、48 時間 惹起： 経皮閉塞貼付 - 40%ワセリン 溶液、0.1 mL、24 時間	感作性なし
皮膚感作性 /31 日間	Hartley モルモット (検体群：一群雌 雄各 10 匹、対照 群：一群雌雄各 5 匹)	Buehler 局所閉鎖パッチ法/ 感作： 経皮閉塞貼付 - 0.4 g、6 時間 × 3 回 惹起： 経皮閉塞貼付 - 0.4 g、6 時間	感作性なし	
製剤 (70% 水和剤)	皮膚刺激性 /72 時間	日本白色種ウサギ (一群雌 3 匹)	Draize 法 貼付/0.5 g	刺激性なし
	眼刺激性 /14 日間	日本白色種ウサギ (一群雌 3 匹)	Draize 法 点眼/0.1 g	中等度の刺激性 (洗眼の効果あり)
	皮膚感作性 /30 日間	Hartley モルモット (検体群：雌 20 匹、 対照群：雌 10 匹)	Buehler 法/ 感作：経皮貼付、50%、6 時 間× 3 回 惹起：経皮貼付、50%、6 時 間	感作性なし

(4) 急性神経毒性試験

① 急性神経毒性試験 (ラット) ①

Fischer ラット (一群雌雄各 12 匹) を用いた単回強制経口 (原体; 雄: 0、20、150 及び 600 mg/kg 体重、雌: 0、20、100 及び 400 mg/kg 体重) 投与による急性神経毒性試験が実施された。

各投与群において認められた毒性所見は表 15 のとおりである。

高用量 (雄: 600 mg/kg 体重、雌: 400 mg/kg 体重) では、投与後も生存し最も顕著な毒性症状を示した動物において神経病理学的において視床正中領域における軽度神経細胞壊死が雌雄各 1 例に認められた。したがって、本物質は急性神経毒性を有すると判断された。

一過性の所見が雌雄とも 20 mg/kg 体重以上の投与群でみられたことから、無毒性量は雌雄共 20 mg/kg 体重未満と考えられた。

表 15 急性神経毒性試験 (ラット) ①で認められた毒性所見

投与量	雄	雌
600 mg/kg 体重	<ul style="list-style-type: none"> ・死亡(5例*) ・鼻汁、流涎、前肢の汚れ、反応性亢進、反復咀嚼動作、振戦、前肢の反復動作、活動性低下、取り出す際の抵抗(発声を伴う)、筋緊張、眼瞼閉鎖、歩行失調、接近反応失調、正向反射失調、紅涙による汚れ ・視床正中領域における軽度神経細胞壊死(1例) 	
400 mg/kg 体重 (続き) 400 mg/kg 体重		<ul style="list-style-type: none"> ・死亡(1例) ・鼻汁、流涎、前肢の汚れ、尾の外傷(自咬)、前肢の反復動作、歩行失調、活動性低下、眼瞼閉鎖、筋緊張、流涙、覚醒状態低下、排尿回数増加、接近反応失調、紅涙による汚れ ・視床正中領域における軽度神経細胞壊死(1例)
150 mg/kg 体重 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・口部汚れ ・体温低下、自発運動量低下、移動運動量低下 	
100 mg/kg 体重 以上		<ul style="list-style-type: none"> ・鼻部(赤色含む)及び口部の汚れ、尿による汚れ ・正向反射失調 ・体温低下、自発運動量低下、移動運動量低下
20 mg/kg 体重 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・鼻部の汚れ(赤色)、眼瞼下垂 	<ul style="list-style-type: none"> ・眼瞼下垂

*うち 1 例に腹側頸部で浮腫が見られたが、投与との因果関係は不明。

② 急性神経毒性試験 追試 1 (ラット) ②

ラットを用いた急性神経毒性試験[4 (4) ①]において、低用量の 20 mg/kg 体重において雌雄とも軽微な毒性影響が認められたため、急性神経毒性に関する無毒性量を探索する目的で、Fischer ラット (一群雌雄各 10 匹) を用いた単回強制経口 (原体 : 0、2、5 及び 10 mg/kg 体重) 投与による急性神経毒性試験が実施された。

雌雄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。

10 mg/kg 体重以下の用量で毒性影響がみられなかったことから無毒性量は雌雄とも 10 mg/kg 体重と考えられた。

③ 急性神経毒性試験 追試 2 (ラット) ③

ラットを用いた急性神経毒性試験[4 (4) ①]において、試験終了時まで生存した高用量群の雌雄において、視床結合核領域に軽度の神経細胞壊死が認められたことから、脳波の変化、最大神経障害性影響発現時点及び他の時点での他の脳領域における変化を探索する目的で、Fischer ラット (対照群：雌 6 匹/セット、検体投与群：一群雌 8 匹/セット、7 セット/群)を用いた単回強制経口 (原体：0 及び 400 mg/kg 体重) 投与による急性神経毒性試験が実施された。

認められた毒性所見は表 16 のとおりである。

ラットを用いた神経毒性試験 [4 (4) ①] と同様の所見が見られ、致死用量を投与したあとに生存した動物においてのみ、限定された部位 (視床結合核領域) に病理組織学的変化が確認された。

表 16 急性神経毒性試験 追試 2 (ラット) ③で認められた毒性所見

投与量	雌
400 mg/kg 体重	<ul style="list-style-type: none"> ・死亡 (3 例)* ・眼瞼の部分的閉鎖、活動性の低下、流涙、流涎、鼻汁 (赤色又は透明)、座位での前肢の反復動作、取扱者に対する攻撃性、反復咀嚼、鼻部の汚れ、運動失調、痙攣、紅涙による汚れ ・定量的脳波検査：投与後 3 時間～1 日後の間に全ての刺激条件下でのパワーの変化 (増加又は低下) ・視床結合核領域視床正中の神経細胞壊死 (1 例)**

* : 56 例中 3 例,

** : 36 例中 1 例 (生存動物の中で最も顕著な毒性症状を呈した動物、投与 1 日後に屠殺)

(5) 亜急性毒性試験

アミカルバズン原体について、ラット及びイヌを用いた 90 日間亜急性毒性試験、ラットを用いた 21 日間亜急性経皮毒性試験及びラットを用いた 90 日間亜急性神経毒性試験が実施された。

① 90 日間亜急性毒性試験 (ラット)

Fischer ラット (一群雌雄各 15 匹) を用いた混餌 (原体：0、100、250、500、1,000、2,500、及び 5,000 ppm ; 平均検体摂取量は表 17 参照) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。[なお、対照群及び 5,000 ppm 投与群については、別に一群雌雄 15 匹の回復群を設定し、投与終了後、4 週間の回復期間が設けられた。]

表 17 90 日間亜急性毒性試験 (ラット) の平均検体摂取量

投与量 (ppm)		100	250	500	1,000	2,500	5,000
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	6.9	17.8	32.9	67.2	181.8	353.8
	雌	7.9	20.5	38.0	77.7	200.6	396.8

各投与群において認められた毒性所見は表 18 のとおりである。

(毒性所見以外の所見)

雌の全ての投与群において死亡例 (100ppm ; 1 例、250ppm ; 2 例、500ppm ; 3 例、1,000ppm ; 1 例、2,500 ppm ; 1 例、5,000 ppm ; 2 例) が見られたが、対照群でも同程度死亡例 (1 例) が確認されたため、毒性所見とは取らなかった。

血液生化学的検査において、250 ppm 以上の雄及び 1,000 ppm 以上の雌でみられた CK 及び LDH の減少、500 ppm 以上の雄及び 1,000 ppm 以上の雌でみられた ALP の減少、2,500 ppm の雌雄でみられた AST 及び ALT の減少は毒性的意義が乏しいものと考えられた。

臓器重量について、副腎の絶対重量低下 (雌雄ともに 5,000 ppm) 及び相対重量の増加 (雄 : 5,000 ppm)、脳の相対重量増加 (雄 : 2,500 ppm、雌 : 1,000 ppm)、心臓の絶対重量の増加 (雌雄ともに 5,000 ppm)、腎臓の絶対重量低下 (雄 : 2,500 ppm、雌 : 1,000 ppm) 及び相対重量増加 (雄 : 5,000 ppm)、肺の絶対重量低下 (雄 : 5,000 ppm、雌 : 1,000 ppm) 及び相対重量増加 (雄 : 2,500 ppm)、脾臓の絶対重量低下 (雄 : 2,500 ppm、雌 : 1,000 ppm)、精巣の相対重量増加 (雄 : 2,500 ppm)、卵巣の絶対重量・相対重量低下 (雌 : 2,500 ppm)、甲状腺の絶対重量低下 (雌雄ともに 5,000 ppm) が認められたが、体重増加抑制にともなう二次的な影響と考えられた。

(まとめ)

本試験において、250 ppm 以上の雌雄で Chol の増加、雄で LDH、CK の上昇が見られたことから、無毒性量は 100 ppm (雄 : 6.9 mg/kg 体重/日、雌 : 7.9 mg/kg 体重/日) であると考えられた。

表 18 90 日間亜急性毒性試験 (ラット) で認められた毒性所見

投与量	雄	雌
5,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・TP の増加 ・尿蛋白の増加 ・肝臓の絶対及び相対重量増加 ・副腎皮質上皮細胞のび漫性細胞質空胞化 ・脾臓の細胞質空胞化 	<ul style="list-style-type: none"> ・RBC の減少 ・TP、Alb の増加 ・脾臓の細胞質空胞化 ・腎臓の腎盂上皮過形成
2,500 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・MCV、MCH の減少、Plt、Ret の増加 ・TG、Glob の増加 ・尿中ケトン体の減少 ・尿白血球の増加 ・甲状腺の濾胞上皮細胞過形成 	<ul style="list-style-type: none"> ・MCHC の減少、Plt、Ret の増加 ・TG、Glob の増加 ・T3 の増加 ・尿白血球の増加 ・肝臓の絶対及び相対重量増加 ・甲状腺の濾胞上皮細胞過形成 ・脾臓の色素 (ヘモジデリン) 沈着

		<ul style="list-style-type: none"> ・骨髄密度低下、大腿骨の成長版の萎縮又は鈍化/不活性化(栄養状態不良による二次的変化) ・巨大肝細胞(巨大細胞及び巨大核)
1,000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・RBC、Hb、Ht の減少 ・T4、T3 の増加 ・巨大肝細胞 (巨大細胞及び巨大核) ・脾臓の色素(ヘモジデリン)沈着 	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・Hb、Ht、MCV、MCH の減少
250 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・Chol の増加 	<ul style="list-style-type: none"> ・Chol の増加
100 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

※100ppm 及び 250 ppm 投与群については、病理組織学的検査が行われていない。

② 90 日間亜急性毒性試験 (イヌ)

ビーグル犬 (一群雌雄各 4 匹) を用いた強制経口 (原体 : 0、200、800 及び 2,000 ppm ; 平均検体摂取量は表 20 参照) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

表 20 90 日間亜急性毒性試験 (イヌ) の平均検体摂取量

投与量 (ppm)		200	800	2,000
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	6.74	27.03	57.40
	雌	6.28	24.99	62.11

各投与群において認められた毒性所見は表 21 のとおりである。

(毒性所見以外の所見)

血液生化学的検査において、BUN の増加が雄の 800 ppm 以上、雌の 200 ppm 以上でみられたものの、関連する病理組織学的所見がみられないことから検体投与による影響とは考えられなかった。

(まとめ)

本試験において、800 ppm 以上の雌雄で影響がみられ、貧血、主に肝臓、胆嚢、甲状腺の構造的及び/又は機能的変化がみられた。無毒性量は雌雄共 200 ppm (雄で 6.74 mg/kg 体重/日、雌で 6.28 mg/kg 体重/日) であると考えられた。

表 21 90 日間反復投与毒性試験 (イヌ) で認められた毒性所見

投与量	雄	雌
2,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・摂餌量減少傾向 ・RBC、Hb、Ht の減少 ・APTT の短縮 ・Glu、TP 総蛋白減少 	<ul style="list-style-type: none"> ・体重減少傾向 ・摂餌量減少傾向 ・Plt 増加 ・RBC の減少

投与量	雄	雌
2,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・無機リンの増加 ・T3 減少 ・TSH の増加 ・胆汁酸の増加 ・心電図の PR 間隔の延長 ・甲状腺の絶対及び相対重量増加傾向 ・胆嚢の粘膜過形成 ・腎臓の尿細管上皮内色素沈着 ・肝臓の胆管上皮内胆汁色素沈着、単細胞壊死 	<ul style="list-style-type: none"> ・Ret の増加 ・TG、ALP の増加 ・TP、Alb、Ca の減少 ・T3 減少、T4 の増加 ・TSH の増加 ・胆汁酸の増加 ・肝臓の絶対及び相対重量増加傾向 ・甲状腺の絶対及び相対重量増加傾向 ・胆嚢の粘膜過形成、慢性炎症 ・肝臓の肝細胞肥大、単細胞壊死 ・甲状腺のコロイド及び/又は濾胞上皮細胞空胞化
800 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・Plt の増加 ・TG の増加 ・Alb の減少 ・T4 の増加 ・肝臓の絶対及び相対重量増加 	<ul style="list-style-type: none"> ・白血球百分率の好酸球減少 ・Glu の減少 ・胸腺の絶対及び相対重量減少傾向
200 ppm	・毒性所見なし	・毒性所見なし

③ 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、200、500 及び 1,000 mg/kg 体重/日）投与による 21 日間亜急性経皮毒性試験が実施された。投与は検体を水で湿らせ、毛刈りした背部皮膚に、1 日 6 時間、雄で 22 日間に 18 回、雌で 21 日間に 17 回閉塞適用した。

投与群に毒性所見は認められなかった。

（毒性所見以外の所見）

雄の 1,000 mg/kg 体重/日群の雄においてヘモグロビンの有意な減少が認められたが、赤血球数等のパラメーターに貧血を示す変化が無く、雌ではヘモグロビン減少が見られないことから、検体投与によるものではないと考えられた。また、1,000 mg/kg 体重/日投与群の雌雄において、白血球数の有意な低下が見られたが、背景値の範囲内であることから、毒性所見とは取らなかった。

また、1,000 mg/kg 体重/日投与群の雌で見られた好塩基球及び大型非染色球の減少及び、500 mg/kg 体重/日以上投与群の雌で見られた単球の減少について、申請者は両投与群ともに変動率が小さく、雄では有意差が認められなかったことから、臨床的に重要な変化とは考えられず、毒性所見とはとらなかった。

500 mg/kg 体重/日以上群の雄及び 1,000 mg/kg 体重/日群の雌において総コレステロール値の有意な増加が認められたが、他のパラメーターや組織における変化が認められないこと等の理由により、検体投与に関連した影響とはしなかった。

(まとめ)

本試験において、毒性所見が認められなかったことから、無毒性量は雌雄共 1,000 mg/kg 体重/日であると考えられた。

④ 90 日間亜急性神経毒性試験 (ラット)

Fischer ラット (一群雌雄各 12 匹) を用いた混餌 (原体 : 0、100、500 及び 1,000 ppm ; 平均検体摂取量は表 22 参照) 投与による 90 日間亜急性神経毒性試験が実施された。

表 22 90 日間亜急性投与神経毒性試験 (ラット) の平均検体摂取量

投与量 (ppm)		100	500	1,000
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	6.7	33.4	66.5
	雌	7.8	38.2	75.8

各投与群において認められた毒性所見は表 23 のとおりである。

本試験において、500 ppm 以上の雌で体重減少、摂餌量減少が認められ、雄においてはいずれの投与群においても、毒性及び神経毒性学的所見は認められなかったことから、無毒性量は雄で 1,000 ppm (66.5 mg/kg 体重/日)、雌で 100 ppm (7.8 mg/kg 体重/日) であると考えられた。

表 23 90 日間亜急性神経毒性試験 (ラット) で認められた毒性所見

投与量	雄	雌
1,000 ppm	毒性所見なし	・体重減少 ・摂餌量減少
500 ppm 以上		・死亡 (1 例) (500 ppm のみ) ・体重減少 ・摂餌量減少
100 ppm		・毒性所見なし

(6) 慢性毒性試験及び発がん性試験

アミカルバズン原体について、イヌを用いた 1 年間反復投与毒性試験、ラットを用いた 2 年間反復投与毒性/発がん性併合試験、マウスを用いた 18 ヶ月間反復投与毒性試験が実施された。

① 1 年間慢性毒性試験 (イヌ)

ビーグル犬 (一群雌雄各 4 匹) を用いた混餌 (原体 : 0、75、100、300 及び 1,200 ppm ; 平均検体摂取量は表 24 参照) 投与による 1 年間慢性毒性試験が実施された。

表 24 1 年間慢性毒性試験（イヌ）の平均検体摂取量

投与量 (ppm)		75	100	300	1,200
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	1.6	2.5	8.9	31.5
	雌	1.8	2.3	8.7	34.6

各投与群において認められた毒性所見は表 25 のとおりである。

(毒性所見以外の所見)

臓器重量において、75 ppm の雄で胸腺の相対重量減少傾向がみられたが、病理組織学的検査所見を伴っていないことから投与に関連したものではないと考えられた。

(まとめ)

本試験において、主に胸腺、肝臓に影響がみられた。100 ppm 以上の雄で Hb、Ht の減少、TG の増加、雌で Chol の増加、Alb の減少が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 75 ppm (雄で 1.6 mg/kg 体重/日、雌で 1.8 mg/kg 体重/日) であると考えられた。

表 25 1 年間慢性毒性試験（イヌ）で認められた毒性所見

投与量	雄	雌
1,200 ppm	<ul style="list-style-type: none"> 血小板数の増加 LDH の増加 Alb の減少 胆汁酸の増加 P450 の増加 胸腺の絶対及び相対重量減少傾向 軽微～軽度のび慢性胸腺萎縮 (4/4) 	<ul style="list-style-type: none"> 異常姿勢反応 (後脚後ずさり/固有受容感覚立位障害、片肢立ち及び方肢跳躍障害) 血小板数の増加 好酸球数の減少 GGT 増加 胆汁酸の増加 肝臓の絶対及び相対重量増加傾向 び慢性胸腺萎縮 (1/4)
300 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> Chol の増加 肝臓の相対重量増加、絶対重量増加傾向 	<ul style="list-style-type: none"> TG、Glob の増加 P450 の増加 B 細胞 (CD21) の減少
100 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> Hb、Ht の減少 TG の増加 	<ul style="list-style-type: none"> Chol の増加 Alb の減少
75 ppm	<ul style="list-style-type: none"> 毒性所見なし 	<ul style="list-style-type: none"> 毒性所見なし

② 1 年間反復経口投与毒性/発がん性併合試験（ラット）

Fischer ラット (最終屠殺群：一群雌雄各 50 匹、中間屠殺群：低及び中用量群：雌雄各 10 匹、対照群及び高用量群：雌雄各 20 匹) を用いた混餌 (原体：0、50、500 及び 1,250ppm (雄) /1,000 ppm (雌)；平均検体摂取量は表 26 参照) 投与による 1 年間反復経口投与毒性試験/発がん性併合試験が実施された。

表 26 1 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

投与量 (ppm)		50	500	1,000	1,250
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	2.3	25		67
	雌	2.7	30	65	

各投与群において認められた毒性所見は表 27 のとおりである。

(毒性所見以外の所見)

摂餌量について、雌雄ともに高用量群で軽度の増加のみがみられた。

血液学的検査において中及び高用量群の雄で種々の赤血球検査項目 (MCV、MCH、Hb、Ht) の減少が認められたが、概ね背景データの範囲内であり生物学的に重要な変化とは考えられなかった。また、投与開始 1 年後にはこの傾向は弱まった。血液生化学的検査において低～高用量群の雄で Glob の増加がみられたが、Alub や TP への影響がみられず、また蛋白合成の機能異常を示唆する肝臓の変化もなく、Glob 量の変化につながる免疫組織においても変化は認められなかった。したがって、この変化は偽性と考えられた。中及び高用量群の雄で、TG の増加がみられたが、背景データの範囲を超えたのは 3 ヶ月採血時のみであり、経時的な相関性がみられず、その後の採血時では背景データの範囲内であり、また、用量相関性が認められなかったことから、偶発的なものと考えられた。その他、雄の中用量群又は/及び高用量群において、赤血球分布幅及びヘモグロビン分布幅の増加、血中 Na 濃度及び Cl 濃度の増加、Glu 増加等、雌の中用量群又は/及び高用量群において Plt 増加、好中球、リンパ球及び単球の低下、BUN 増加等が有意に見られたが、いずれも変化量が小さいこと、投与期間を通じて一貫して見られていないことあるいは用量相関性がないことから、検体投与の影響ではないと考えられた。

尿検査において中及び高用量群の雌雄で尿白血球の増加がみられたが背景データの範囲内であったことから正常範囲と考えられた。加えて、尿管組織に影響を示唆する病理組織学的変化は認められなかった。また、雌 1,000 ppm 投与群で尿中ケトン対減少、雄 1,250ppm 及び雌 500ppm 以上投与群の尿 pH 上昇、雌 500ppm 以上投与群の尿比重低下が有意に見られたが、いずれも変化量が小さいこと、投与期間を通じて一貫して見られていないことあるいは用量相関性がないことから、検体投与の影響ではないと考えられた。

(まとめ)

本試験において、500 ppm 投与群の雌雄で Chol の増加、肝臓の相対重量増加、雄で T3、T4 増加、肝臓の絶対重量増加、雌で体重増加抑制が認められたことから、無毒性量は雌雄共に 50 ppm (雄 2.3 mg/kg 体重/日、雌 2.7 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。

表 27 1 年間反復経口投与毒性/発がん性併合試験（ラット）で認められた毒性所見

投与量	雄	雌
1,250 ppm	・体重増加抑制	
1,000 ppm		・体重増加抑制
500 ppm 以上	・Chol の増加 ・T3、T4 増加 ・肝臓の相対重量増加（中間屠殺群） ・肝臓の絶対重量増加（中間屠殺群、500 ppm のみ）	・Chol の増加 ・肝臓の相対重量増加（中間屠殺群）
50 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

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）を用いた混餌投与（原体：0、100、1,500 及び 4,000 ppm；平均検体摂取量は表 28 参照）による 18 ヶ月間慢性毒性/発がん性併合試験が実施された。

表 28 18 ヶ月間発がん性試験（マウス）の平均検体摂取量

投与量 (ppm)		100	1,500	4,000
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	15.7	245	709
	雌	17.9	275	806

各投与群において認められた毒性所見は表 29 のとおりである。

本試験において、1,500 ppm 以上の雌雄に肝臓の絶対及び相対重量増加、腎臓の絶対及び相対重量減少、小葉中心性あるいはび慢性肝細胞肥大が認められたことから、無毒性量は 100 ppm（雄 15.7 mg/kg 体重/日、雌 17.9 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。

表 29 18 ヶ月間発がん性試験（マウス）で認められた毒性所見

投与量	雄	雌
4,000 ppm	・Ht 減少、Ret の増加 ・腎臓の絶対及び相対重量減少	・脾臓のヘモジデリン沈着
1,500 ppm 以上	・肝臓の絶対及び相対重量増加 ・脾臓のヘモジデリン沈着 ・小葉中心性あるいはび慢性肝細胞肥大	・肝臓の絶対及び相対重量増加 ・腎臓の絶対及び相対重量減少 ・小葉中心性あるいはび慢性肝細胞肥大
100 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

(7) 生殖発生毒性試験

アミカルバゾンについて、ラットを用いた繁殖毒性試験並びにラット及びウサギを用いた発生毒性試験が実施された。

① 2 世代繁殖毒性試験（ラット）

SD ラット（一群雌雄各 30 匹）を用いた混餌（0、100、500 及び 1,000 ppm：

平均検体摂取量は表 30 参照) 投与による 2 世代繁殖毒性試験が実施された。

表 30 2 世代繁殖毒性試験（ラット）の平均検体摂取量

投与量 (ppm)		100	500	1,000	
平均検体摂取量 (育成期、mg/kg 体重/日)	P 世代	雄	6.0	31.6	67.1
		雌	6.9	35.8	77.1
	F1 世代	雄	6.8	36.2	79.3
		雌	7.7	41.6	90.9

各投与群で認められた毒性所見は表 31 のとおりである。

本試験において、親動物では、500 ppm 以上の投与群の P 世代雌雄で摂餌量低下、F1 世代の雌雄で体重増加抑制、雌で肝臓の相対重量増加がみられた。児動物では、500 ppm 以上の投与群の F1 及び F2 児動物の雌雄で体重の低値がみられた。したがって、一般毒性に関する無毒性量は親動物、児動物ともに 100 ppm (P : 雄 6.0 mg/kg 体重/日、雌 6.9 mg/kg 体重/日 ; F1 : 雄 6.8 mg/kg 体重/日、雌 7.7 mg/kg 体重/日) であると考えられた。繁殖毒性は認められず、繁殖毒性に関する無毒性量は 1,000 ppm (P : 雄 67.1 mg/kg 体重/日、雌 77.1 mg/kg 体重/日 ; F1 : 雄 79.3 mg/kg 体重/日、雌 90.9 mg/kg 体重/日) であると考えられた。

表 31 2 世代繁殖毒性試験（ラット）で認められた毒性所見（親動物・児動物）

投与群		親動物 : P、児動物 : F1		親動物 : F1、児動物 : F2	
		雄	雌	雄	雌
親動物	1,000 ppm	・ 交配前の体重増加抑制 ・ 肝臓の相対重量増加	・ 肝臓の相対重量増加	・ 最終体重の低下 ・ 交配前の摂餌量増加 ・ 肝臓の相対重量増加 ・ 軽微な肝細胞肥大	・ 最終体重の低下 ・ 交配前の摂餌量増加 ・ 軽微な肝細胞肥大
	500 ppm 以上	・ 交配前の摂餌量低下	・ 交配前の体重増加抑制（傾向） ・ 交配前の摂餌量低下 ・ 妊娠中の体重増加抑制	・ 交配前の体重増加抑制	・ 交配前・妊娠中の体重増加抑制 ・ 哺育期の摂餌量増加 ・ 肝臓の相対重量増加
	100 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし	毒性所見なし	毒性所見なし
児動物	500 ppm 以上	・ 体重の低値		・ 体重の低値	
	100 ppm	毒性所見なし		毒性所見なし	

② 発生毒性試験（ラット）①

SD ラット（一群雌 30 匹）の妊娠 6～19 日に強制経口（0、15、100 及び 300 mg/kg 体重/日）投与によ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 32 のとおりである。

（毒性所見以外の所見）

母動物に対して、15 mg/kg 体重/日投与群でみられた体重増加量の減少は投与開始前からみられており検体投与による影響と考えられず、同群での正味体重減少、最終体重減少、肝臓の相対重量増加は正常な変動の範囲内にあると考えられ、検体投与による影響とはしなかった。

胎児に対して、15 mg/kg 体重/日投与群においても不全骨化を主とする種々の骨格変異（頭頂骨不完全骨化、上後頭骨不完全骨化、尾椎弓未骨化（軟骨）存在、中手骨未骨化（軟骨存在）、第 2 胸骨分節不完全骨化、第 4 胸骨分節不完全骨化）がみられたものの、ほとんどは背景データの範囲内であり、背景データの範囲をわずかに超えた上後頭骨不完全骨化についても、腹単位あたりの発現率に有意差が無かった。また、このことは③発生毒性試験 追試（ラット）②によっても確認された。

（まとめ）

本試験において、母動物に対しては 100 mg/kg 体重/日投与群で硬化便、正味体重減少、体重増加抑制、摂餌量減少、肝臓の相対重量増加、がみられた。総体重増加量及び妊娠子宮重量が減少した。胎児に対しては 100 mg/kg 体重/日投与群で不完全骨化を主とする骨格変異の増加が認められた。したがって、本試験における母動物及び胎児の発生毒性に関する無毒性量は 15 mg/kg 体重/日と考えられた。

表 32 発生毒性試験（ラット）で認められた毒性所見

投与群	母動物	胎児
300 mg/kg 体重/ 日	・間代性痙攣 ・肝臓の絶対重量増加	・胎児体重の低値
100 mg/kg 体重/ 日以上	・硬化便 ・正味体重減少、体重増加抑制、摂餌量減少 ・肝臓の相対重量増加	・不完全骨化を主とする骨格変異
15 mg/kg 体重/日	毒性所見なし	毒性所見なし

③ 発生毒性試験 追試（ラット）②

発生毒性試験（ラット）① [Ⅱ. 4. (7) ③] において認められた胎児の骨格変化と検体との関連性の有無について検討する目的として、SD ラット（一群雌 30 匹）の妊娠 6～19 日に強制経口（0、5 及び 15 mg/kg 体重/日）投与による発

生毒性試験が実施された。

各投与群で毒性所見は認められなかった。

(毒性所見以外の所見)

母動物に対して、15 mg/kg 体重/日投与群で妊娠 12 及び 13 日の体重減少 (4.0%及び 3.9%)、5 mg/kg 体重/日投与群で妊娠 13 日に体重減少 (3.4%) が認められたが、体重増加量、正味体重に有意差は認められなかった。また、15 mg/kg 体重/日投与群で妊娠 8~9 日の摂餌量の減少 (8.2%)、妊娠 14~15 日の摂餌量の増加 (8.6%) が認められたが、反応に一貫性がなく毒性学的意義は小さいものと考えられた。

胎児に対して、毒性的意義のある所見は認められなかった。

(まとめ)

本試験は発生毒性試験 (ラット) ① [Ⅱ. 4. (7) ③] の結論を裏付けて、母動物及び胎児に対する無毒性量は 15 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。

④ 発生毒性試験 (ウサギ) ①

CHBB: HM 系ヒマラヤウサギ (一群雌 22 匹) の妊娠 6~28 日に強制経口 (0、5、20 及び 70 mg/kg 体重/日) 投与によ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 33 のとおりである。

(毒性所見以外の所見)

胎児に対して、対照群の奇形の発現率が異常に低かった (0.7%) ため、奇形を有する胎児又は腹の総発現頻度は全ての検体投与群で増加した (統計学的に有意であったのは 20 mg/kg 体重/日投与群のみ)。しかし、用量依存性は明らかでなく、しかも各群の奇形発生率 (3.9~6.9%) は、この試験に用いたウサギの系統の最新の背景値 (最大 7.3%) 以内であった。20 mg/kg 体重/日投与群 (胎児 3 例)、70 mg/kg 体重/日投与群 (胎児 2 例) において腰椎の欠損が認められたが、この試験と平行して実施された別の試験においても胸椎又は腰椎の欠損が投与と関係なく認められた (対照群 1 例、低及び中用量群で各 2 例)。さらに別の試験においても全ての投与群において用量依存性を伴わずに腰椎の所見がみられている (対照群で過剰腰椎 1 例、低用量で 3 例、中及び高用量で各 1 例に腰椎欠損、低用量の 1 例で胸椎欠損及び 1 対の肋骨欠損等)。したがって、検体投与による奇形の発現頻度及び種類に影響はみられていないと考えられる。このことは、追加して実施された発生毒性 (ウサギ) ② [Ⅱ. 4. (7) ⑤] においても確認された。

(まとめ)

本試験において、母動物では 20 mg/kg 体重/日投与群で体重増加抑制がみられた。胎児では 70 mg/kg 体重/日投与群で胎児体重のわずかな減少、骨化遅延が認められた。したがって、本試験における無毒性量は母動物に対して 5 mg/kg 体重

1日、胎児に対しては 20 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。

表 33 発生毒性試験 (ウサギ) で認められた毒性所見

投与群	母動物	胎児
70 mg/kg 体重/日	<ul style="list-style-type: none"> ・全身毒性 (摂餌量の重度減少、体重の重度減少、耳介温度低下)、流産 (1 例) ・耳介温度低下 (1 例) ・摂餌量減少、糞量減少、摂水量減少、着色尿 ・胃腸の大型化 (1 例)、粗粒状胎盤 	<ul style="list-style-type: none"> ・胎児体重のわずかな減少 ・骨化遅延
20 mg/kg 体重/日以上	・体重増加抑制	20 mg/kg 体重/日以下 毒性所見なし
5 mg/kg 体重/日	毒性所見なし	

⑤ 発生毒性試験 追試 (ウサギ) ②

奇形が発現しないことを確認する目的として、先に実施した発生毒性 (ウサギ) ① [Ⅱ. 4. (7) ④] に追加して、CHBB: HM 系ヒマラヤウサギ (一群雌 22 匹) の妊娠 6~28 日に強制経口 (0 及び 70 mg/kg 体重/日) 投与によ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 34 のとおりである。

(毒性所見以外の所見)

胎児動物において、70 mg/kg 体重/日投与群で、心室中隔欠損 (1 例)、腰椎 1 本欠損等 (1 例) の奇形が認められたが、対照群と有意な差が無かったことから、毒性所見とはとらなかった。

(まとめ)

本試験において、母動物では 70 mg/kg 体重/日投与群で体重減少及び体重増加抑制、摂餌量減少、耳介温度低下、糞量減少、摂水量の減少、着色尿、壊死性あるいは粗粒状胎盤が認められた。胎児では体重の低値、骨化遅延が認められた。したがって、最高用量である 70 mg/kg 体重/日において催奇形性を及ぼさないことが確認された。

表 34 発生毒性試験 (ウサギ) で認められた毒性所見

投与群	母動物	胎児
70 mg/kg 体重/日	<ul style="list-style-type: none"> ・耳介温度低下 ・摂餌量減少、糞量減少、糞淡色化、飲水量減少、尿量減少、着色尿 ・体重増加抑制、体重減少 ・部分的な壊死性あるいは粗粒状 	<ul style="list-style-type: none"> ・胎児体重の低値 ・骨化遅延

(参考) 発達神経毒性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌 30 匹) の妊娠 0 日～哺育 21 日に混餌 (原体: 0、100、500 及び 1,000 ppm: 平均検体摂取量は表 35 参照) 投与して、発達神経毒性試験が実施された。

表 35 発達神経毒性 (ラット) の平均検体摂取量

投与量 (ppm)		100	500	1,000
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	妊娠期	7.4～7.8	37.4～41.7	84.7～102.6
	哺育期	14.4～19.0	64.4～96.5	140.1～212.0

各投与群で認められた毒性所見は表 36 のとおりである。

(毒性所見以外の所見)

雌の 1,000 ppm 投与群において、脳の絶対重量の有意な低値が認められたが、体重の低値による二次的影響と考えられた。

脳の顕微鏡的形態計測において、生後 11 日の雄の 1,000 ppm 群で前頭皮質及び脳梁の測定値の有意な低値が認められたが、次の理由から偶発的なものであり検体投与による影響ではないと考えられた。①前脳の切片作製にばらつきがあったこと、②同じ前脳切片の頭頂葉皮質の測定値に对照群との差が認められないこと、③前脳の測定のうち、脳梁の測定値が前脳切片作製のばらつきでより大きな変化を受けたこと、④生後 11 日の雌において、前頭皮質及び脳梁の測定値に影響が認められなかったこと、⑤生後 70 日の雄の前頭皮質及び脳梁の測定値に影響が認められなかったこと。

また、生後 70 日の 1,000 ppm の雄で尾状核被殻、雌で脳梁の測定値の低値が認められたが、わずかであること、生後 11 日の測定値に有意な影響が認められていないことから、生物学的意義が疑わしく、偶発的で検体投与による影響ではないと考えられた。

(まとめ)

本試験において、母動物に対しては 500 ppm 以上で哺育期間中の体重増加抑制がみられた、児動物では 500 ppm 以上で哺育中の体重増加抑制、離乳後の体重低値が認められた。したがって、本試験における母動物及び児動物に対する無毒性量は 100 ppm (妊娠期: 7.4～7.8 mg/kg/日、哺育期: 14.4～19.0 mg/kg 体重/日) であると考えられた。発達神経毒性は認められなかった。

表 36 発達神経毒性 (ラット) で認められた毒性所見

投与群	母動物	児動物
1,000 ppm	・体重低値・増加抑制 (妊娠期)	・体重低値 (哺育期・最終体重)
500 ppm 以上	・体重増加抑制 (哺育期)	・体重増加抑制 (哺育期) ・体重低値 (離乳後)
100 ppm	・毒性所見なし	・毒性所見なし

(8) 遺伝毒性試験

アミカルバゾン原体について、細菌を用いた復帰突然変異試験、*in vitro* 染色体異常試験、*in vitro* 遺伝子突然変異試験、*in vivo* マウス小核試験及び *in vivo* ラット小核試験が実施された。

結果は表 37 に示したとおりである。

いずれの試験においても陰性の結果であったことから、アミカルバゾン原体には生体において問題となる遺伝毒性はないものと考えられた。

表 37 遺伝毒性試験の概要

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、TA1535、TA1537 株)	16～5,000 µg/plate (+/-S9)	陰性
	復帰突然変異試験	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) <i>Escherichia coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> 株)	156～5,000 µg/plate (+/-S9)	陰性
	染色体異常試験	チャイニーズハムスター肺由来 V79 培養細胞	1,000 ～ 3,000 µg/mL (+/-S9)	陰性
	遺伝子突然変異試験	チャイニーズハムスター肺由来 V79 培養細胞	250 ～ 4,000 µg/mL (+/-S9)	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)	100 mg/kg 体重 (単回腹腔内投与、16、 24、48 時間後に標本作製)	陰性
	小核試験	SD ラット(骨髄細胞) (一群雄各 5 匹)	500、1,000、2,000 mg/kg 体重 (24 時間間隔で 2 回強制経口投与、24 時間 後に標本作製)	陰性

注) +/-S9 : 代謝活性化存在下及び非存在下

(9) その他の試験**① 甲状腺ホルモンに対する影響検討試験 (*in vitro*)**

ラットを用いた 90 日間反復経口投与毒性試験 [II . 4 . (4) .①] において、甲状腺濾胞細胞過形成の増加、甲状腺ホルモンの増加認められ、ラットを用いた 2 年間経口投与毒性試験 [II . 4 . (5) .②] において甲状腺ホルモンの増加が認められた。また、イヌを用いた 90 日間経口投与毒性試験 [II . 4 . (4) .②] において、甲状腺ホルモンの変化、甲状腺刺激ホルモンの増加、甲状腺の重量増加、甲状腺の 1 コロイド及び/又は濾胞上皮細胞の空胞化が認められ、甲状腺ホルモン合成阻害とその後のホルモン分泌を制御するネガティブフィードバック機構の変化、又はそれらの相互作用の結果である可能性が考えられた。そこで、アミカルバゾン原体、主要代謝物である代謝物 B 及び想定加水分解性生物 K と、甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO)、I 型ヨードサイロニン脱ヨウ素酵素 (ID-I)、II 型ヨードサイロニン脱ヨウ素酵素 (ID-II) との相互作用を *in vitro* で試験した。

その結果、アミカルバゾン原体、代謝物 B 及び想定加水分解性生物 K は TPO 触媒によるグアヤコール酸及びヨウ素生成に影響せず、これらの化合物が TPO

を阻害することもなく、ヨウ素化種をトラップすることもできなかったことが示された。同様に、アミカルバゾン原体、代謝物 B 及び想定加水分解性生物 K は ID-I に触媒されるモデル基質 3,3',5'-L-トリヨードサイロニンのフェノール環の脱ヨウ素にも、ID-II に触媒される T4 のフェノール環の脱ヨウ素にも影響せず、これらの脱ヨウ素酵素を阻害しなかったことが示された。

したがって、アミカルバゾン原体によってみられたイヌ及びラットにおける甲状腺の変化は、甲状腺ホルモン合成阻害によるものでなく、肝臓の酵素誘導が甲状腺ホルモンバランスに影響し、二次的に甲状腺に影響を及ぼしたと考えられた。

② 内分泌毒性機序検討試験 (ラット)

ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験[Ⅱ. 4. (4). ①] 及び 2 年間反復経口投与毒性/発がん性試験[Ⅱ. 4. (5). ②] では肝臓、甲状腺、膵臓及び血液関連臓器 (脾臓及び骨髄) に構造的及び機能的変化が認められたため、内分泌及び甲状腺に焦点を当てた試験が実施された。

Fischer ラット (一群雌雄各 25 匹。ただし対照群と対象用量群は別途一群各 5 匹追加。) を用いた 10 週間混餌 (原体 : 0、50、1,250 及び 2,500 ppm : 平均検体摂取量は表 38 参照) 投与による内分泌毒性機序検討試験が実施された [なお、対照群及び 2,500 ppm 投与群については、投与終了後、4 週間の回復期間が設けられた]。

本試験では、一般状態、体重、摂餌量、臓器重量 (副腎、子宮頸部、肝臓、卵巣、脳、精巣、甲状腺、子宮、膈)、性周期、血中甲状腺ホルモン測定、肝臓酵素活性 (ウリジンニリン酸グルクロノシルトランスフェラーゼ (UDP-GT) 活性、5' -脱ヨウ素酵素 (5' DI) 活性) 測定のほか、10 週間投与後に ^{125}I ヨウ化ナトリウムを腹腔内投与し、さらに過塩素酸カリウム (KClO_4) を腹腔内投与することにより、甲状腺におけるヨウ素 (^{125}I) の取り込みを測定する過塩素酸塩放出試験が実施された (陽性対照薬物 ; PTU : 200 mg/kg 体重/日 強制経口投与)。

表 38 内分泌毒性機序検討試験 (ラット) の平均検体摂取量

投与量 (ppm)		50	1,250	2,500
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	0.8	19.4	40.0
	雌	0.6	13.5	28.8

各投与群で認められた毒性所見は表 39 のとおりである。

(毒性所見以外の所見)

過塩素酸塩放出試験では、雄では影響はみられず、雌では 2,500 ppm 群で対照群に比べて甲状腺/血液比の増加が認められたが、陽性対照である PTU (プロピルチオウラシル) では甲状腺/血液比は低下を示したことから、陽性対照の PTU と異なり、甲状腺に対して直接影響を及ぼすことはないと考えられる。

（まとめ）

甲状腺に対する影響として、1,250 ppm 群の雌では血中 TSH、遊離 T3、総 T3、遊離 T4、総 T4 増加が認められた。過塩素酸放出試験の結果から、アミカルバゾンは甲状腺へ直接的に影響するものではなく、肝臓における甲状腺ホルモン代謝の攪乱に基づくものと考えられる。したがって、検体は甲状腺外（おそらく肝臓）のメカニズムを介して甲状腺の恒常性を変化させていることが示唆された。

表 39 内分泌毒性機序検討試験（ラット）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
2,500 ppm	・ 血中総 T3 の増加	・ 性周期のわずかな延長（104%）
1,250 ppm 以上 (続き) 1,250 ppm 以上	・ 肝臓の絶対及び相対重量増加 ・ UDP-GT 活性増加	・ 肝臓の絶対及び相対重量増加 ・ 血中 TSH、遊離 T3、総 T3、遊離 T4、総 T4 増加（これらは 1,250 ppm のみ） ・ UDP-GT 活性増加 ・ 子宮の絶対及び相対重量増加
50 ppm	・ 毒性所見なし	・ 毒性所見なし

③ 免疫毒性試験（ラット）

Fischer ラット（一群雌 10 匹）を用いた混餌（原体：0、250、1,000 及び 2,500 ppm；平均検体摂取量は表 40 参照）投与による 28 日間反復投与による免疫毒性試験が実施された。

表 40 28 日間反復投与免疫毒性試験（ラット）の平均検体摂取量

投与量 (ppm)		250	1,000	2,500
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雌	20	81	195

各投与群において認められた毒性所見は表 41 のとおりである。なお、胸腺重量に影響はみられなかった。

本試験における一般毒性の無毒性量は、1,000 ppm 以上の群で体重増加抑制、摂餌量の減少がみられたことから 250 ppm（20 mg/kg 体重/日）、免疫毒性の無毒性量は、2,500 ppm で脾臓の絶対及び相対重量の減少、脾臓細胞数減少及び IgM 産生細胞の反応性低下がみられ、1,000 ppm 以下では影響がみられていないことから 1,000 ppm（81 mg/kg 体重/日）であると考えられた。

表 41 28 日間反復投与免疫毒性試験（ラット）で認められた毒性所見

投与量	雌
2,500 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・脾臓の絶対重量減少及び相対重量減少傾向 ・脾臓細胞数減少 ・IgM 抗体産生細胞 (AFC) の反応性の低下
1,000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・摂餌量減少
250 ppm	・毒性所見なし

III. 総合評価

¹⁴C で標識したアミカルバゾンのラットを用いた動物体内運命試験の結果、アミカルバゾンは単回経口投与後、雌雄の低用量投与群で 1~2 時間、高用量投与群で 2~4 時間で Tmax に達し、少なくとも吸収率は 91.4%と算出された。排泄は速やかで、投与後 24 時間で 40.9~85.5%TAR が尿中、10.1~44.2%TAR が糞中に排泄され、主に尿中へ排出された。

尿中の主要代謝物は C、D、B の 3 種、糞及び胆汁中の主要代謝物は J であった。ラット雌雄において、Tmax 付近で高い組織中の残留放射能を示したのは、消化管、腎臓、肝臓、膀胱、下垂体、膵臓、肺、副腎であった。全ての組織中の残留放射能は投与 24 時間後までに速やかに減少し、投与 168 時間後におけるカーカスを含む組織中残留放射能の合計は <0.25%TAR であった。

各種毒性試験の結果から、アミカルバゾンの反復投与による主な影響は、血液系（赤血球の減少、イヌ；Plt の増加）、肝臓（重量増加等）、及び胆嚢（イヌ；粘膜の過形成及び胆汁酸増加）に認められた。

発がん性、神経毒性、発達神経毒性、催奇形性及び遺伝毒性は認められなかった。

各毒性試験における無毒性量及び最小毒性量並びに最小毒性量で認められた所見を表 42 に示す。

各試験で得られた無毒性量の最小値はイヌを用いた 1 年間慢性毒性試験の 1.6 mg/kg 体重/日であったことから、当該試験を非食用農薬一日摂取許容量（非食用農薬 ADI）の根拠とすることが適切であると考えられた。

以上の結果を踏まえ、アミカルバゾンに対する非食用農薬 ADI を次のように評価する。

非食用農薬 ADI	0.016 mg/kg 体重/日
設定根拠試験	慢性毒性試験
動物種	イヌ
期間	1 年間
投与方法	混餌投与
無毒性量	1.6 mg/kg 体重/日
安全係数	100
	種間差 10、個人差 10

なお、海外での評価状況は以下のとおりである。

国・地域	評価機関	評価結果	
米国	EPA (2005)	CRfD	0.023 mg/kg 体重/日
		設定根拠	無毒性量：2.3 mg/kg 体重/日 (ラット、イヌ) 最小毒性量： 25.3 mg/kg 体重/日 (ラット) 8.7 mg/kg 体重/日 (イヌ) ラット 1 年間慢性毒性/発がん性併合試験 イヌ 1 年間慢性毒性試験 安全係数：100
		ARfD (13-49 歳女性)	0.10 mg/kg 体重/日
		設定根拠	無毒性量：10 mg/kg 体重/日 ラット急性神経毒性試験 安全係数：100
		ARfD (一般人)	0.10 mg/kg 体重/日
		設定根拠	無毒性量：10 mg/kg 体重/日 ラット急性神経毒性試験 安全係数：100
オーストラ リア	APVMA (2006)	ADI	0.02 mg/kg 体重/日
		設定根拠	無毒性量：2 mg/kg 体重/日 ラット 2 年間慢性毒性試験 安全係数：100
		ARfD	0.1 mg/kg 体重
		設定根拠	無毒性量：10 mg/kg 体重/日 ラット急性神経毒性試験 安全係数：100

APVMA⁴ (2006) : Gazette No.12, 5 December 2006

⁴ Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority

表 42 各試験における無毒性量及び最小毒性量

動物種	試験	無毒性量 (最小毒性量) (mg/kg 体重/日) 及び 最小毒性量で認められた所見	国外での評価 無毒性量 (最小毒性量) (mg/kg 体重/日)
ラット	90 日間 亜急性毒性試験	雄 : 6.9 (17.8) 雌 : 7.9 (20.5) 雌雄 : Chol の増加	EPA (2005) 雄 : 33 (67) 雌 : 38 (78)
	21 日間 反復経皮毒性試験	雄 : 1,000 (-) 雌 : 1,000 (-) 雄 : - 雌 : -	EPA (2005) 雄 : 1,000 (-) 雌 : 1,000 (-)
	90 日間 亜急性神経毒性試験	雄 : 66.5 (-) 雌 : 7.8 (38.2) 雄 : - 雌 : 体重減少、摂餌量減少	EPA (2005) 雄 : 66.5 (-) 雌 : 7.8 (38.2)
	1 年間反復経口投与 毒性/発がん性併合 試験	雄 : 2.3 (25) 雌 : 2.7 (30) 雄 : Chol の増加、T3、T4 増加、肝臓の相対 重量増加 (中間屠殺群)、肝臓の絶対重量 増加(中間屠殺群、500 ppm のみ) 雌 : 体重増加抑制、Chol の増加、肝臓の相対 重量増加 (中間屠殺群)	EPA (2005) 雄 : 2.3 (25.3) 雌 : 2.7 (29.5)

動物種	試験	無毒性量 (最小毒性量) (mg/kg 体重/日) 及び 最小毒性量で認められた所見	国外での評価 無毒性量 (最小毒性量) (mg/kg 体重/日)
ラット (続き)	2 世代繁殖毒性試験	<一般毒性> 雄：6.0 (31.6) 雌：6.9 (35.8) <繁殖毒性> 雄：67.1 (－) 雌：77.1 (－) 親動物 P 雄：交配前の摂餌量低下 P 雌：交配前の摂餌量低下 F1 雄：交配前の体重増加抑制 F1 雌：交配前・妊娠中の体重増加抑制、肝臓の相対重量増加、哺育期の摂餌量増加 児動物 F1：体重の低値 F2：体重の低値 (繁殖毒性は認められない)	EPA (2005) 親動物/全身毒性 雄：6.4 (33.9) 雌：7.3 (38.7) 生殖毒性 雄：73.2 (－) 雌：84.0 (－) 児動物毒性 雄：6.4 (33.9) 雌：7.3 (38.7)
	発生毒性試験	母動物：15 (100) 胎児：15 (100) 母動物：硬化便、正味体重減少、体重増加抑制、摂餌量減少、肝臓の相対重量増加 胎児：不全骨化を主とする骨格変異 (催奇形性は認められない)	EPA (2005) 母動物：15 (100) 胎児：15 (100)
	(参考) 発達神経毒性	母動物： 7.4-7.8 (37.4-41.7) (妊娠期) 児動物： 7.4-7.8 (37.4-41.7) (妊娠期) 母動物：体重増加抑制 (哺育期) 児動物：体重増加抑制 (哺育期)、体重低値 (離乳後) (発達神経毒性なし)	EPA (2005) 母動物：8 (39) 胎児：39 (91)

動物種	試験	無毒性量 (最小毒性量) (mg/kg 体重/日) 及び 最小毒性量で認められた所見	国外での評価 無毒性量 (最小毒性量) (mg/kg 体重/日)
マウス	18 ヶ月間発がん性 試験	雄：15.7 (245) 雌：17.9 (275) 雄：肝臓の絶対及び相対重量増加、脾臓のヘ モジデリン沈着、小葉中心性あるいはび 慢性肝細胞肥大 雌：肝臓の絶対及び相対重量増加、腎臓の絶 対及び相対重量減少、小葉中心性あるい はび慢性肝細胞肥大	EPA (2005) 雄：244.7 (709.0) 雌：275.0 (806.3)
ウサギ	発生毒性試験	母動物：5 (20) 胎 児：20 (70) 母動物：体重増加抑制 胎 児：胎児体重のわずかな減少、骨化遅延 (催奇形性は認められない)	EPA (2005) 母動物：5 (20) 胎 児：20 (70)
イヌ	90 日間 亜急性毒性試験	雄：6.74 (27.03) 雌：6.28 (24.99) 雄：T4 の増加、血小板数の増加、TG の増加、 Alb の減少、肝臓の絶対及び相対重量増 加 雌：白血球百分率の好酸球減少、Glu の減少、 胸腺の絶対及び相対重量減少傾向	EPA (2005) 雄：6.74(27.03) 雌：6.28(24.99)
	1 年間 慢性毒性試験	雄：1.6 (2.5) 雌：1.8 (2.3) 雄：Hb、Ht の減少、TG の増加 雌：Chol の増加、Alb の減少	EPA (2005) 雄：2.5 (8.9) 雌：2.3 (8.7)

—：最小毒性量は設定できなかった。

EPA⁵ (2005) : Amicarbazone : HED human risk assessment for new food use herbicide on field corn. PC Code:114004, Petition#:0F6131, DP Barcode: D288216.

⁵ Environmental Protection Agency,

<別紙 1> 代謝物略称

名称 (記号)	由来	名 称
アミカルバゾン	親化合物	4-amino- <i>N</i> - <i>tert</i> -butyl-4,5-dihydro-3-isopropyl-5-oxo-1 <i>H</i> -1,2,4-triazole-1-carboxamide
DA MKH3586 MKH 3594 脱アミノ体 (B)	動物	<i>N</i> - <i>tert</i> -butyl-4,5-dihydro-3-isopropyl-5-oxo-1 <i>H</i> -1,2,4-triazole-1-carboxamide
iPr-2-OH DA MKH 3586 (C)	動物	<i>N</i> - <i>tert</i> -butyl-4,5-dihydro-3-(1-hydroxy-1-methylethyl)-5-oxo-1 <i>H</i> -1,2,4-triazole-1-carboxamide
tBu-OH DA MKH 3586 (D)	動物	4,5-dihydro- <i>N</i> -(2-hydroxy-1,1-dimethylethyl)-3-isopropyl-5-oxo-1 <i>H</i> -1,2,4-triazole-1-carboxamide
iPr-1,2-diOH DA MKH 3586 (E)	動物	<i>N</i> - <i>tert</i> -butyl-3-(1,2-dihydroxy-1-methylethyl)-4,5-dihydro-5-oxo-1 <i>H</i> -1,2,4-triazole-1-carboxamide
tBu-iPr-2-diOH DA MKH 3586 (F)	動物	4,5-dihydro- <i>N</i> -(2-hydroxy-1,1-dimethylethyl)-3-(1-hydroxy-1-methylethyl)-5-oxo-1 <i>H</i> -1,2,4-triazole-1-carboxamide
iPr-1,3-diOH DA MKH 3586 (G)	動物	<i>N</i> - <i>tert</i> -butyl-3-(2-hydroxy-1-hydroxymethylethyl)-4,5-dihydro-5-oxo-1 <i>H</i> -1,2,4-triazole-1-carboxamide
tBu-iPr-1,2-triOH DA MKH 3586 (H)	動物	4,5-dihydro- <i>N</i> -(2-hydroxy-1,1-dimethylethyl)-3-(1,2-dihydroxy-1-methylethyl)-5-oxo-1 <i>H</i> -1,2,4-triazole-1-carboxamide
tBu-OH-iPr-ene DA MKH 3586 (I)	動物	4,5-dihydro- <i>N</i> -(2-hydroxy-1,1-dimethylethyl)-3-(1-methylethyl)-5-oxo-1 <i>H</i> -1,2,4-triazole-1-carboxamide
MKH 3586 GA (J)	動物	<i>N</i> -glucuronide of 4-amino- <i>N</i> - <i>tert</i> -butyl-4,5-dihydro-3-isopropyl-5-oxo-1 <i>H</i> -1,2,4-triazole-1-carboxamide
Decarboxamide MKH 3596 KOK9422 Triazolinone MKH 3586 脱カルボキサミド	加水分解 水中光分解	4-amino-2,4-dihydro-5-isopropyl-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-one

名称 (記号)	由来	名 称
体 N-アミノトリアゾ リン (原体混在物) (K)		
N-methyl DA MKH 3586 N-メチル脱アミノ 体 (P)	土壌	<i>N-tert</i> butyl4,5-dihydro-3-isopropyl-4-methyl-5-oxo-1 <i>H</i> 1,2,4-triazole-1-carboxamide
iPr-1-OH DA MKH 3586 (S)	動物	想定同定代謝物
tBu-OH MKH 3586 (U)	動物	暫定同定代謝物

＜別紙 2＞ 検査値等略称

略称	名 称
ATP	アデノシン三リン酸
ADI	一日摂取許容量
AFC	抗体産生細胞
Alb	アルブミン
ALP	アルカリホスファターゼ
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
APTT	活性化部分トロンボプラスチン時間
ARfD	急性参照用量
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	血中薬物濃度曲線下面積
BUN	血中尿素窒素
¹⁴ C	放射性同位体である炭素 14
Ca	カルシウム
Chol	コレステロール
CK	クレアチニンキナーゼ
Cmax	最大血中濃度
CRfD	慢性参照用量
DT ₅₀	土壌中半減期
GGT	γ-グルタミルトランスぺプチダーゼ
Glob	グロブリン
GLP	優良試験所規範（Good Laboratory Practice）
Glu	グルコース
Hb	ヘモグロビン量
HDW	ヘモグロビン濃度分布幅
Ht	ヘマトクリット値
ID-I	I 型ヨードサイロニン脱ヨウ素酵素
ID-II	II 型ヨードサイロニン脱ヨウ素酵素
IgM	免疫グロブリン M
<i>In vitro</i>	生体外
<i>In vivo</i>	生体内
K _p ^{ads}	フロイントリッヒの土壌吸着係数
K _p ^{ads oc}	有機炭素含有率で補正したフロイントリッヒの土壌吸着係数
LC ₅₀	50%致死濃度
LD ₅₀	50%致死量

LDH	乳酸脱水素酵素
LogPow	オクタノール/水分配係数
MCH	平均赤血球ヘモグロビン量
MCHC	平均赤血球ヘモグロビン濃度
MCV	平均赤血球容積
NADPH	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
NMRI	Naval Medical Research Institute
NZW	New Zealand White
P450	チトクローム p450
Plt	血小板数
ppm	百万分の 1 (Parts per million)
PR	脈拍数
RBC	赤血球
PTU	プロピルチオウラシル
Ret	網状赤血球
SD	Sprague-Dawley
TAR	総投与放射活性
TG	トリグリセリド
T _{1/2}	半減期
T3	トリヨードサイロニン
T4	サイロキシシン
TLC	薄層クロマトグラフィー
Tmax	最高血中濃度 到達時間
TP	総蛋白
TPO	甲状腺ペルオキシダーゼ
TSH	甲状腺刺激ホルモン
UDP-GT	ウリジンニリン酸グルクロノシルトランスフェラーゼ
WU	Wistar- Unilever