

Hoefchen 土壌及び Laacherhof 土壌ではそれぞれ 49 及び 58%TAR (いずれも処理 7 日後) であり、いずれの土壌においても、試験終了時までには、2%TAR 以下に減少した。M3 の最大値は、Claude 土壌では 7.5%TAR (処理 30 日後)、Fresno 土壌では 2.8%TAR (処理 14 日後) であった。Hoefchen 及び Laacherhof 土壌では、それぞれ 10.6%TAR (処理 14 日後) 及び 11.4%TAR (処理 30 日後) であり、その後減少した。M5 については、Claude 土壌及び Fresno 土壌で、処理 30 日後にそれぞれ 7 及び 4%TAR に増加し、Hoefchen 土壌及び Laacherhof 土壌では、試験期間を通じて 2%TAR 未満であった。また、50 倍過剰量で処理した Claude 土壌からは、M10 及びその加水分解物である M11 が同定された。

スピロメシフェンの好氣的土壌における分解経路は、エステルの開裂による M1 の生成、M1 の 4-メチルフェニル部分あるいはシクロペンチル環の水酸化及び酸化による M3 (4-カルボン酸体) あるいは M5 (ペンタノン) の生成、また、M10 (カルボキシペンチルエステル) 及びその加水分解物 M11 (グリオキシル酸体) を経て、最終的に CO₂ まで完全に無機化される考えられた。(参照 9)

(2) 好氣的土壌中運命試験 ([phe-¹⁴C]スピロメシフェン)

[phe-¹⁴C]スピロメシフェンを砂壤土 (Fresno 土壌: 米国) に乾土あたり 0.4 mg/kg (900 g ai/ha に相当) となるように添加し、20°C の暗条件下で 120 日間インキュベートして好氣的土壌運命試験が実施された。

水及びアセトニトリルで抽出された放射エネルギーは、経時的に減少し、それに伴い結合性残留物 (処理 0 及び 120 日後でそれぞれ 5.8 及び 20.5%TAR) 及び ¹⁴CO₂ (処理 120 日後に約 30%TAR) が増加した。

親化合物は速やかに分解された。M1 は処理 7 日後に 77.1%TAR まで増加した後、処理 120 日後には 22%TAR まで減少した。M3 は処理 3 日後に増加し始め、処理 90 日後に 11.3%TAR に達し、試験終了時では 11.1%TAR であった。M5 は処理 3 日後から認められ、処理 62 日後に 5.1%TAR まで増加し、試験終了時には 4.6%TAR に減少した。スピロメシフェンの推定半減期及び 90% 消失期間はそれぞれ 2.6 及び 8.6 日であった。

スピロメシフェンの好氣的土壌における分解経路は、エステルの開裂による M1 の生成、M1 の 4-メチルフェニル部分あるいはシクロペンチル環の水酸化及び酸化による M3 あるいは M5 の生成を経て、最終的に CO₂ まで完全に無機化されると考えられた。(参照 10)

(3) 好氣的土壌中運命試験 ([cyc-¹⁴C]スピロメシフェン)

[cyc-¹⁴C]スピロメシフェンを砂壤土 (Fresno 土壌: 米国) に乾土あたり 0.401 mg/kg (900 g ai/ha に相当) となるように添加し、20°C の暗条件下で 90 日間インキュベートして好氣的土壌中運命試験が実施された。

水及びアセトニトリルで抽出された放射エネルギーは、処理当日の 99.1%TAR から経時

的に減少し、試験終了時点では 67.2% TAR であった。結合性残留物及び $^{14}\text{CO}_2$ は経時的に増加し、最高値はそれぞれ 13.9% TAR (処理 90 日後) 及び 14.3% TAR (試験終了時) であった。

親化合物は速やかに分解された。M1 は処理 30 日後に 82.2% TAR まで増加した後、処理 90 日後には 45.3% TAR まで減少した。M3 は経時的に増加し、処理 90 日後に 14.1% TAR に達した。M5 及び M12 (2-ヒドロキシメチル体) を含むその他の分解物はいずれも 5% TAR 未満であった。スピロメシフェンの推定半減期は 3.8 日と考えられた。

スピロメシフェンの好氣的土壌における分解経路は、エステルの開裂による M1 の生成、M1 の 4-メチルフェニル部分あるいはシクロペンチル環の水酸化及び酸化による M3 あるいは M5 の生成を経て、最終的に CO_2 まで完全に無機化される経路と考えられた。(参照 11)

(4) 土壌表面光分解試験

[dhy- ^{14}C]スピロメシフェンを砂壤土 (Fresno 土壌 : 米国) に乾土あたり 2 $\mu\text{g/g}$ となるように加えた後、 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ でフィルター付のキセノンランプ (光強度 : 680 W/m^2 、波長 : 300~800 nm) を 10 日間連続照射し、土壌表面光分解試験が実施された。なお、土壌中の微生物活性を維持するため、土壌の水分含量を 1/3 バール含水量の 75% に維持された。

光照射により、親化合物は処理直後の 98.9% TAR から、処理 10 日後には 72.9% TAR まで減少した。M1 は処理 10 日後に 11.6% TAR まで増加した。その他に主要分解物は認められなかった。結合性残留物は処理 10 日後に最大で 7.4% TAR に達した。

暗所対照区では、親化合物は処理 10 日後に 73.9% TAR まで減少した。M1 が検出された唯一の分解物で、処理 10 日後には 24.1% TAR まで増加した。

推定半減期は、照射区及び暗所対照区ともに 23.1 日 (外部環境下では 5.8 日に相当) と考えられ、スピロメシフェンの土壌での分解に光は寄与しないことが示唆された。(参照 12)

(5) 土壌吸着試験

4 種類の土壌 [砂壤土 (青森、埼玉及び茨城) 及びシルト質砂土 (Lufa Speyer 土壌 : ドイツ)] を用いた [dhy- ^{14}C]スピロメシフェンの土壌吸着試験及び 4 種類の土壌 [砂壤土 (岡山)、砂土 (宮崎)、壤土 (茨城) 及びシルト (埼玉)] を用いた分解物 M1 の土壌吸着試験が実施された。

Freundlich の吸着係数 K_{ads} はスピロメシフェンで 175~7,220、M1 で 0.0228~0.535 であった。有機炭素含有率により補正した吸着係数 K_{oc} はスピロメシフェンで 5,050~179,000、分解物 M1 で 0.527~31.8 であった。(参照 13、14)

4. 水中運命試験

(1) 加水分解試験 (滅菌緩衝液)

[dhy-¹⁴C]スピロメシフェンを pH 4 (酢酸緩衝液)、pH 7 (Tris 緩衝液) 及び pH 9 (ホウ酸緩衝液) の各滅菌緩衝液に 0.065 mg/L となるように加えた後、暗条件下、25 及び 50°C で 30 日間インキュベートして加水分解試験が実施された。

50°C では、親化合物は pH 4 緩衝液中で処理 6 日後に 15.1% TAR にまで減少し、pH 7 及び 9 ではそれぞれ処理 3 日後に 30.5% TAR 及び定量限界未満に減少した。

25°C では、親化合物は処理 30 日後に pH 4、7 及び 9 で 71.0、42.9% TAR 及び定量限界未満に減少した。

スピロメシフェンの半減期は pH 及び温度の上昇とともに短縮した。pH 4、7 及び 9 での推定半減期は、50°C でそれぞれ 2.2 日、1.7 日及び 2.6 時間、25°C ではそれぞれ 53.3、24.8 及び 4.3 日、20°C ではそれぞれ 107、44.7 及び 4.8 日であった。

加水分解での主要分解物は M1 (エノール体) であった。M1 は、50°C では pH 4、7 及び 9 で処理 3 日後にそれぞれ 54.9、68.3 及び 96.8% TAR に達した。25°C では、処理 30 日後にそれぞれ 27.5、54.3 及び 95.7% TAR に達した。その他、少量の分解物が検出されたが、いずれの温度、pH でも 3% TAR を超える成分は認められなかった。(参照 15)

(2) 水中光分解試験 (自然水 / [dhy-¹⁴C]スピロメシフェン)

[dhy-¹⁴C]スピロメシフェンを自然水 (ドイツマンハイム、ライン川河川水、pH 7.6) に 0.06 mg/L となるように加えた後、25 ± 1°C でキセノンランプ (光強度: 914 W/m²、波長: 300~800 nm) を 8 日間連続照射して水中光分解試験が実施された。

光照射により親化合物は分解し、推定半減期は 1.8 日 (東京の 4~6 月の太陽光換算で約 17 日) であった。

照射区において、親化合物は処理 0 時間で既に 95.5% TAR であり、M1 が 4.1% TAR 生成していた。処理 6 日後には、親化合物は 5% TAR 未満になり、以後、試験終了時まで 3.7~4.9% TAR であった。8 日間の照射により 2.6% TAR の揮発性成分、0.3% TAR の ¹⁴CO₂ が発生し、溶液中では M1 が処理 1 日後に最大 26.9% TAR に達した後、試験終了時には 11.4% TAR まで減少した。それ以外に 10% TAR を超える分解物は認められなかった。この他、M12 が処理 3 日後に最大値 8.8% TAR に達し、試験終了時に 7.2% TAR が検出された。また、M13 (試験終了時に最大値 5.6% TAR) 及び M14 (処理 3 日後に最大値 4.6% TAR) が検出された。

暗所対照区の試験終了時には、親化合物は 27.3% TAR 認められ、M1 は約 70% TAR に達した。

自然水における水中光分解により、スピロメシフェンは M13 (シクロブチル光異性体) 及び M14 (エノール光異性体) に直接光分解した。また、スピロメシフェンの加水分解により、M1 が生成し、続いて分解物 M12 (2-ヒドロキシメチル体) が生成した。また、少量の ¹⁴CO₂ も生成した。(参照 16)

(3) 水中光分解試験（自然水／[phe-¹⁴C]及び[cyc-¹⁴C]スピロメシフェン）

[phe-¹⁴C]スピロメシフェン及び[cyc-¹⁴C]スピロメシフェンを自然水（ドイツマンハイム、ライン川河川水、pH 7.9）に 0.06 mg/L となるように加えた後、25±1°C でキセノンランプ（光強度：949 W/m²、波長：300～800 nm）を 96 時間連続照射して水中光分解試験が実施された。

スピロメシフェンは光照射により分解し、試験終了時には 8.0% TAR となった。推定半減期は 1.1 日（東京の 4～6 月期の太陽光換算で 11 日）であった。

照射区では、試験終了時に 0.6% TAR の揮発性成分と 0.1% TAR の ¹⁴CO₂ が発生した。M1 は処理 48 時間後に 31.8% TAR まで増加し、試験終了時まで維持された。M13 及び M14 も検出され、処理 72 時間後にそれぞれ 8.3 及び 9.3% TAR 認められた。少量分解物として、M12 が処理 24 時間後に 1.9 % TAR 認められ、試験終了時には 9.0% TAR に達した。その他の少量分解物は 7.9% TAR 未満であった。

暗所対照区では、試験終了時に親化合物が 37.1% TAR、M1 が 54.1% TAR 確認された。

水中光分解試験条件下では、スピロメシフェンは M13 及び M14 に直接光分解した。また、スピロメシフェンの加水分解により生成した M1 から、光分解により分解物 M12（2-ヒドロキシメチル体）が生成した。また、少量の ¹⁴CO₂ も生成した。

（参照 17）

(4) 水中光分解試験（緩衝液／[dhy-¹⁴C]スピロメシフェン）

[dhy-¹⁴C]スピロメシフェンを pH 4 の酢酸緩衝液に 0.065 mg/L となるように加えた後、25±1°C でキセノンランプ（光強度：680 W/m²、波長：300～800 nm）を 5 日間連続照射（ただし、暗所対照区は処理 9 日後に試験終了）し、スピロメシフェンの緩衝液での水中光分解試験が実施された。

照射区において、親化合物は試験終了時に 11.1% TAR まで減少した。M13 は処理 3 時間後に 1.2% TAR 生成し、試験終了時に 35.8% TAR まで増加した。M14 は、処理 1 日後に 12.3% TAR 存在し、試験終了時には 36.6% TAR まで増加した。M1 は試験終了時に 12.3% TAR まで増加した。

暗所対照区では、親化合物は試験終了時（処理 9 日後）に 79.7% TAR 認められた。M1 が検出された唯一の分解物であり、試験終了時に 13.9% TAR 検出された。

本試験条件下でのスピロメシフェンの推定半減期は 1.7 日、暗所対照区での推定半減期は 23.1 日と考えられた。4～6 月の東京の自然太陽光下における推定半減期は約 12 日と考えられた。

水中光分解試験条件下では、スピロメシフェンは M13 及び M14 に直接光分解した。M1 も生成したが、M1 は照射区及び暗所対照区のいずれからも同程度生成したことから、光分解ではなく加水分解により生成したと推定された。（参照 18）

5. 土壌残留試験

火山灰土・軽埴土（茨城）及び沖積土・埴壌土（高知）を用いて、スピロメシフェン、分解物 M1 及び M3 を分析対象化合物とした土壌残留試験（容器内及び圃場）が実施された。推定半減期は表 8 に示されている。（参照 19）

表 8 土壌残留試験成績

試験	土壌	濃度*	推定半減期（日）	
			スピロメシフェン	スピロメシフェン ＋分解物
容器内 試験	火山灰土・軽埴土	1.2 mg/kg	10	39
	沖積土・埴壌土		11	45
圃場 試験	火山灰土・軽埴土	1,050 g ai/ha	8	16
	沖積土・埴壌土		10	13

*：容器内試験で純品、圃場試験で 22.9%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、スピロメシフェン、代謝物 M1、M2 及び M9（M2 のグルコース抱合体）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。スピロメシフェンの可食部における最高値は、600 g ai/ha で 1 回散布し、最終散布 7 日後に収穫された茶（荒茶）の 14.8 mg/kg であった。また、代謝物 M1 及び M2+M9（含量）の最高値は、いずれも 600 g ai/ha で 1 回散布した茶（荒茶）であり、M1 については、最終散布 7 日後の 8.05 mg/kg、M2+M9 については、最終散布 14 日後の 12.0 mg/kg であった。（参照 20、21、59）

別紙 3 の作物残留試験の分析値を用いて、スピロメシフェン及び代謝物 M1 を暴露評価対象化合物として農産物から摂取される推定摂取量が表 9 に示されている（別紙 4 参照）。

なお、本推定摂取量の算定は、申請された使用方法からスピロメシフェンが最大の残留を示す使用条件で、今回申請されたナズ等を含むすべ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の仮定の下に行った。

表 9 食品中より摂取されるスピロメシフェン及び代謝物 M1（含量）の推定摂取量

	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)
摂取量 (µg/人/日)	137	86.8	140	161

7. 一般薬理試験

マウス、ラット及びウサギを用いた一般薬理試験が実施された。結果は表 10 に示されている。（参照 22）

表 10 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) (投与経路)*	最大無作用量 (mg/kg 体重)	最小作用量 (mg/kg 体重)	結果の概要
中枢神経系	一般状態 (Irwin 法)	SD ラット	雄 5 0、200、 600、2,000 (経口)	2,000	—	影響なし
	自発運動量	ICR マウス	雄 5 0、200、 600、2,000 (経口)	2,000	—	影響なし
	痙攣誘発	ICR マウス	雄 5 0、200、 600、2,000 (経口)	2,000	—	影響なし
	体温	SD ラット	雄 5 0、200、 600、2,000 (経口)	2,000	—	影響なし
循環器系	呼吸数、血圧、 心拍数、 心電図、	NZW ウサギ	雄 3~4 0、200、 600、2,000 (経口)	2,000	—	影響なし
自律神経系	瞳孔径	SD ラット	雄 5 0、200、 600、2,000 (経口)	2,000	—	影響なし
腎機能	尿量 尿中電解質 尿浸透圧	SD ラット	雄 5 0、200、 600、2,000 (経口)	2,000	—	影響なし

*：溶媒として 2%クレモホア溶液が用いられた。

—：最小作用量が設定できない。

8. 急性毒性試験

(1) 急性毒性試験

スピロメシフェンの急性毒性試験が実施された。結果は表 11 に示されている。
(参照 23~25)

表 11 急性毒性試験結果概要 (原体)

投与経路	動物種	LD ₅₀ (mg/kg 体重)		観察された症状
		雄	雌	
経口*	Wistar ラット 雌雄各 3 匹	>2,500	>2,500	症状及び死亡例なし
経皮	Wistar ラット 雌雄各 5 匹	>2,000	>2,000	症状及び死亡例なし
吸入	Wistar ラット 雌雄各 5 匹	LC ₅₀ (mg/L)		立毛 死亡例なし
		>4.87	>4.87	

*：脱塩水に懸濁

スピロメシフェンの代謝物 M1 及び原体混在物 MA の急性経口毒性試験が実施された。結果は表 12 に示されている。(参照 26、27)

表 12 急性毒性試験結果概要 (代謝物及び原体混在物)

被験物質	投与経路*	動物種	LD ₅₀ (mg/kg 体重)	観察された症状
			雌	
代謝物 M1	経口	Wistar ラット 雌 3 匹	1,000	運動低下、歩行失調、痙攣、努力呼吸、流涎及び眼瞼亀裂 2,000 mg/kg 体重で 2 例死亡
原体混在物 MA	経口	Wistar ラット 雌 3 匹	>5,000	症状及び死亡例なし

* : 2%クレモホア EL 加脱塩水に懸濁

(2) 急性神経毒性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 12 匹) を用いた強制単回経口 (原体 : 0、200、700 及び 2,000 mg/kg 体重、溶媒 : 0.5%MC/0.4%Tween80 の脱イオン水) 投与による急性神経毒性試験が実施された。

雌の 2,000 及び 700 mg/kg 体重投与群でそれぞれ 3 及び 1 例に尿の着色が認められたが、それ以外の検体投与の影響と考えられる所見は認められなかった。神経毒性は認められなかった。(参照 28)

9. 眼・皮膚に対する刺激性及び皮膚感作性試験

ヒマラヤンウサギ (雄) を用いた眼刺激性試験及び皮膚刺激性試験が実施された。スピロメシフェンには眼刺激性及び皮膚刺激性は認められなかった。(参照 29、30)

Hartley モルモット (雌) を用いた皮膚感作性試験 (Maximization 法) が実施された。膨疹及び痂皮が認められ、感作率は惹起後 48 時間で 100%、72 時間で 90% であり、皮膚感作性が認められた。(参照 31)

10. 亜急性毒性試験

(1) 90 日間亜急性毒性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 10 匹) を用いた混餌 (原体 : 0、100、500 及び 3,000 ppm : 平均検体摂取量は表 13 参照) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

表 13 90 日間亜急性毒性試験 (ラット) の平均検体摂取量

投与群		100 ppm	500 ppm	3,000 ppm	3,000 ppm*
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	6.3	31.7	204	209
	雌	7.7	36.6	232	246

* : 回復群

3,000 ppm 投与群の雌 3 例に死亡が認められた（うち 1 例は瀕死によりと殺、1 例は事故死）。

各投与群で認められた毒性所見は表 14 に示されている。

3,000 ppm 投与群で脳比重量²増加（雌雄）、副腎絶対重量減少（雄）、心臓絶対重量減少（雄）、精巣比重量増加、脾臓絶対重量減少（雌雄）、腎臓比重量増加（雌雄）が認められたが、これらは低体重に関連したものと考えられた。

本試験において、3,000 ppm 投与群の雄で体重増加抑制等、500 ppm 以上投与群の雌で空腸粘膜上皮細胞質空胞化等が認められたので、無毒性量は雄で 500 ppm（31.7 mg/kg 体重/日）、雌で 100 ppm（7.7 mg/kg 体重/日）であると考えられた。（参照 32）

表 14 90 日間亜急性毒性試験（ラット）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
3,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制 ・ 飲水量減少 ・ TP 延長 ・ WBC 及び Lym 減少、Neu 増加 ・ ALT 及び ALP 増加 ・ T.Chol、TG 及び T.Bil 減少 ・ T₃ 及び T₄ 減少、TBC 及び TSH 増加 ・ 尿量及び Cre 減少 ・ 脾臓内細胞数減少 ・ CD2^{total}、CD5^{total} 及び CD4^{total} 減少 ・ IgA 及び IgG 減少 ・ 脾臓内 B 細胞活性化マーカー増加及び脾臓細胞マクロファージ活性化 ・ 肝比重量増加 ・ 胸腺絶対及び比重量減少 ・ 十二指腸及び空腸粘膜上皮細胞質空胞化 ・ 肝臓の脂肪貯蔵減少（門脈周囲） ・ 甲状腺ろ胞細胞肥大及びコロイド凝集 ・ 胸腺萎縮 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 鼻口部の出血、硬い便、一般状態不良、うずくまり、攻撃性、神経過敏、よろめき歩行、間代性跳躍痙攣 ・ 体重増加抑制 ・ 飲水量減少 ・ TP 延長 ・ ALT、AST 及び ALP 増加 ・ T.Chol 及び TG 減少 ・ TBC 増加、T.Bil 減少 ・ 尿量及び Cre 減少 ・ 尿蛋白及び尿比重増加 ・ CD2^{total}、CD5^{total} 及び CD4^{total} 減少 ・ IgA 及び IgG 減少 ・ 脾臓細胞マクロファージ活性化 ・ 肝比重量増加 ・ 胸腺絶対及び比重量減少 ・ 十二指腸粘膜上皮細胞質空胞化 ・ 腸間膜リンパ節の泡沫細胞 ・ 甲状腺ろ胞細胞肥大及びコロイド凝集 ・ 子宮角低形成 ・ 胸腺萎縮 ・ 脾臓ヘモジデリン及び髓外造血増加 ・ 骨髓脂肪細胞数増加 ・ 副腎好酸性細胞質
500 ppm 以上	500 ppm 以下 毒性所見なし	<ul style="list-style-type: none"> ・ TSH 増加 ・ 空腸粘膜上皮細胞質空胞化
100 ppm		毒性所見なし

(2) 90 日間亜急性毒性試験（イヌ）①

ビーグル犬（一群雌雄各 4 匹）を用いた混餌（原体：0、20、50、250 及び 2,000

² 体重比重量を比重量という（以下同じ）。

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		20 ppm	50 ppm	250 ppm	2,000 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	0.71	1.81	9.19	70.9
	雌	0.78	1.88	9.29	71.4

各投与群で認められた毒性所見は表 16 に示されている。

血漿中エノール体 (代謝物 M1) 濃度を測定した結果、すべての群で検出され用量依存的に増加したが、M1 はいずれの投与群においても定量限界 (5 μM) 未満であった。

250 ppm 投与群で認められた肝薬物代謝酵素の変動 (雄: *N*-DEM、*O*-DEM 及び ECOD 増加、雌: ECOD、ALD 及び EH 増加) 及び肝細胞質の変化は、極めて軽度であり、肝重量にも変化がないことから、生体の適応反応の範囲にとどまるものと判断し、検体投与による毒性影響とは考えられなかった。

本試験において、2,000 ppm 投与群の雌雄で小葉中心性肝細胞変化等が認められたので、無毒性量は雌雄とも 250 ppm (雄: 9.19 mg/kg 体重/日、雌: 9.29 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 33)

表 16 90 日間亜急性毒性試験 (イヌ) で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
2,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ ALP 増加 ・ TBC 増加、T₄ 減少 ・ <i>N</i>-DEM、<i>O</i>-DEM、P450、ECOD、ALD、EH 及び UDPGT 増加 ・ 肝比重量増加 ・ 小葉中心性肝細胞変化 	<ul style="list-style-type: none"> ・ ALP 増加 ・ T₃ 及び T₄ 減少 ・ <i>N</i>-DEM、<i>O</i>-DEM、P450、ECOD、ALD、EH 及び UDPGT 増加 ・ 肝比重量増加 ・ 小葉中心性肝細胞変化
250 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

(3) 90 日間亜急性毒性試験 (イヌ) ②

イヌを用いた 90 日間亜急性毒性試験 [10. (2)] において、最高用量群でも著しい毒性徴候が認められなかったことから、より高用量におけるビーグル犬 (一群雌雄各 4 匹) を用いた混餌 (原体: 0、3,000 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。

表 17 90 日間亜急性毒性試験 (イヌ) の平均検体摂取量

投与群		3,000 ppm	5,000 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	98.4	173
	雌	103	171

各投与群で認められた毒性所見は表 18 に示されている。

いずれの投与群においても、血漿中にスピロメシフェンは認められなかった。主に M1 が認められ、投与後 24 時間以内には血漿中からの減衰はみられず、投与開始 4 週間後においても定常状態には達していなかった。(参照 34)

表 18 90 日間亜急性毒性試験 (イヌ) で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
5,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> 嘔吐 肝絶対及び比重量増加 	<ul style="list-style-type: none"> 嘔吐 GST 低下 肝絶対重量増加
3,000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ALP 増加、T₄ 減少 NDEM、ODEM、P450、ECOD、ALD 及び EH 増加 肝細胞細胞質均質化及び密度増加、び慢性肝細胞肥大 	<ul style="list-style-type: none"> ALP 増加 TSH 増加、T₄ 減少 NDEM、ODEM、P450、ECOD、ALD 及び EH 増加 肝比重量増加 肝細胞細胞質均質化及び密度増加、び慢性肝細胞肥大

(4) 90 日間亜急性神経毒性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 12 匹) を用いた混餌 (原体: 0、100、500 及び 2,000 ppm: 平均検体摂取量は表 19 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 19 90 日間亜急性神経毒性試験 (ラット) の平均検体摂取量

投与群		100 ppm	500 ppm	2,000 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	6.4	31.8	123
	雌	7.9	38.3	149

各投与群で認められた毒性所見は表 20 に示されている。

本試験において、2,000 ppm 投与群の雌雄で体重増加抑制等が認められたので、無毒性量は雌雄で 500 ppm (雄: 31.8 mg/kg 体重/日、雌: 38.3 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 35)

表 20 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

投与群	雄	雌
2,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> 体重増加抑制、摂餌量減少 	<ul style="list-style-type: none"> 攻撃行動 (1 例) 体重増加抑制、摂餌量減少 テイルピンチに対する反応亢進、ハンドリング中の身体緊張増加
500 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

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4匹）を用いた混餌（原体：0、50、400及び4,000 ppm：平均検体摂取量は表21参照）投与による1年間慢性毒性試験が実施された。

表21 1年間慢性毒性試験（イヌ）の平均検体摂取量

投与群		50 ppm	400 ppm	4,000 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	1.4	11.5	109
	雌	1.4	10.8	117

各投与群で認められた毒性所見は表22に示されている。

50 ppm以上投与群の雄及び4,000 ppm投与群の雌で体重増加抑制が認められたが、用量相関性が認められないこと、試験終了時には背景データの範囲内であったことから、毒性学的な意義があるとは考えられなかった。

血漿中からスピロメシフェンは検出されず、急速にM1に代謝されることが示唆された。4,000 ppm投与群でのM1の濃度は、投与24時間以内に減少しなかった。しかし、試験終了時においてM1の血漿中濃度は12週よりも低値を示したことから、スピロメシフェン及びM1の蓄積性は無視できるものと考えられた。

本試験において、4,000 ppm投与群の雌雄で肝細胞質均質化/密度増加等が認められたので、無毒性量は雌雄とも400 ppm（雄：11.5 mg/kg 体重/日、雌：10.8 mg/kg 体重/日）であると考えられた。（参照36）

表22 1年間慢性毒性試験（イヌ）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
4,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ALP 上昇 ・T₄ 減少 ・肝絶対及び比重量増加 ・肝細胞質均質化/密度増加、肝細胞封入体様物形成/空胞化 	<ul style="list-style-type: none"> ・ALP 上昇 ・T₄ 減少 ・肝比重量増加 ・肝細胞質均質化/密度増加、肝細胞封入体様物形成/空胞化
400 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

(2) 1年間慢性毒性試験（ラット）

Wistar ラット（一群雌雄各25匹）を用いた混餌（原体：0、50、125、300及び800 ppm：平均検体摂取量は表23参照）投与による1年間慢性毒性試験が実施された。

表23 1年間慢性毒性試験（ラット）の平均検体摂取量

投与群		50 ppm	125 ppm	300 ppm	800 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	2.6	6.5	15.9	42.4
	雌	3.0	7.6	19.3	51.7

検体投与に関連した死亡率の増加は認められなかった。

各投与群で認められた毒性所見は表 24 に示されている。

800 ppm 投与群の雄で水晶体変性性病変（後囊混濁及び皮質水性裂）が認められたが、ラットを用いた 2 年間発がん性試験[11. (3)]において発現頻度の増加が認められなかったことから、検体投与の影響とは考えられなかった。

検体投与に関連して発生頻度が増加した腫瘍はなかった。

本試験において、300 ppm 以上投与群の雄及び 800 ppm 投与群の雌で甲状腺ろ胞細胞肥大等が認められたので、無毒性量は雄で 125 ppm (6.5 mg/kg 体重/日)、雌で 300 ppm (19.3 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 37)

表 24 1 年間慢性毒性試験（ラット）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
800 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ T₃ 増加、TSH 増加 ・ T.Bil 減少 ・ 肝腫大 ・ 甲状腺コロイド変化 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重増加抑制 ・ T.Bil 減少 ・ TSH 増加 ・ 両側副腎の褐色化 ・ 甲状腺ろ胞細胞肥大及びコロイド変化、副腎束状帯の細胞質好酸性化
300 ppm 以上	・ 甲状腺ろ胞細胞肥大	300 ppm 以下
125 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

(3) 2 年間発がん性試験（ラット）

Wistar ラット（一群雌雄各 50 匹）を用いた混餌（原体：0、50、125、300 及び 800 ppm：平均検体摂取量は表 25 参照）投与による 2 年間発がん性試験が実施された。

表 25 2 年間発がん性試験（ラット）の平均検体摂取量

投与群		50 ppm	125 ppm	300 ppm	800 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	2.5	6.1	14.8	40.0
	雌	3.3	8.2	19.5	53.6

検体投与に関連した死亡率の増加は認められなかった。

各投与群で認められた毒性所見は表 26 に示されている。

剖検により、800 ppm 投与群の雄で肺の部分的暗赤色化が認められたが、病理組織学的検査において関連所見がないこと、用量相関性がないことから、偶発的なものと考えられた。また、800 ppm 投与群の雄で精巣に少数の結節が認められたが、病理組織学的検査においてライディッヒ細胞腺腫の増加が認められないため、毒性学的な意義があるとは考えられなかった。

剖検及び病理組織学的検査において 800 ppm 投与群の雌で子宮拡張及び子宮の結節が増加し、それに伴う腹部膨満が認められた。子宮内腔拡張を示した多くの例

では、分泌物貯留、大きな嚢胞、子宮内膜間質ポリープ等の所見を伴っていた。これらの病変は加齢ラットで好発することが知られているが、これらの病変の発生頻度には用量相関性は認められなかった。さらに、関連性のある変化が卵巣、卵管、膣及び乳腺で認められていないことから、子宮の変化は偶発的なものであると考えられた。

白内障の発現率が雄において対照群よりもわずかに高かったが、用量相関性が認められず、自然発生的な加齢に伴う病変であると考えられた。

検体投与に関連して発生頻度が増加した腫瘍はなかった。

本試験において、800 ppm 投与群の雌雄で体重増加抑制等が認められたので、無毒性量は雌雄とも 300 ppm (雄：14.8 mg/kg 体重/日、雌：19.5 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 38)

表 26 2年間発がん性試験(ラット)で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
800 ppm	・体重増加抑制	・体重増加抑制 ・TSH 増加 ・甲状腺コロイド変化
300 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

(4) 18 カ月間発がん性試験(マウス)

ICR マウス(一群雌雄各 50 匹)を用いた混餌(原体：0、20、140、1,000 及び 2,000 ppm：平均検体摂取量は表 27 参照)投与による 18 カ月間発がん性試験が実施された。

表 27 18 カ月間発がん性試験(マウス)の平均検体摂取量

投与群		20 ppm	140 ppm	1,000 ppm	2,000 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	3.3	21.7	157	335
	雌	3.8	29.9	201	401

各投与群とも死亡率に影響はみられなかった。

各投与群で認められた主な所見は表 28 に示されている。

2,000 ppm 投与群の雌では、子宮の硬さの変化が認められ、対応する病理組織学的変化として子宮内膜嚢胞状過形成が認められた。また、2,000 ppm 投与群の雄 4 例で腎臓の小結節が認められ、顕微鏡学的には腎アミロイドーシスとして、腎表面に認められた結節様変化は慢性腎症として観察された。しかし、これらの病変には統計学的有意差がなく投与に関連した影響とは考えられなかった。

1,000 ppm 以上投与群の雌で副腎比重量増加が認められ、副腎皮質のアミロイドーシスに関連しているものと考えられた。アミロイドーシスは加齢性病変であり、本系統のマウスでは自然発生的に認められる全身性疾患である。アミロイドーシス

を発症した個体数の比較においては有意差が認められなかったことから、検体の影響とは考えられなかった。

腫瘍性病変について、傾向検定で統計学的な有意差がいくつか認められたが、対照群との違いはわずかであり、背景データの範囲内にあるか、あるいは群間比較では統計学的有意差が認められないことから、投与に関連した影響とは考えられなかった。

本試験において、140 ppm 以上投与群の雌雄で副腎束状帯細胞質好酸性化等が認められたので、無毒性量は、20 ppm (雄: 3.3 mg/kg 体重/日、雌: 3.8 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 39)

表 28 18 カ月間発がん性試験 (マウス) で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
2,000 ppm	・体重増加抑制	
1,000 ppm 以上		
140 ppm 以上	・副腎束状帯細胞質好酸性化 ・副腎皮質び慢性脂肪滴減少	・副腎の変色 ・副腎束状帯細胞質好酸性化 ・副腎皮質び慢性脂肪滴減少
20 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

12. 生殖発生毒性試験

(1) 2 世代繁殖試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 25 匹) を用いた混餌 (原体: 0、30、120 及び 500 ppm: 平均検体摂取量は表 29 参照) 投与による 2 世代繁殖試験が実施された。

表 29 2 世代繁殖試験 (ラット) の平均検体摂取量

投与群		30 ppm	120 ppm	500 ppm	
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	P 世代	雄	2.2	8.8	36.6
		雌	3.8	14.2	64.2
	F ₁ 世代	雄	3.3	13.2	76.2
		雌	4.6	18.0	90.9

各投与群で認められた毒性所見は表 30 に示されている。

500 ppm 投与群の F₁ 世代雌において、原始卵胞数増加が認められたが、全身性の毒性による二次的反應であるか、あるいは発育卵胞、成熟卵胞に生物学的意義のある変動はみられないこと、繁殖にも変動が認められないことから、検体投与に関連した変化とは考えられなかった。

500 ppm 投与群の F₁ 離乳児において、包皮分離及び膈開口の遅延が認められたが、この用量において体重が低下したことの結果であると考えられた。

本試験において、親動物では 120 ppm 以上投与群の雌雄 (F₁) で体重増加抑制等、児動物では 120 ppm 以上投与群の雌雄 (F₁、F₂) で体重増加抑制等が認められた

ので、無毒性量は親動物及び児動物で 30 ppm (P 雄 : 2.2 mg/kg 体重/日、P 雌 : 3.8 mg/kg 体重/日、F₁ 雄 : 3.3 mg/kg 体重/日、F₁ 雌 : 4.6 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 40)

表 30 2 世代繁殖試験 (ラット) で認められた毒性所見

投与群		親 : P、児 : F ₁		親 : F ₁ 、児 : F ₂	
		雄	雌	雄	雌
親動物	500 ppm	毒性所見なし	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・甲状腺比重量増加 ・脾絶対及び比重量減少 	<ul style="list-style-type: none"> ・甲状腺比重量増加 ・肝絶対重量減少 ・甲状腺コロイド変化 (凝集) 	<ul style="list-style-type: none"> ・肝比重量増加 ・脾絶対重量減少 ・甲状腺ろ胞細胞肥大及びコロイド変化 (凝集)、小葉中心性肝細胞肥大
	120 ppm 以上		120 ppm 以下 毒性所見なし	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・脾絶対重量減少 	・体重増加抑制
	30 ppm			毒性所見なし	毒性所見なし
児動物	500 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・脾比重量増加 ・包皮分離遅延 	<ul style="list-style-type: none"> ・脾比重量増加 ・脾及び胸腺絶対重量減少 ・腔開口遅延 	<ul style="list-style-type: none"> ・脾比重量増加 ・脾及び胸腺絶対重量減少 	<ul style="list-style-type: none"> ・脾比重量増加 ・脾及び胸腺絶対重量減少
	120 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・脾及び胸腺絶対重量減少 	・体重増加抑制	・体重増加抑制	・体重増加抑制
	30 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

(2) 発生毒性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌 25 匹) の妊娠 6~19 日に強制経口 (原体 : 0、10、70 及び 500 mg/kg 体重/日) 投与して発生毒性試験が実施された。

500 mg/kg 体重/日投与群の 4 例に跳躍性痙攣がみられ、その内の 1 例が妊娠 15 日に死亡した。頭部打撲による頭蓋腔出血が死亡の原因と考えられた。

70 mg/kg 体重/日以上投与群で摂餌量減少及び体重増加抑制が認められた。

生存児を有する母動物の割合、着床後死胚、胎児数、性比、胎盤重量及び外観に検体投与の影響は認められなかった。

胎児では、毒性所見は認められなかった。

本試験において、母動物では 70 mg/kg 体重/日以上投与群で体重増加抑制等が認められ、胎児では毒性所見が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、胎児で本試験の最高用量 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 41)

(3) 発生毒性試験 (ウサギ)

ヒマラヤンウサギ (一群雌 22 匹) の妊娠 6~28 日に強制経口 (原体 : 0、5、35 及び 250 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、35 mg/kg 体重/日以上投与群で摂餌量減少、糞量減少及び体重増加

抑制がみられた。250 mg/kg 体重/日投与群の 4 例では、耳介の冷感、摂餌量、体重、飲水量、糞便及び尿量の減少を示した後、妊娠 20～25 日の間に流産した。これらの雌の剖検では、2 例に膨満した胃がみられ、このうち 1 例に小腸の淡明化（病理組織学的検査：絨毛先端の著明な空胞形成）が認められた。その他では、耳介の冷感、脱毛、尿量減少とそれに伴う尿の赤色化及び飲水量減少が認められた。

250 mg/kg 体重/日投与群では流産（4 例）及び総吸収胚（2 例）により、生存胎児を有する母動物数の割合の低下がみられた。

胎盤重量及び外観、着床後死胚数、生存胎児数、胎児の性比及び胎児体重に投与の影響は認められなかった。

胎児では、毒性所見は認められなかった。

本試験において、母動物では 35 mg/kg 体重/日以上投与群で体重増加抑制等が認められ、胎児では毒性所見が認められなかったため、無毒性量は母動物で 5 mg/kg 体重/日、胎児で本試験の最高用量 250 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 42）

1.3. 遺伝毒性試験

スピロメシフェンの細菌を用いた復帰突然変異試験、チャイニーズハムスター肺由来培養細胞（V79）を用いた染色体異常試験及び前進突然変異試験ならびにマウスを用いた小核試験が実施された。

結果は表 31 に示されているとおり、すべて陰性であった。スピロメシフェンに遺伝毒性はないと考えられた。（参照 43～46）

表 31 遺伝毒性試験概要（原体）

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、TA102、 TA1535、TA1537 株)	16～5,000 µg/プレート (+/-S9)	陰性
	染色体異常試験	チャイニーズハムスター 肺由来培養細胞（V79）	1～10 µg/mL (-S9) 10～40 µg/mL (+S9)	陰性
	前進突然変異試験	チャイニーズハムスター 肺由来培養細胞（V79）	1～25 µg/mL (-S9) 10～95 µg/mL (+S9)	陰性
<i>in vivo</i>	小核試験	NMRI マウス（骨髄細胞） （一群雄 5 匹）	100、200、400 mg/kg 体重/日 （腹腔内投与、1 日 1 回、2 日間）	陰性

注) +/-S9：代謝活性化系存在下及び非存在下

代謝物 M1 及び原体混在物 MA の細菌を用いた復帰突然変異試験が実施された。結果は表 32 に示されており、すべて陰性であった。（参照 47、48）

表 32 遺伝毒性試験概要（代謝物及び原体混在物）

被験物質	試験	対象	処理濃度	結果
代謝物 M1	復帰突然 変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、TA102、 TA1535、TA1537 株)	16～5,000 µg/プレート (+/-S9)	陰性
原体混在物 MA	復帰突然 変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、TA102、 TA1535、TA1537 株)	16～5,000 µg/プレート (+/-S9)	陰性

注) +/-S9 : 代謝活性化系存在下及び非存在下