

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

# 農薬抄録

E P N

---

(殺虫剤)

(作成年月日)

(改訂年月日)

平成 29 年 4 月 4 日

---

(作成会社名)

日産化学工業株式会社

---

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

## 目 次

I.	開発の経緯.....	1
II.	物理的・化学的性状.....	2
III.	生物活性.....	19
IV.	適用及び使用上の注意.....	20
V.	残留性及び環境中予測濃度算定関係.....	22
VI.	有用動植物等に及ぼす影響.....	31
VII.	使用時安全上の注意、解毒法等.....	45
VIII.	毒性.....	VIII- 1
1.	原体	
(1)	急性毒性.....	VIII- 8
(2)	皮膚及び眼に対する刺激性.....	VIII- 11
(3)	皮膚感作性.....	VIII- 15
(4)	急性神経毒性.....	VIII- 17
(5)	急性遅発性神経毒性.....	VIII- 25
(6)	90日間反復経口投与毒性.....	VIII- 41
(7)	21日間反復経皮投与毒性.....	VIII- 63
(8)	90日間反復吸入毒性.....	VIII- 66
(9)	反復経口投与神経毒性.....	VIII- 69
(10)	反復投与遅発性神経毒性.....	VIII- 81
(11)	1年間反復経口投与毒性及び発がん性.....	VIII- 96
(12)	繁殖性に及ぼす影響.....	VIII-132
(13)	変異原性.....	VIII-161
(14)	解毒及び生体の機能に及ぼす影響.....	VIII-178
2.	原体中混在物及び代謝物	
(1)	急性毒性.....	VIII-194
3.	製剤	
3-1.	45%乳剤	
(1)	急性毒性.....	VIII-195
(2)	皮膚及び眼に対する刺激性.....	VIII-200
(3)	皮膚感作性.....	VIII-204
3-2.	1.5%粉剤	
(1)	急性毒性.....	VIII-206
(2)	皮膚及び眼に対する刺激性.....	VIII-211
(3)	皮膚感作性.....	VIII-215
IX.	動植物及び土壌における代謝分解.....	IX- 1
〔附〕	E P Nの開発年表.....	附- 1

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

## I. 開発の経緯

EPNは、有機リン系殺虫剤として、1949年（昭和24年）米国デュポン社によって開発された化合物である。国内では、昭和26年に、デュポン社によりEPN水和剤が輸入され、農林省四国農業試験場でニカメイチュウ幼虫に対する殺虫試験が開始された。当時輸入されたEPN水和剤は物性が悪く、効力が劣ったため、日産化学工業株式会社は製剤研究を行い、EPN粉剤およびEPN乳剤を実用化した。

EPN粉剤および乳剤の作用特性はやや遅効性ではあるが、残効性が長く、稲、果樹、野菜、豆類、茶などの主要害虫である鱗翅目、半翅目、甲虫目、双翅目等の害虫に効果を示すことが確認された。当社のEPN粉剤およびEPN乳剤は昭和30年に農薬登録された。また、EPN原体の国内製造については、昭和33年にコンチネンタル・オイル社からの技術導入が許可され、昭和34年から当社で本格操業に入った。本剤は、適用作物、害虫適用範囲も広く、汎用性があったため、広く使用された。現在でも本剤は、他剤では防除が困難な水稻のアワヨトウ、野菜のヨトウムシといった大型鱗翅目害虫に対し確実な効果があり、また安価であるという特徴を有するため、散布時被暴の比較的少ない水稻および野菜分野の特効薬として安定して使用され、農業に貢献してきている。

米国へは昭和46年よりEPN原体を丸紅株式会社を通して輸出を開始した。その後米国でのData Call Inが昭和59年9月、昭和60年5月にあったため、日本におけるデータ整備も考慮し、当社独自に慢性毒性試験等の毒性試験を実施した。しかしながら、ピレスロイド剤の出現により、昭和60年より輸出実績がなくなったなかで、米国現地での残留試験実施を含む第3次Data Call Inが出されたため、経済性の面から、昭和62年3月に自主的に登録を取り下げた。現在、その他の国も含め、海外における登録及び販売はない。

本剤の安全性評価については、食品衛生法による残留基準が昭和45年、昭和46年および昭和53年に告示されている。さらに平成4年4月に環境庁の水質環境基準の要監視項目として0.006 mg/l、平成4年12月には厚生省の水道水の監視項目として0.006 mg/lが設定された。平成5年には水質汚濁に係る登録保留基準が0.06mg/lとして設定されている。これらの基準となるADIは厚生省で実施された試験に基づき0.0023 mg/kg/日が採用されていた。一方、当社は昭和60年以降、59農蚕第4200号に従い、毒性試験を実施し、平成元年7月に試験成績を農林水産省に提出した。その後も米国の新しい神経毒性試験ガイドラインに従った毒性試験を実施してきた。その試験成績は使用時に係る安全性の観点からも評価された。平成15年5月7日開催の薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会毒性部会・残留農薬部会合同部会でADIと基準値が審議され、結果が公表された。同年9月18日開催の第11回食品安全委員会では0.0014 mg/kg/日のADIは妥当との結論が得られ、同年10月27日に開催された第1回食品安全委員会農薬専門調査会で残留基準についても承認された。2017年2月14日開催の第638回食品安全委員会において、ADIは0.0014 mg/kg体重/日、急性参照用量(ARfD)は0.0066 mg/kg体重と設定された。

なお、WHO、FAO等の国際的機関での安全性評価は実施されていない。

## II. 物理的・化学的性状

### 1. 有効成分の名称及び化学構造

#### (1) 一般名

和名：E P N

英名：E P N

#### (2) 別名

商品名：E P N

試験名：E P N

#### (3) 化学名

*O*-エチル=*O*-4-ニトロフェニル=フェニルホスホチオアート

*O*-ethyl *O*-4-nitrophenyl phenylphosphonothioate (IUPAC名)

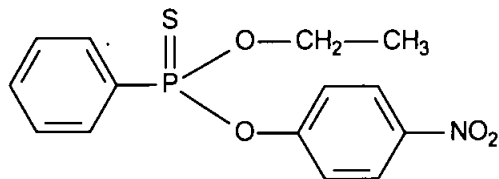
*O*-エチル=*O*-(4-ニトロフェニル)=フェニルホスホチオアート

*O*-ethyl *O*-(4-nitrophenyl)phenylphosphonothioate (CA名)

エチル<sup>パ</sup>ラニトロフェニルチオ<sup>ヘ</sup>ンゼ<sup>ン</sup>ホスホネート

ethyl *p*-nitrophenylthionobenzenephosphonate (MAFF名)

#### (4) 構造式



(5) 分子式  $C_{14}H_{14}NO_4PS$

(6) 分子量 323.31

(7) CAS NO. 2104-64-5

2. 有効成分の物理的・化学的性状

項目		測定値 (測定条件)	測定方法	試験施設/ 報告年/GLP	
色調		白色	官能法	/ 2001年	
形状		固体 (粉末)			
臭気		イオウ臭			
密度		1.397 g/cm <sup>3</sup> (20℃)	空気比較比重計 OECD 109	/ 2000年/GLP	
融点		34.6~36.0℃	液浴付毛細管法 OECD 102	/ 2001年/GLP	
沸点		278.5℃付近で分解開始のため 測定不能	—	—	
蒸気圧		4.1×10 <sup>-5</sup> Pa以下 (23±1℃)	気体流動法 OECD 104	/ 1987年	
解離定数 (pKa)		構造上解離しないと推定	—	—	
溶解度	水	4.25 mg/l (20℃)	カラム溶出法 OECD 105	/ 2001年/GLP	
	有機溶媒	ヘキサン	22.58 g/l (20℃)	フラスコ法 OECD 105	/ 2001年/GLP
		トルエン	>1000 g/l (20℃)		
		ジクロロメタン	>1000 g/l (20℃)		
		アセトン	>1000 g/l (20℃)		
		酢酸エチル	>1000 g/l (20℃)		
メタノール	151.2 g/l (20℃)				
オクタノール/水分配係数 (log Pow)		5.02以上 (23±1℃)	フラスコ振とう法 OECD 107	/ 1988年	
生物濃縮性		BCF <sub>SS</sub> =1232 (0.01 mg/l) BCF <sub>SS</sub> =975 (0.001 mg/l)	49基局第392号 化審法	/ 1983年	
土壌吸着係数 (K, K' <sub>oc</sub> )		K = 121.25~4698.21 K' <sub>oc</sub> = 15954~460609 (25±1℃)	OECD 106	/ 1990年	
加水分解性		t <sub>1/2</sub> 70.7日 (pH4, 25℃) t <sub>1/2</sub> 22.1日 (pH7, 25℃) t <sub>1/2</sub> 3.5日 (pH9, 25℃)	OECD 111	/ 1992年	
水中光 分解性	滅菌 蒸留水	t <sub>1/2</sub> 12.6時間 (15~25℃ 48~51 W/m <sup>2</sup> , 310~400 nm)	2薬検第955号 暫定実施指針	/ 1992年	
	自然水	t <sub>1/2</sub> 11.2時間 (15~25℃、 48~51 W/m <sup>2</sup> , 310~400 nm)			
安定性	対熱	室温で安定 (278.5℃付近で分解) 図1 (別紙)	DSC OECD 113	/ 2000年/GLP	
	その他	なし	—	—	
スペクトル	UV-VIS	図2~4 (別紙)	OECD 101	/ 2000年/GLP	
	IR	図5 帰属 表1 (別紙)	KBr錠剤法		
	MS	図6 帰属 表2 (別紙)	DI-EI法		
	<sup>1</sup> H-NMR	図7 帰属 表3 (別紙)	—		
	<sup>13</sup> C-NMR	図8 帰属 表4 (別紙)	—		

## 物理的・化学的性状試験の測定条件

### 熱に対する安定性

測定条件：機器：示差走査熱量計 DSC8230（理学電気）

昇温速度：10°C/min.

試料採取量：約5 mg（98.2% 純品）

測定温度範囲：25～450°C

試験雰囲気：窒素（流速 約60 ml/min.）

### スペクトル

#### (1) 紫外可視吸収スペクトル

測定条件：機器：紫外可視自記分光光度計 二光束 UV-2400PC（島津製作所）

セル形状：角形石英セル

光路長（セル長さ）：10.0 mm

スリット幅：2 nm

走査スピード：約42 nm/min.

温度：22°C

試料：7.736×10<sup>-5</sup> mol/l

#### (2) 赤外吸収スペクトル：臭化カリウム錠剤法

測定条件：機器：フーリエ変換型赤外分光光度計 シングルビーム FTS-40（BIO-RAD）

積算回数：64

分解能：4 cm<sup>-1</sup>

#### (3) 質量スペクトル：直接導入電子衝撃イオン化法（DI-EI法）

測定条件：機器：四重極型質量分析計 JMS-AM50（日本電子）

イオン化電圧：70 eV

イオン源温度：200°C

#### (4) 核磁気共鳴スペクトル

測定条件：機器：核磁気共鳴分析計 UNITY INOVA400（バリアン）

溶媒：テトラメチルシラン（TMS）含有重クロロホルム

内部基準物質：TMS

観測周波数                   <sup>1</sup>H-NMR：399.912 MHz   <sup>13</sup>C-NMR：100.568 MHz

パルス繰り返し時間       <sup>1</sup>H-NMR：3.499 sec.   <sup>13</sup>C-NMR：1.500 sec.

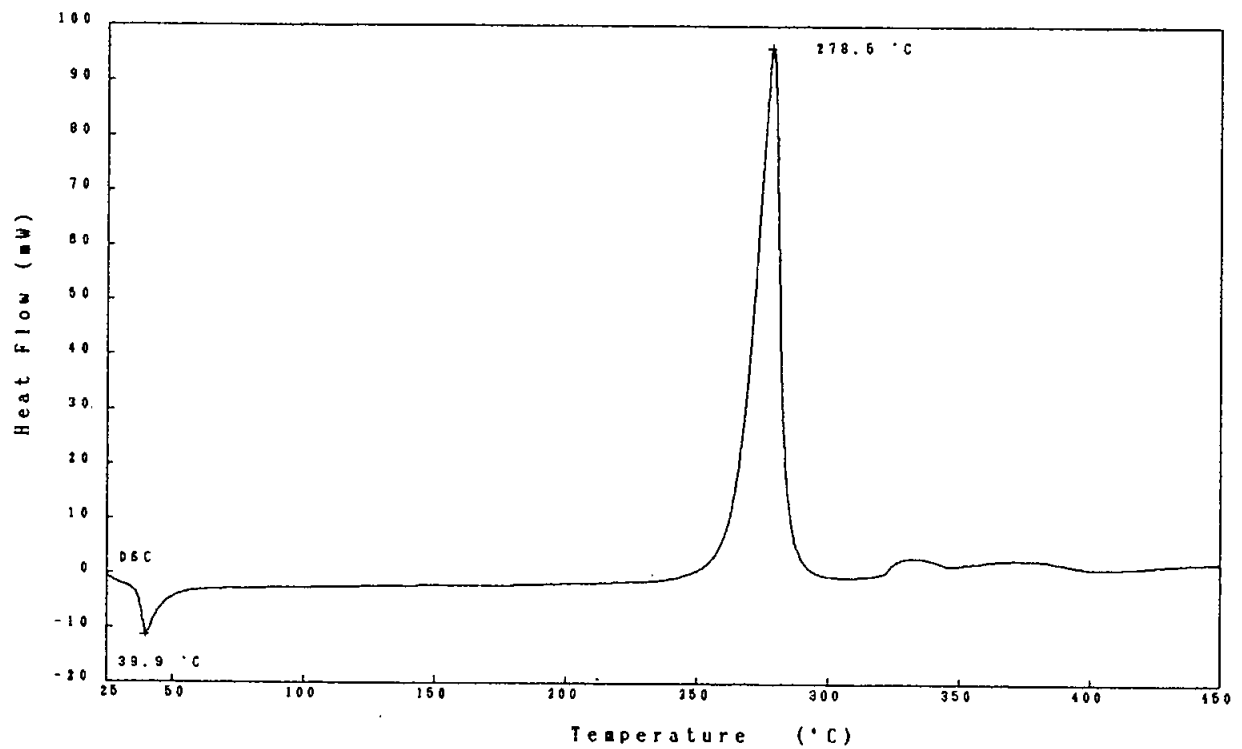


図1 DSC曲線 (窒素雰囲気条件下)

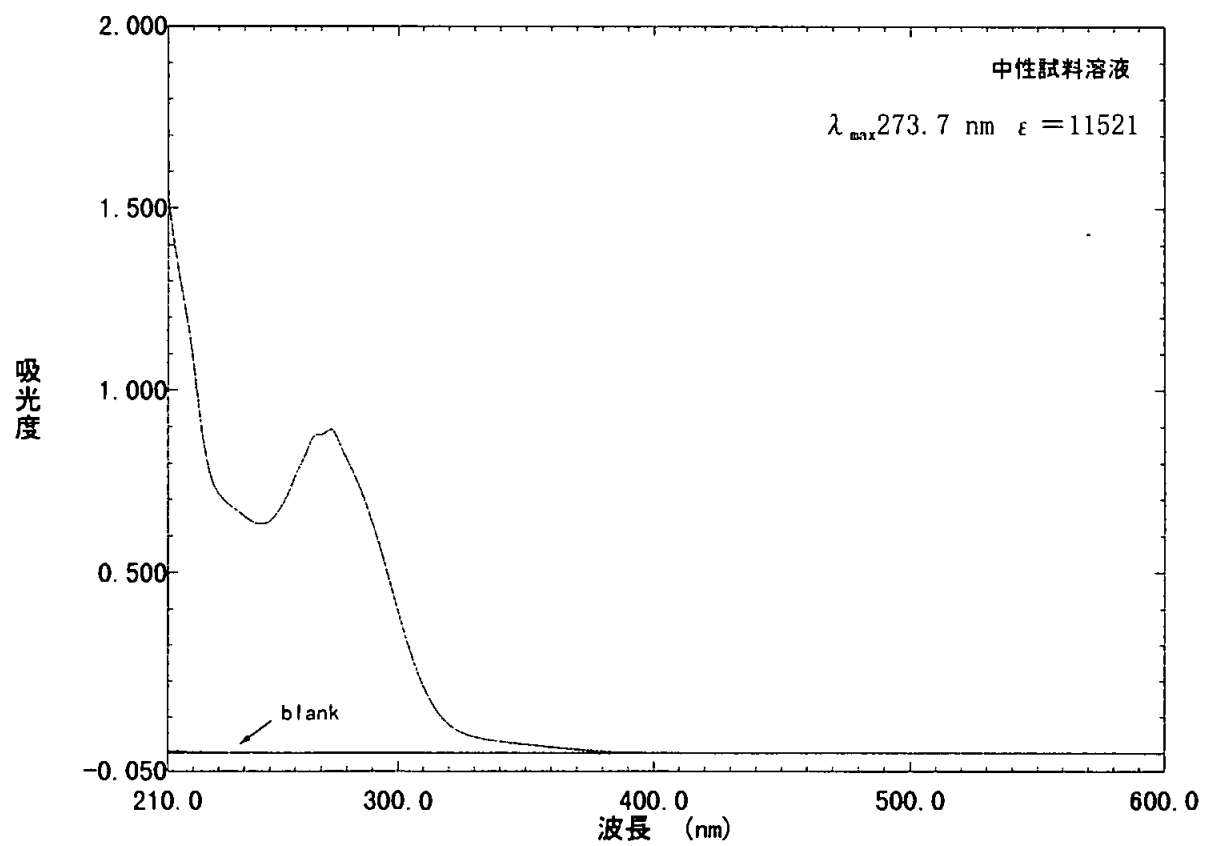


図2 紫外可視吸収スペクトル (中性条件下)

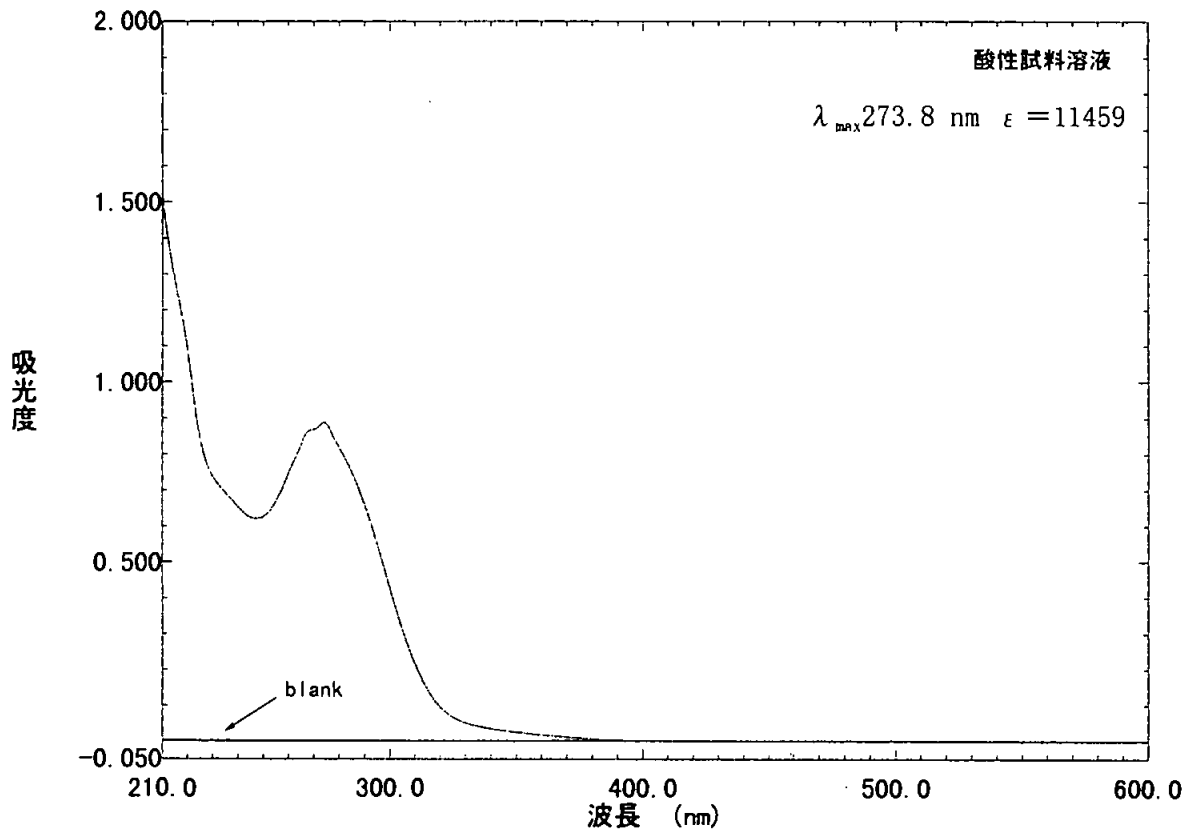


図3 紫外可視吸収スペクトル (酸性条件下)

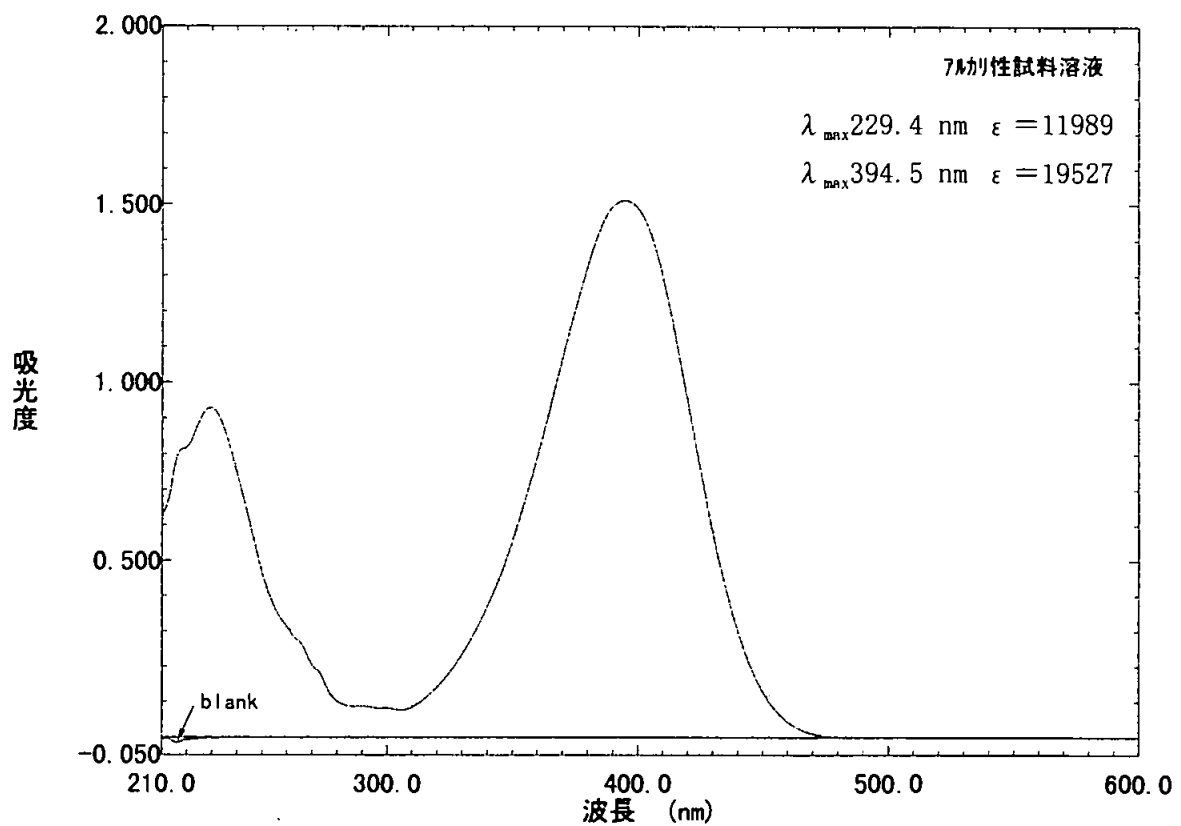


図4 紫外可視吸収スペクトル (アルカリ性条件下)



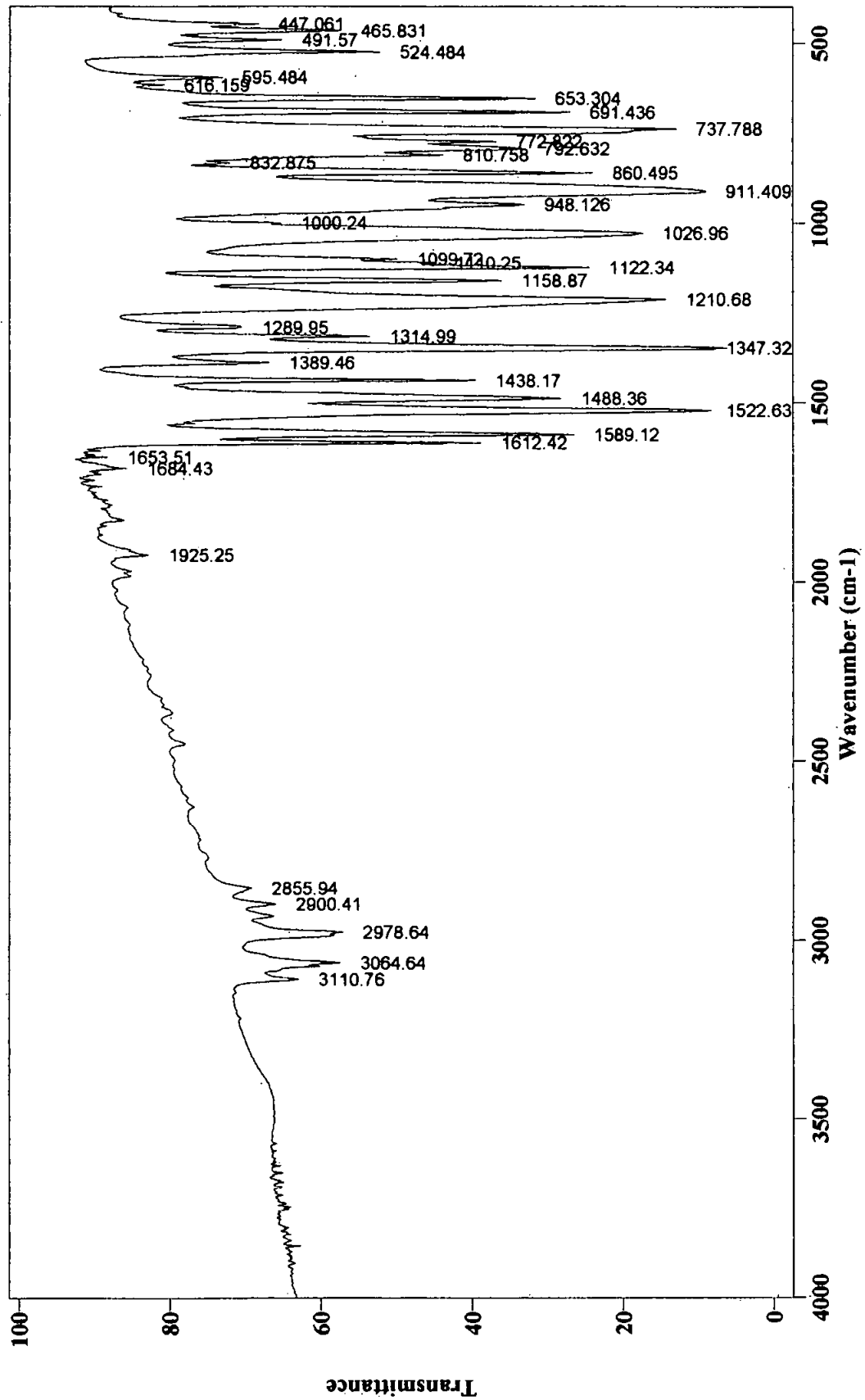
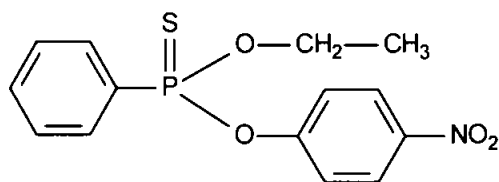


図5 赤外吸収スペクトル

表1 主要な特性吸収帯の位置、帰属及びEPNの構造式

波数 (cm <sup>-1</sup> )	帰属 (推定)
3065~3111	C-H伸縮振動 (芳香族炭化水素)
2856~2979	C-H伸縮振動 (-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> )
1589~1612	C-C環伸縮振動
1523	NO <sub>2</sub> 逆対象伸縮振動
1347	NO <sub>2</sub> 対象伸縮振動
1211	C-O伸縮振動 (-P-O-Ar)
1027	C-O伸縮振動 (-P-O-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )
737.8	P=S伸縮振動



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

Lucy Version 2.31 C:\LUCY\GLP.SPA 08/02/00 14:42:43  
Scan 35-26 BP=157.03[737024] TIC=3141272 RT=00:00:30.42

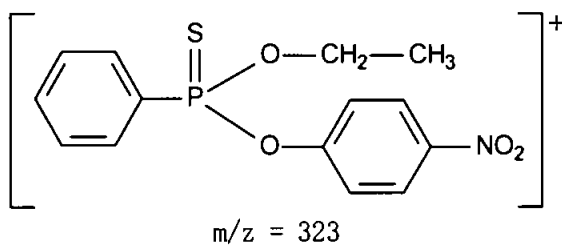
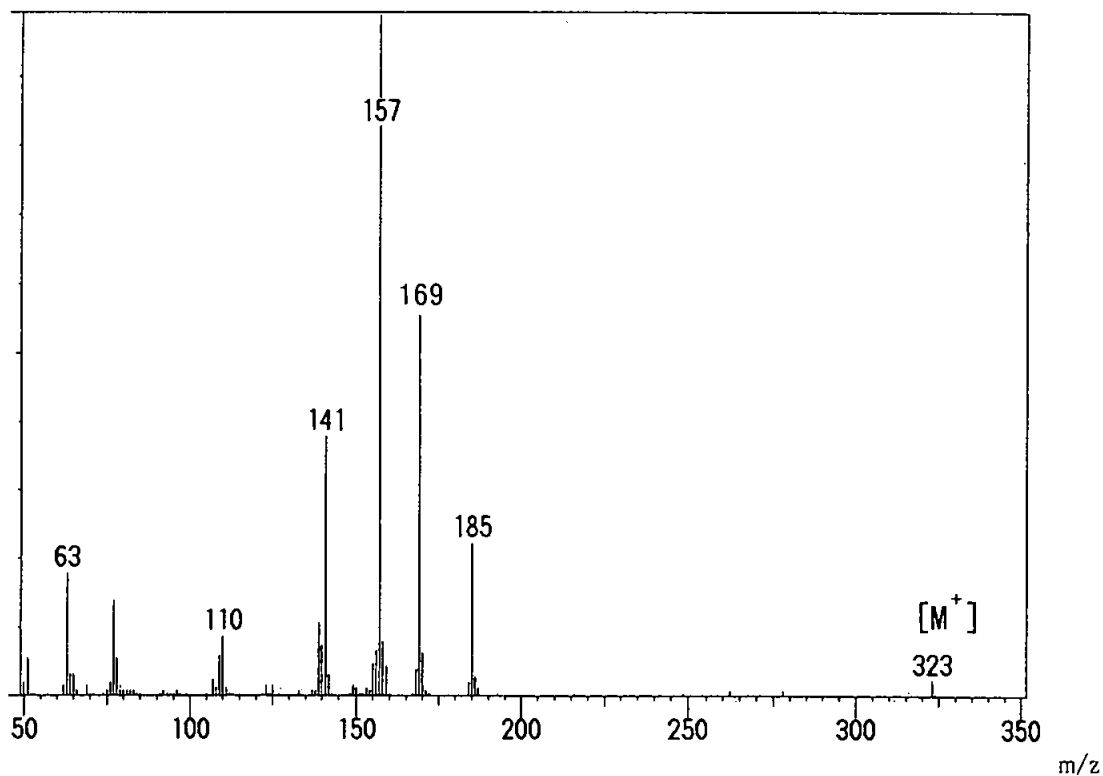
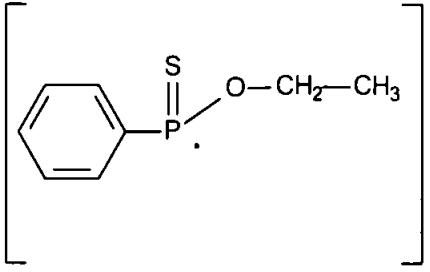
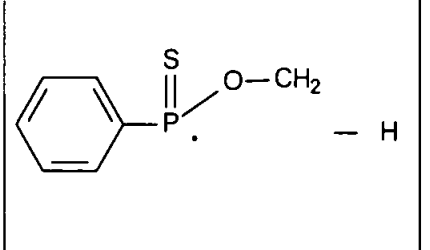
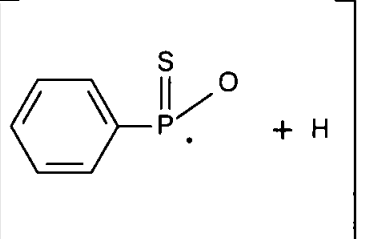
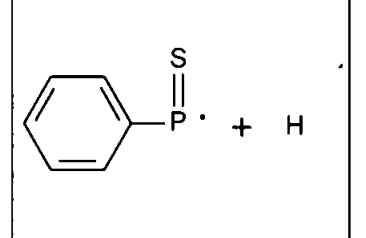
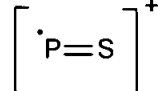


図6 質量スペクトル (DI-EI) 及びEPNの構造式

表2 フラグメントイオンの帰属

m/z	フラグメントイオンの帰属 (推定)
323	分子イオン
185	
169	
157	
141	
63	

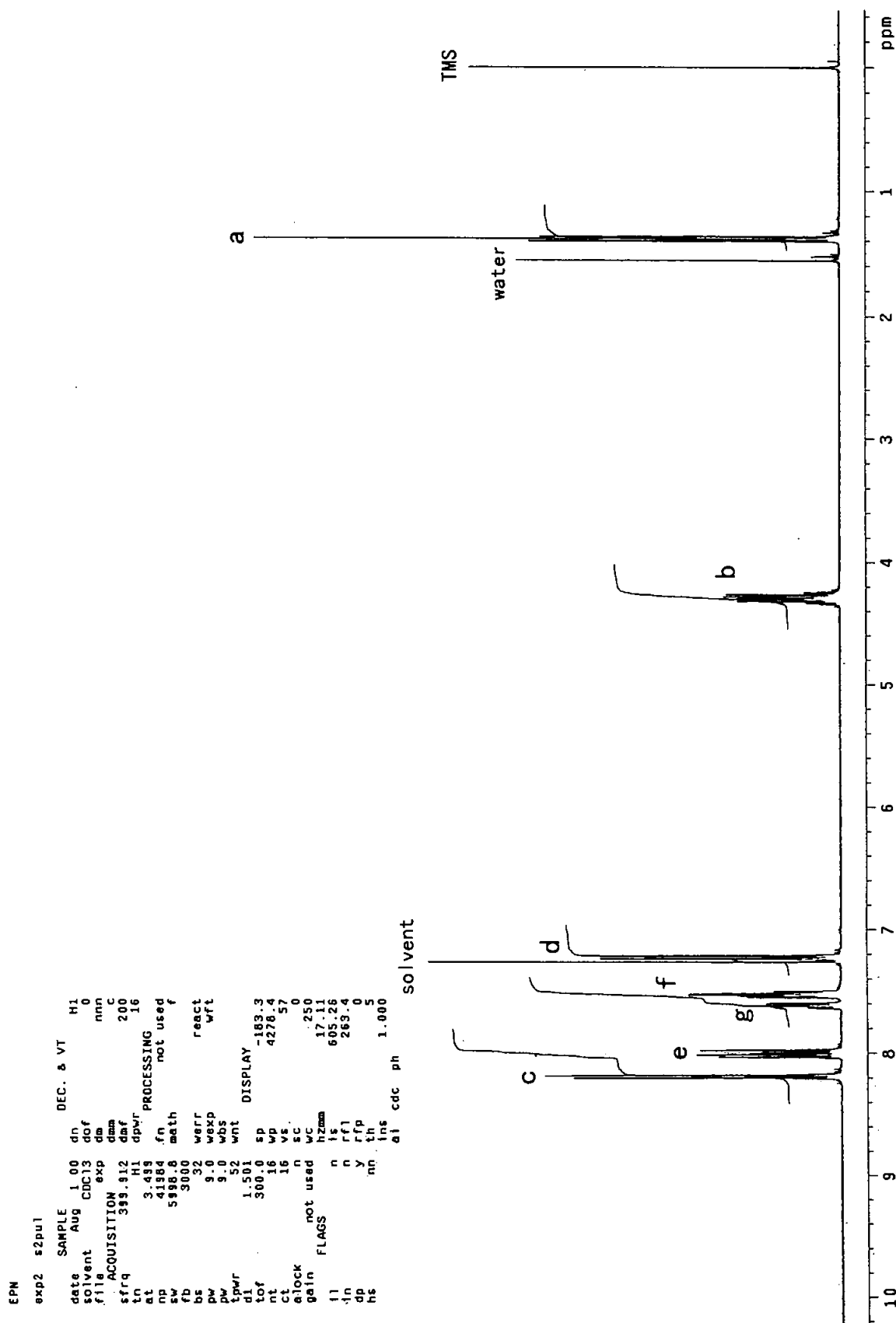
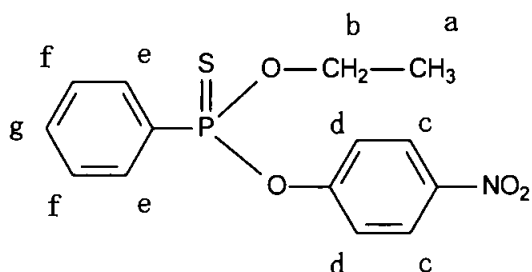


図7 <sup>1</sup>H-核磁気共鳴スペクトル

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

表3  $^1\text{H-NMR}$ のシグナルの帰属及びEPNの構造式

化学シフト (ppm)	多重度	プロトン数	帰属 (推定)
8.19	double doublet	2	c
8.00	multiplet	2	e
7.61	multiplet	1	g
7.52	multiplet	2	f
7.26	singlet	-	溶媒
7.22	double doublet	2	d
4.29	multiplet	2	b
1.55	singlet	-	水
1.38	double triplet	3	a
0.00	singlet	-	TMS



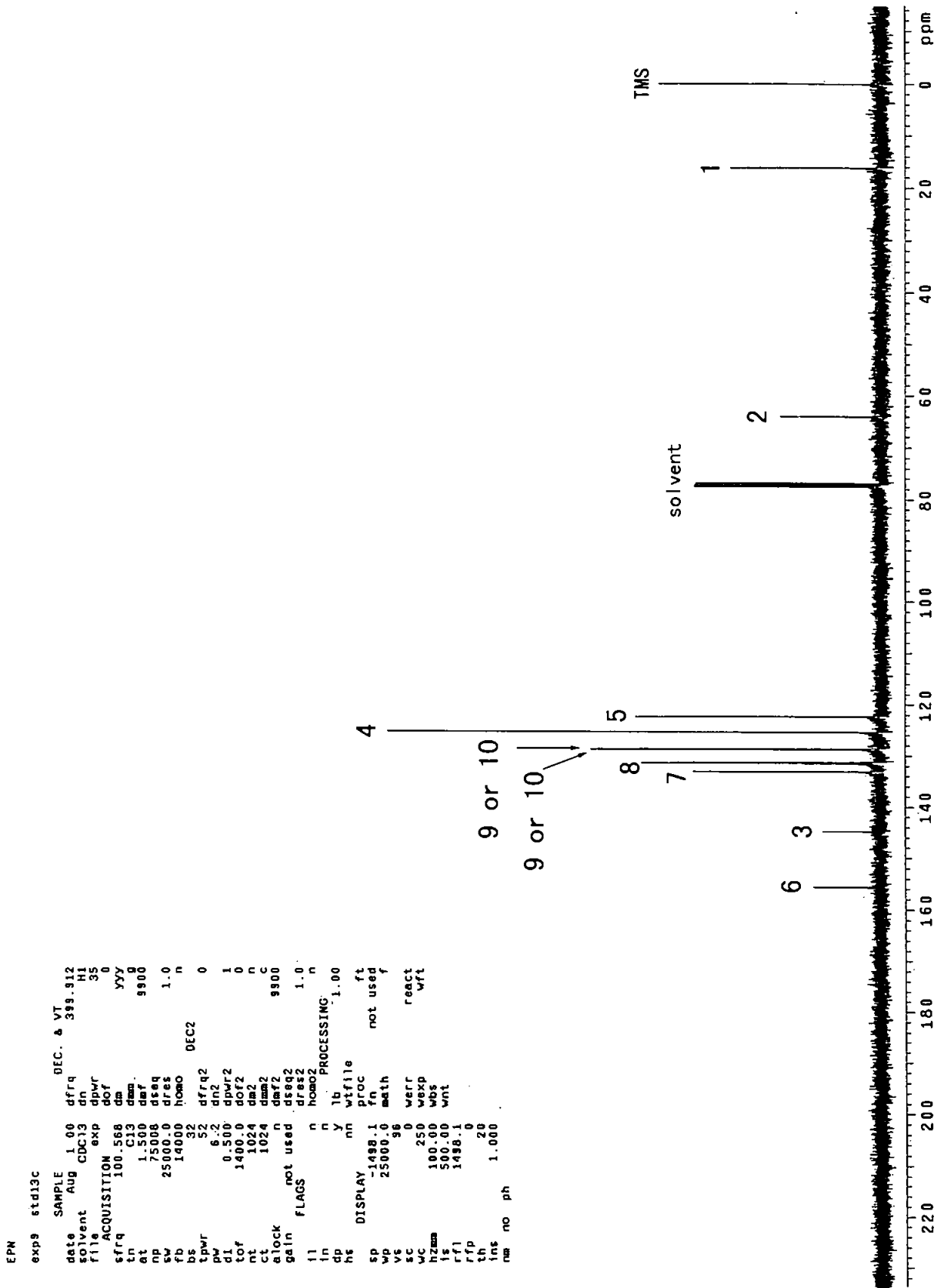
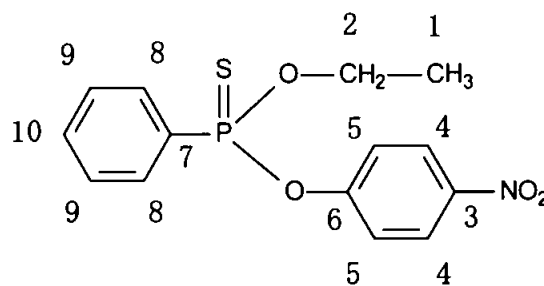


図8  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

表4  $^{13}\text{C}$ -NMRのシグナルの帰属及びEPNの構造式

化学シフト (ppm)	帰属 (推定)
155.6	6
144.7	3
133.0	7
131.2	8
128.7	9 or 10
128.5	9 or 10
125.3	4
122.2	5
77.1	溶媒
63.9	2
16.1	1
0.0	TMS

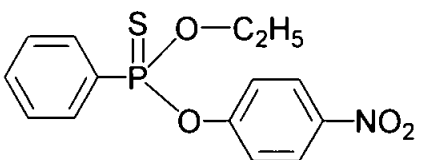




3. 原体の成分組成

区分	名称		構造式	分子式	分子量	含有量 (%)	
	一般名	化学名				規格値	通常値
有効成分	EPN	0-エチル=0-4-ニトロフェニル=フェニルホスホノチオアート	別表①	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>2</sub> PS	323.31		
原体混在物							

別表

	名 称		構造式
	一般名	化学名	
①	EPN	0-エチル=0-4-ニトロフェニル=フェニルホスホノチオアート	

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

別表 (つづき)

	名 称		構造式
	一般名	化学名	

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

#### 4. 製剤の組成

45.0%乳剤 (E P N乳剤)

E P N	45.0%
-------	-------

乳化剤、有機溶剤 等	55.0%
------------	-------

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

### III. 生物活性

#### 1. 活性の範囲

EPNは稲、小麦、野菜の広範囲の害虫に対し有効である。

EPNの殺虫スペクトラムは以下のようなものである。

鱗翅目害虫：ニカメイチュウ、サンカメイチュウ、アワノメイガ、ハイマダラノメイガ、アワヨトウ、ヨトウムシ、イネツトムシ、シクイムシ類、マメシクイガ、ハマキムシ類、モモハモグリガ、アオムシ、ショウガノダイメイチュウ

半翅目害虫：ウンカ類、ツマグロヨコバイ、カメムシ類、カイガラムシ類、アブラムシ類

甲虫目害虫：イネドロオイムシ、コガネムシ類、ゾウムシ類

双翅目害虫：イネハモグリバエ、イネカラバエ、ムギアカタマバエ、タネバエ、タマネギバエ、ネギハモグリバエ、ムギアカタマバエ

アザミウマ目害虫：スリップス類

#### 2. 作用機構

EPNは植物に対し、若干の浸透性を有し、害虫に対し、接触毒、食毒として作用する。

作用機構は他の有機リン系殺虫剤同様に、アセチルコリンエステラーゼ活性を阻害することにより、殺虫活性を発揮する。

#### 3. 作用特性と防除上の利点

殺虫スペクトラムが広く、残効性が長いことから、適期防除により、数種害虫を同時防除でき省力的、経済的である。

殺虫活性が強いことより、老熟幼虫に対しても効力を発揮する。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

#### IV. 適用及び使用上の注意

##### 1. 適用病害虫の範囲及び使用方法

[日産EPN乳剤]

(EPN : 45.0%)

作物名	適用病害虫名	希釈 倍数	使用 液量	使用時期	本剤の 使用回数	使用 方法	EPNを 含む農薬の 総使用回数			
稲	ニカメイチュウ第1世代	1500～ 2000倍	—	収穫60日前まで	1回	散布	1回			
	サンカメイチュウ第1世代 イネクロカメムシ イネカラバエ アワヨトウ	1000倍								
	イネハモグリバエ イネドロオイムシ イネツトムシ ウンカ類 ツマグロヨコバイ	2000倍								
キャベツ (露地栽培)	ゾウムシ類	1000倍		—	収穫14日前まで		2回以内	散布	2回以内	
	アブラムシ類 アザミウマ類 ヨトウムシ アオムシ ダイコンシンクイムシ	1000～ 2000倍								
	ゾウムシ類	1000倍								
カリフラワー (露地栽培) ブロッコリー (露地栽培)	アブラムシ類 アザミウマ類 ヨトウムシ アオムシ ダイコンシンクイムシ	1000～ 2000倍		—	収穫30日前まで		4回以内		散布	4回以内
すいか (露地栽培)	アブラムシ類 ハダニ類									
かぼちゃ (露地栽培)	アザミウマ類									
ねぎ (露地栽培)	タマネギバエ アザミウマ類 ネギハモグリバエ アブラムシ類	1000倍	—	収穫30日前まで	3回以内	散布	3回以内			
しょうが (露地栽培)	ショウガノダイメイチュウ									
かんしょ	ハスモンヨトウ									
			100～ 300 L/10a	収穫3日前まで	2回以内			2回以内		

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

## 2. 使用上の注意事項

[日産E P N乳剤]

(E P N : 45.0%)

- (1) 使用量に合わせ薬液を調製し、使い切ること。
- (2) 雨露などで作物が湿っているときは使用しないこと。
- (3) 石灰硫黄合剤、ボルドー液等アルカリ性薬剤との混用はさけること。
- (4) 稲に使用する場合は、散布後少なくとも3日間は落水、かけ流しはしないこと。
- (5) 施設栽培には使用しないこと。
- (6) ミツバチに対して影響があるので、以下のことに注意すること。
  - ①ミツバチの巣箱及びその周辺にかからないようにすること。
  - ②養蜂が行なわれている地区では周辺への飛散に注意する等、ミツバチの危害防止に努めること。
- (7) 蚕に対して影響があるので、周辺の桑葉にはかからないようにすること。
- (8) 本剤は自動車などに散布液がかかると変色する恐れがあるので、散布液がかからないように注意すること。

## 3. 水産動植物に有毒な農薬については、その旨

[日産E P N乳剤]

- (1) 水産動植物(魚類)に比較的強い影響を及ぼすので、養魚田及び養殖池等周辺での使用は避けること。
- (2) ドジョウ、ボラ、マスには特に影響を及ぼし、又比較的low濃度でも魚が平衡失調等を起こすので注意すること。
- (3) 散布後は河川、養殖池等に流入しないよう水管理に注意すること。
- (4) 水産動植物(甲殻類)に影響を及ぼすので、河川、養殖池等に飛散、流入しないよう注意して使用すること。
- (5) 使用残りの薬液が生じないように調製を行い、使いきること。散布器具及び容器の洗浄水は、河川等に流さないこと。また、空容器、空袋等は水産動植物に影響を与えないよう適切に処理すること。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

V. 残留性及び環境中予測濃度算定関係

1. 作物残留性

(1) 分析法の原理と操作概要

試料をアセトン等で抽出し、nヘキサン/酢酸エチル混液等に転溶する。各種カラムクロマトグラフィー（フロリジルミニカラム、グラファイトカーボンミニカラム、多孔性ケイソウ土カラム、C<sub>18</sub>ミニカラム等）で精製し、ガスクロマトグラフ（FPD、NPD）を用いて定量する。

(2) 分析対象の化合物

親化合物: EPN

化学名: エチルパラニトロフェニルチオノベンゼンホスホネート  
ethyl p-nitrophenylthionobenzenephosphonate

分子式: C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>NPS

分子量: 323.3

代謝経路図中での記号: A

(3) 残留試験結果

作物名 (栽培形態) (分析部位) 年度	剤型 (有効成分量) 希釈倍率又は 使用量、 使用方法	試料調製 場所	使用 回数	経過 日数	分析結果 (ppm)				資料 番号
					公的分析機関		社内分析機関		
					EPN		EPN		
					最高値	平均値	最高値	平均値	
水稻 (玄米) 平成13年度	乳剤 (45%) 1000倍 150L/10a 散布	群馬植防	0	—	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	26
			1	35	0.028	0.026	0.029	0.029	
			1	60	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
			1	75	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
		大分肥料 植防	0	—	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
			1	36	0.165	0.160	0.152	0.151	
			1	60	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
			1	75	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
水稻 (稲わら) 平成13年度	乳剤 (45%) 1000倍 150L/10a 散布	群馬植防	0	—	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	27
			1	35	1.06	1.02	1.81	1.79	
			1	60	0.54	0.52	0.51	0.51	
			1	75	0.07	0.06	0.08	0.08	
		大分肥料 植防	0	—	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	
			1	36	1.95	1.94	0.55	0.55	
			1	60	0.36	0.35	0.50	0.50	
			1	75	0.08	0.08	0.06	0.06	
小麦 (玄麦) 昭和54年度	乳剤 (45%) 1000倍 150L/10a 散布	埼玉植防	0	—	<0.005	<0.005	<0.003	<0.003	4
			2	20	0.188	0.185	0.170	0.159	
			2	27	0.039	0.038	0.034	0.032	
		長崎総農試	0	—	<0.005	<0.005	<0.003	<0.003	
			2	21	0.095	0.092	0.083	0.079	
			2	30	0.021	0.020	0.023	0.022	



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

作物名 (栽培形態) (分析部位) 年度	剤型 (有効成分量) 希釈倍率又は 使用量、 使用方法	試料調製 場所	使用 回数	経過 日数	分析結果 (ppm)				資料 番号
					公的分析機関		社内分析機関		
					EPN		EPN		
					最高値	平均値	最高値	平均値	
かんしょ (塊根) 平成17年度	乳剤 (45%) 1000倍 150L/10a <sup>1)</sup> 200L/10a <sup>2)</sup> 散布	日植防 研究所 <sup>1)</sup>	0	—	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	35
			2	3	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
			2	7	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
		日植防高知 <sup>2)</sup>	0	—	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
			2	3	0.007	0.006	0.009	0.009	
			2	7	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
			2	14	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
キャベツ (葉球) 平成14年度	乳剤 (45%) 1000倍 200L/10a 散布	日植防 研究所	0	—	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	25
			2	14	0.010	0.010	0.022	0.021	
			2	21	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
		長野農総試	0	—	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
			2	14	0.010	0.010	0.017	0.017	
			2	21	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
			2	28	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
カリフラワー (花蕾・茎) 平成2年度	乳剤 (45%) 1000倍 150L/10a <sup>1)</sup> 200L/10a <sup>2)</sup> 散布	千葉 暖地園試 <sup>1)</sup>	0	—	—	—	<0.005	<0.005	15
			2	30	—	—	<0.005	<0.005	
			2	45	—	—	<0.005	<0.005	
		長野 中信農試 <sup>2)</sup>	0	—	—	—	<0.005	<0.005	
			2	30	—	—	<0.005	<0.005	
カリフラワー (花蕾) 平成18年度 <sup>1)</sup> 平成17年度 <sup>2)</sup>	乳剤 (45%) 1000倍 300L/10a 散布	長野植防 南信 <sup>1)</sup>	0	—	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	28
			2	14	0.007	0.006	0.008	0.008	
			2	21	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
		徳島農水 総技センター 農研 <sup>2)</sup>	0	—	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
			2	14	0.022	0.022	0.037	0.036	
			2	21	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
			2	28	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
ブロッコリー (花蕾・茎) 平成2年度	乳剤 (45%) 1000倍 150L/10a <sup>1)</sup> 160L/10a <sup>2)</sup> 散布	三重植防 <sup>1)</sup>	0	—	—	—	<0.005	<0.005	16
			2	30	—	—	<0.005	<0.005	
			2	45	—	—	<0.005	<0.005	
		和歌山植防 <sup>2)</sup>	0	—	—	—	<0.005	<0.005	
			2	30	—	—	<0.005	<0.005	
ブロッコリー (花蕾) 平成17年度	乳剤 (45%) 1000倍 150L/10a <sup>1)</sup> 300L/10a <sup>2)</sup> 散布	日植防高知 <sup>1)</sup>	0	—	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	29
			2	14	0.139	0.135	0.111	0.108	
			2	21	0.060	0.060	0.052	0.052	
			2	28	0.031	0.031	0.018	0.018	
		大分肥料 植防 <sup>2)</sup>	0	—	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
			2	14	0.440	0.433	0.333	0.326	
			2	21	0.109	0.108	0.121	0.116	
2	28	0.029	0.029	0.013	0.012				

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

作物名 (栽培形態) (分析部位) 年度	剤型 (有効成分量) 希釈倍率又は 使用量、 使用方法	試料調製 場所	使用 回数	経過 日数	分析結果 (ppm)				資料 番号
					公的分析機関		社内分析機関		
					EPN		EPN		
					最高値	平均値	最高値	平均値	
ねぎ (根深ねぎ <sup>1)</sup> 、 葉ねぎ <sup>2)</sup> ) (茎葉) 昭和51年度	乳剤 (45%) 1000倍 150L/10a <sup>1)</sup> 120L/10a <sup>2)</sup> 散布	日植防 研究所 <sup>1)</sup>	0	—	<0.008	<0.008	<0.005	<0.005	2
			3	21	<0.008	<0.008	<0.005	<0.005	
			3	31	<0.008	<0.008	<0.005	<0.005	
		兵庫農試 <sup>2)</sup>	0	—	<0.008	<0.008	<0.005	<0.005	
			3	21	0.042	0.040	0.157	0.152	
			3	30	<0.008	<0.008	0.021	0.018	
ねぎ (根深ねぎ) (茎葉) 平成16年度	乳剤 (45%) 1000倍 200L/10a 散布	新潟植防	0	—	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	30
			3	21	0.042	0.040	0.048	0.046	
			3	28	0.006	0.006	0.008	0.008	
			3	35	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
			3	42	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
かぼちゃ (果実) 平成2年度	乳剤(45%) 1000倍 200L/10a 散布	日植防高知	0	—	—	—	<0.005	<0.005	19
			2	30	—	—	0.011	0.011	
			4	30	—	—	<0.005	<0.005	
	乳剤(45%) 1000倍 150L/10a <sup>1)</sup> 100, 150L /10a <sup>2)</sup> 散布	日植防宮崎	0	—	—	—	<0.005	<0.005	
			2 <sup>1)</sup>	30	—	—	0.051	0.051	
			4 <sup>2)</sup>	30	—	—	0.015	0.014	
かぼちゃ (果実) 平成17年度	乳剤 (45%) 1000倍 300L/10a 散布	日植防 研究所	0	—	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	31
			2	21	0.156	0.150	0.094	0.089	
			2	28	0.071	0.068	0.073	0.072	
			2	35	0.066	0.064	0.037	0.036	
		石川植防	0	—	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
			2	21	0.019	0.018	0.006	0.006	
			2	28	0.007	0.006	0.007	0.007	
			2	35	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
かぼちゃ (果実) 平成18年度	乳剤 (45%) 1000倍 300L/10a 散布	長野植防 松代	0	—	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	32
			2	28	0.059	0.057	0.071	0.068	
			2	35	0.042	0.040	0.051	0.050	
			2	45	0.024	0.023	0.022	0.021	
		沖縄 農研センター 宮古島	0	—	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
			2	21	0.097	0.092	0.085	0.084	
			2	28	0.044	0.043	0.033	0.032	
			2	38	0.009	0.008	0.008	0.008	

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

作物名 (栽培形態) (分析部位) 年度	剤型 (有効成分量) 希釈倍率又は 使用量、 使用方法	試料調製 場所	使用 回数	経過 日数	分析結果 (ppm)				資料 番号
					公的分析機関		社内分析機関		
					EPN		EPN		
					最高値	平均値	最高値	平均値	
すいか (露地 <sup>1)</sup> 施設 <sup>2)</sup> (果実 <sup>3)</sup> ) 平成2年度	乳剤(45%) 1000倍 190, 200L /10a <sup>a)</sup> 80~200L /10a <sup>b)</sup>	日植防 研究所 <sup>1)</sup>	0	—	—	—	<0.004	<0.004	18
			2 <sup>a)</sup>	30	—	—	<0.004	<0.004	
			4 <sup>b)</sup>	30	—	—	<0.004	<0.004	
	乳剤(45%) 1000倍 150L/10a	石川砂丘地 農試 <sup>2)</sup>	0	—	—	—	<0.004	<0.004	
			2	30	—	—	<0.004	<0.004	
			4	30	—	—	<0.004	<0.004	
すいか (果実 <sup>3)</sup> ) 平成17年度 <sup>1)</sup> 平成18年度 <sup>2)</sup>	乳剤 (45%) 1000倍 300L/10a <sup>1)</sup> 200L/10a <sup>2)</sup> 散布	石川植防 <sup>1)</sup>	0	—	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	33
			4	3	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
			4	7	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
			4	14	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
		日植防宮崎 <sup>2)</sup>	0	—	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
			4	3	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
			4	7	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
			4	14	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
3) 果皮を除去したもの									
メロン (果実 <sup>3)</sup> ) 昭和51年度	乳剤(45%) 1000倍 300L/10a 散布	茨城鉾田 防除所	0	—	<0.002	<0.002	<0.003	<0.003	3
			3	21	<0.002	<0.002	<0.003	<0.003	
			3	30	<0.002	<0.002	<0.003	<0.003	
		長野 野菜花き試	0	—	<0.002	<0.002	<0.003	<0.003	
			4	21	<0.002	<0.002	<0.003	<0.003	
			4	31	<0.002	<0.002	<0.003	<0.003	
メロン (果実 <sup>3)</sup> ) 平成17年度	乳剤 (45%) 1000倍 300L/10a <sup>1)</sup> 200L/10a <sup>2)</sup> 散布	日植防 研究所 <sup>1)</sup>	0	—	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	34
			4	3	0.008	0.008	0.022	0.022	
			4	7	<0.005	<0.005	0.014	0.014	
			4	14	<0.005	<0.005	0.012	0.012	
		岐阜植防 <sup>2)</sup>	0	—	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
			4	3	0.012	0.012	0.011	0.011	
			4	7	0.007	0.007	0.012	0.012	
			4	14	0.006	0.006	0.009	0.008	
3) 果皮を除去したもの									
しょうが (塊茎) 平成元年度	乳剤(45%) 1000倍 150L/10a 散布	日植防 研究所	0	—	—	—	<0.005	<0.005	9
			1	45	—	—	<0.005	<0.005	
		長野植防 松代	0	—	—	—	<0.005	<0.005	
			1	44	—	—	0.006	0.006	
しょうが (塊茎) 平成10年度	乳剤 (45%) 1000倍 200L/10a 散布	愛知農総試	0	—	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	24
			1	30	0.029	0.028	0.063	0.063	
			1	46	0.011	0.011	0.024	0.024	
			1	60	0.006	0.006	0.006	0.006	
		鹿児島植防	0	—	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	
			1	30	0.016	0.016	0.009	0.009	
			1	45	0.008	0.008	0.008	0.008	
			1	60	0.005	0.005	<0.005	<0.005	

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

## 2. 土壌残留性

### (1) 分析法の原理と操作概要

試料をアセトンで抽出し、ヘキサンに転溶する。アルミナカラムで精製し、ガスクロマトグラフ (FPD) を用いて定量する。

### (2) 分析対象の化合物

親化合物: EPN

化学名: エチルパラニトロフェニルチオノベンゼンホスホネート  
ethyl *p*-nitrophenylthionobenzenephosphonate

分子式: C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>4</sub>PS

分子量: 323.31

代謝経路図中での記号: A

### (3) 残留試験結果

#### ① 容器内試験

推定半減期 栃木水田土壌: 3日

埼玉水田土壌: 3日

栃木畑土壌: 16日

愛知畑土壌: 6日

分析機関:

試料調製及び採取場所	被験物質の処理方法	使用回数	経過日数	分析値 (mg/kg)	
				最高値	平均値
栃木県 農業試験場 (宇都宮市) 火山灰埴壤土 水田 昭和47年度	原体 5mg/kg 250 μg/50g 30 °C	0	-	<0.005	<0.005
		1	0	4.92	4.91
		1	3	3.06	3.05
		1	10	2.05	2.02
		1	30	<0.005	<0.005
農水省 農事試験場 (埼玉県鴻巣市) 沖積埴壤土 水田 昭和47年度	原体 5mg/kg 250 μg/50g 30 °C	0	-	<0.005	<0.005
		1	0	4.82	4.82
		1	3	2.84	2.82
		1	10	0.668	0.638
		1	30	0.090	0.086
栃木県 農業試験場 (宇都宮市) 火山灰埴壤土 畑地 昭和47年度	原体 5mg/kg 250 μg/50g 30 °C	0	-	<0.005	<0.005
		1	0	4.42	4.42
		1	3	3.05	3.04
		1	10	2.54	2.53
		1	30	1.63	1.62
農水省 野菜試験場 (愛知県武豊町) 洪積砂壤土 畑地 昭和47年度	原体 5mg/kg 250 μg/50g 30 °C	0	-	<0.005	<0.005
		1	0	4.12	4.11
		1	3	3.80	3.80
		1	10	1.16	1.16
		1	30	0.922	0.912

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

②圃場試験

推定半減期 埼玉水田土壌：5日  
 茨城水田土壌：1日以内  
 小平畑土壌：15日  
 茨城畑土壌：17日

分析機関：

試料調製及び採取場所	被験物質の処理方法	使用回数	経過日数	分析値 (mg/kg)	
				最高値	平均値
埼玉県 農業試験場 (熊谷市) 沖積壇壤土 水田 昭和47年度	乳剤 (45%) 1000 倍希釈 200ℓ/10a	0	-	<0.003	<0.003
		1	0	0.072	0.070
		1	10	0.020	0.019
		1	20	<0.003	<0.003
		1	30	<0.003	<0.003
茨城県 農業試験場 (土浦市) 沖積砂壤土 水田 昭和47年度	乳剤 (45%) 1000 倍希釈 200ℓ/10a	0	-	<0.003	<0.003
		1	0	<0.003	<0.003
		1	10	<0.003	<0.003
		1	20	<0.003	<0.003
		1	30	<0.003	<0.003
日本植物防疫協会 研究所 (小平市) 火山灰壇壤土 畑地 昭和47年度	乳剤 (45%) 1000 倍希釈 200ℓ/10a	0	-	<0.005	<0.005
		1	0	0.356	0.352
		1	10	0.279	0.274
		1	20	0.133	0.131
		1	30	0.087	0.084
		1	60	0.118	0.114
茨城県園芸試験場 (土浦市) 火山灰壇壤土 畑地 昭和47年度	乳剤 (45%) 1000 倍希釈 200ℓ/10a	0	-	<0.005	<0.005
		1	0	1.75	1.74
		1	10	1.29	1.28
		1	20	0.778	0.770
		1	30	0.288	0.284
		1	60	0.317	0.304

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

### 3. 環境中予測濃度算定関係

#### (1) 水質汚濁性

##### ① 分析法の原理と操作概要

試料をジクロロメタンで抽出する。抽出液を濃縮しアセトンに溶解して、ガスクロマトグラフ (FPD) を用いて定量する。

##### ② 分析対象の化合物

親化合物: EPN

化学名: エチルパラニトロフェニルチオノベンゼンホスホネート  
ethyl *p*-nitrophenylthionobenzenephosphonate

分子式:  $C_{14}H_{14}NO_4PS$

分子量: 323.31

代謝経路図中での記号: A

##### ③ 残留試験結果

分析機関:

試料調製及び採取場所	被験物質の処理方法 濃度・量	使用回数	経過日数	測定値 (mg/ℓ)	
				EPN	
				最高値	平均値
埼玉県 農業試験場 (灰色低地土) 埴壤土 昭和47年度	乳剤(45%) 1000倍希釈 200ℓ/10a	0	—	<0.01	<0.01
		1	0 <sup>1)</sup>	0.19	0.18
		1	1	<0.01	<0.01
		1	2	<0.01	<0.01
		1	3	<0.01	<0.01
日産化学工業(株) 生物科学研究所 (灰色低地土) 埴壤土 昭和47年度	乳剤(45%) 1000倍希釈 200ℓ/10a	0	—	<0.01	<0.01
		1	0 <sup>2)</sup>	2.01	1.98
		1	1	0.17	0.12
		1	2	0.09	0.06
		1	3	0.07	0.05
		1	5	0.02	0.02, <0.01
		1	10	<0.01	<0.01

1): 処理後時間 3~4時間

2): 処理後時間 10分

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。



VI. 有用動植物等に及ぼす影響

1. 水産動植物に対する影響

No.	試験の種類・ 被験物質	供試生物	1群当り の供試数	試験 方法	試験 水温 (°C)	LC <sub>50</sub> 又はEC <sub>50</sub> 値(mg/L) [()内は有効成分換算値]				試験機関 (報告年)	頁
						24h	48h	72h	96h		
1 GLP	魚類急性毒性試験 原体( )	コイ	10	流水	23.0-23.5	>0.200 (>0.185)	0.158 (0.146)	0.129 (0.119)	0.113 (0.104)	(2002年)	34
2 GLP	シノコ類急性 遊泳阻害試験 原体( )	オシノコ	20	半止水	20.0-20.4	0.000514 (0.000475)	0.000225 (0.000208)	-	-	(2002年)	35
3 GLP	ヌエビ <sup>*</sup> 急性 毒性試験 原体( )	メヌエビ <sup>*</sup>	10	半止水	22.8-23.3	>0.000844 *3	0.000370 *3	0.000226 *3	0.000150 *3	(2005年)	36
4 GLP	ヨコエビ <sup>*</sup> 急性 毒性試験 原体( )	ニッポン ヨコエビ <sup>*</sup>	20	半止水	22.9-23.3	>0.0978 *3	0.0639 *3	0.0287 *3	0.0150 *3	(2005年)	37
5 GLP	ユスリカ幼虫 急性毒性試験 原体( )	セシユスリカ	10	半止水	22.8-23.0	0.0405 *3	0.00970 *3	-	-	(2005年)	38
6 GLP	藻類生長阻害試験 原体( )	緑藻*1	初期濃度 10 <sup>4</sup> cells/mL	振とう 培養法	23.5-23.7	ErC <sub>50</sub> (0-72h) : >0.608 *3 EbC <sub>50</sub> (0-72h) : 0.429 *3				(2002年)	39
7 GLP	魚類急性毒性試験 乳剤(45%)	コイ	10	止水	21.5-22.8	0.79	0.62	0.59	0.59	(2003年)	40
8 GLP	シノコ類急性 遊泳阻害試験 乳剤(45%)	オシノコ	20	止水	19.6-20.5	0.0018	0.00076	-	-	(2001年)	41
9 GLP	藻類生長阻害試験 乳剤(45%)	緑藻*1	初期濃度 10 <sup>4</sup> cells/mL	振とう 培養法	23.7-24.0	ErC <sub>50</sub> (24-48h) : 4.73 ErC <sub>50</sub> (24-72h) : 3.63 EbC <sub>50</sub> (0-72h) : 1.37				(2001年)	42
10 GLP	魚類急性毒性試験 粉剤(1.5%)	コイ	10	止水	20.9-22.1	34.4	20.0	17.0	16.2	(2003年)	43
11 GLP	シノコ類急性 遊泳阻害試験 粉剤(1.5%)	オシノコ	20	止水	19.2-19.7	0.061	0.027	-	-	(2001年)	44
12 GLP	藻類生長阻害試験 粉剤(1.5%)	緑藻*1	初期濃度 10 <sup>4</sup> cells/mL	振とう 培養法	23.0-24.0	ErC <sub>50</sub> (24-48h) : 49.9 ErC <sub>50</sub> (24-72h) : 39.0 EbC <sub>50</sub> (0-72h) : 13.2				(2001年)	45

\*1 緑藻の学名 : *Pseudokirchneriella subcapitata* (旧学名 *Selenastrum capricornutum*)

\*3 実測値に基づく

1. 水産動植物への影響に関する試験

(1) 魚類急性毒性試験 (原体)

コイを用いた急性毒性試験

(資料 No. 1)

試験機関:

(GLP 対応)

報告書作成年: 2002 年

被験物質: EPN 原体 (純度 %)

供試生物: コイ (*Cyprinus carpio*)

一群各 10 匹, 全長: 5.2±0.23cm, 体重: 1.5±0.30g

方 法: 暴露期間 ; 96 時間

暴露方法 ; 流水式 (換水率: 約 8 回/日)

供試魚数 ; 10 匹/試験容器/1 連制

希釈水 ; 脱塩素水道水

試験液量 ; 10L/試験容器

水質 ; 溶存酸素濃度 7.3-8.6mg/L (試験水温での飽和濃度の 60%以上)、pH 7.4-7.8

照明 ; 16 時間明/8 時間暗

給餌 ; 無

エアレーション ; 無

試験液の調製方法 ; 必要量の被験物質を秤量し、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させ試験原液を調製した。希釈装置及び定量ポンプにより希釈水と試験原液あるいは DMSO を一定の割合で混合し、マグネティックスターラーで攪拌して連続的に試験液を調製した。

試験水温: 23.0-23.5°C

結 果:

試験濃度 (mg/L)	設定濃度	0.0521、0.0729、0.102、0.143、0.200
	実測濃度	0.0538、0.0771、0.0958、0.128、0.198
LC <sub>50</sub> (mg/L) * [95%信頼限界]	24 時間	>0.200 [算出できず] (>0.185 [算出できず])
	48 時間	0.158 [0.139-0.182] (0.146 [0.128-0.168])
	72 時間	0.129 [0.112-0.148] (0.119 [0.103-0.137])
	96 時間	0.113 [0.0955-0.135] (0.104 [0.0882-0.125])
NOEC (mg/L) *	0.0521 (0.0481)	

\* 設定濃度に基づく。( )内は有効成分換算値で申請者が算出した。

症状 ; 0.102mg/L 以上で体幹の湾曲 (側湾型)、出血及び筋肉痙攣が認められた。

被験物質濃度 ; 試験液中の被験物質濃度は試験開始時では設定濃度に対して 87.8%~110%、試験終了時では 91.2%~105%であり設定濃度の±20%以内に維持されていた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

(2) ズンコ類急性遊泳阻害試験(原体)

(資料 No. 2)  
GLP 対応)

試験機関：  
報告書作成年：2002 年

被験物質：EPN 原体 (純度 %)  
 供試生物：材ズンコ (*Daphnia magna*), 一群各 20 匹 (生後 24 時間以内の個体)  
 方 法：暴露期間 ; 48 時間  
       暴露方法 ; 半止水式 (暴露開始 24 時間後に試験液の全量を交換)  
       供試生物数 ; 5 匹/試験容器/4 連制  
       希釈水 ; 脱塩素水道水  
       試験液量 ; 100mL/試験容器  
       水質 ; 溶存酸素濃度 8.6-8.8mg/L(試験水温での飽和濃度の 60%以上)、pH 7.7-7.9  
       照明 ; 16 時間明/8 時間暗  
       給餌 ; 無  
 試験液の調製方法 ; 必要量の被験物質を秤量し、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させ元試験原液を調製し、さらに DMSO で希釈して各濃度区での 10,000 倍の濃度の試験原液を調製した。濃度区毎に必要な量の試験原液と希釈水を混合、攪拌して試験液を調製し、各試験容器に分割した。

試験水温：20.0-20.4℃

結 果：

試験濃度 (mg/L)	設定濃度	0.000342、0.000751、0.00165、0.00364、0.00800
	実測濃度	0.000302、0.000683、0.00158、0.00374、0.00802
EC <sub>50</sub> (mg/L) * [95%信頼限界]	24 時間	0.000514 [0.000435-0.000615] (0.000475 [0.000402-0.000568])
	48 時間	0.000225 [0.000165-0.000364] (0.000208 [0.000152-0.000336])
NOEC (mg/L) *		0.000751 (0.000694)

\* 設定濃度に基づく。( )内は有効成分換算値で申請者が算出した。

症状 ; 0.00165mg/L 以上で嗜眠状態、遊泳阻害及び活動度の低下が認められ、0.00364mg/L 以上では 100%の遊泳阻害率であった。尚、対照区で遊泳阻害は認められなかった。

被験物質濃度 ; 試験液中の被験物質濃度は試験開始時及び 24 時間後調製時では設定濃度に対して 85.1%~107%、換水前及び試験終了時では 82.1%~112%であり設定濃度の±20%以内に維持されていた。

(3) ヌマヒ<sup>®</sup> 急性毒性試験 (原体)

(資料 No. 3)  
(GLP 対応)

試験機関：  
報告書作成年：2005 年

被験物質：EPN 原体 (純度 %)

供試生物：ヌマヒ<sup>®</sup> (*Neocaridina denticulata*)

一群各 10 匹 (成体と形態的に異なる段階のもので、未抱卵の個体)

全長：1.8±0.067cm、体重：0.058±0.011g

方 法：暴露期間 ; 96 時間

暴露方法 ; 半止水式 (24 時間毎に試験液の全量を交換)

供試生物数 ; 10 匹/試験容器/1 連制

希釈水 ; 脱塩素水道水

試験液量 ; 2.5L/試験容器

水質 ; 溶存酸素濃度 6.9-8.7mg/L (試験水温での飽和濃度の 60%以上)、pH 7.4-7.8

照明 ; 16 時間明/8 時間暗

給餌 ; 無

エアレーション ; 無

試験液の調製方法 ; 必要量の被験物質を秤量し、N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) に溶解させ元試験原液を調製し、さらに DMF で希釈して各濃度区の 10,000 倍の濃度の試験原液を調製した。試験容器に入れた希釈水を攪拌しながら、必要量の試験原液を添加して試験液を調製した。

試験水温：22.8-23.3°C

結 果：

試験濃度 (mg/L)	設定濃度	0.0000953、0.000171、0.000309、0.000556、0.00100
	実測濃度	0.0000879、0.000158、0.000265、0.000462、0.000844
LC <sub>50</sub> (mg/L) * [95%信頼限界]	24 時間	>0.000844 [算出できず]
	48 時間	0.000370 [0.000296-0.000471]
	72 時間	0.000226 [0.000177-0.000290]
	96 時間	0.000150 [0.000119-0.000187]
NOEC (mg/L) *		0.0000879

\* 実測濃度に基づく

症状 ; 0.000158mg/L 以上で平衡喪失、過敏、嗜眠状態、体色明化及び活動度の低下が認められ、0.000158、0.000265 及び 0.000462mg/L で脱皮個体が若干数認められた。

被験物質濃度 ; 試験液中の被験物質濃度は試験開始時及び換水後では設定濃度に対して 83.4%~106%、換水前及び試験終了時では 66.1%~108%であった。被験物質濃度は設定濃度の±20%を超えたため、結果の算出には測定濃度の幾何平均値を用いた。

(4) ヨコエ 急性毒性試験 (原体)

(資料 No. 4)  
(GLP 対応)

試験機関：  
報告書作成年：2005 年

被験物質：EPN 原体 (純度 %)

供試生物：ニッポソコエ (*Gammarus nipponensis*)

一群各 20 匹、外寸：0.035±0.0050cm、体重：0.0015g

方 法：暴露期間 ; 96 時間

暴露方法 ; 半止水式 (24 時間毎に試験液の全量を交換)

供試生物数 ; 10 匹/試験容器/2 連制

希釈水 ; 脱塩素水道水

試験液量 ; 1.0L/試験容器

水質 ; 溶存酸素濃度 8.6-8.9mg/L (試験水温での飽和濃度の 60%以上)、pH 7.7-7.9

照明 ; 16 時間明/8 時間暗

給餌 ; 無

エアレーション ; 無

試験液の調製方法 ; 必要量の被験物質を秤量し、*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) に溶解させ元試験原液を調製し、さらに DMF で希釈して各濃度区の 10,000 倍の濃度の試験原液を調製した。試験容器に入れた希釈水を攪拌しながら、必要量の試験原液を添加して試験液を調製した。

試験水温 : 22.9-23.3°C

結 果 :

試験濃度 (mg/L)	設定濃度	0.00100、0.00316、0.0100、0.0316、0.100
	実測濃度	0.000861、0.00277、0.00957、0.0290、0.0978
LC <sub>50</sub> (mg/L) * [95%信頼限界]	24 時間	>0.0978 [算出できず]
	48 時間	0.0639 [0.0443-0.110]
	72 時間	0.0287 [0.0215-0.0389]
	96 時間	0.0150 [0.0102-0.0235]
NOEC (mg/L) *		0.000861

\* 実測濃度に基づく

症状 ; 0.00277mg/L 以上で嗜眠状態及び活動度の低下が認められた。また、助剤対照区、0.00957、0.0290 及び 0.0978mg/L で脱皮個体が若干数認められた。

被験物質濃度 ; 試験液中の被験物質濃度は試験開始時及び換水後では設定濃度に対して 88.4%~113%、換水前及び試験終了時では 75.3%~96.9%であった。被験物質濃度は設定濃度の±20%を超えたため、結果の算出には測定濃度の幾何平均値を用いた。

(5) ヌシカ幼虫急性毒性試験 (原体)

(資料 No. 5)  
(GLP 対応)

試験機関：  
報告書作成年：2005 年

被験物質：EPN 原体 (純度 %)  
 供試生物：ヌシカ (*Chironomus yoshimatsui*)、一群各 10 匹 (2-3 虫齢幼生)  
 方 法：暴露期間 ; 48 時間  
       暴露方法 ; 半止水式 (24 時間後に試験液の全量を交換)  
       供試生物数 ; 10 匹/試験容器/1 連制  
       希釈水 ; 脱塩素水道水  
       試験液量 ; 500mL/試験容器  
       水質 ; 溶存酸素濃度 8.5-8.7mg/L (試験水温での飽和濃度の 60%以上)、pH 7.9-8.1  
       照明 ; 16 時間明/8 時間暗  
       給餌 ; 無  
       エアレーション ; 無  
 試験液の調製方法 ; 必要量の被験物質を秤量し、*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) に溶解させ元試験原液を調製した。この元試験原液を適宜希釈し、各濃度区の 10,000 倍の濃度の試験原液を調製した。試験容器に入れた希釈水を攪拌しながら、必要量の試験原液を添加して試験液を調製した。

試験水温：22.8-23.0°C

結 果：

試験濃度 (mg/L)	設定濃度	0.000200、0.00200、0.0200、0.200、2.00
	実測濃度	0.000201、0.00198、0.0207、0.199、1.39
LC <sub>50</sub> (mg/L) *	24 時間 : 0.0405 [0.0105-0.179]	
[95%信頼限界]	48 時間 : 0.00970 [0.00250-0.0331]	
NOEC (mg/L) *	0.000201	

\* 実測濃度に基づく

症状 ; 0.00198mg/L 以上で体の萎縮、退色、嗜眠状態及び活動度の低下が認められた。  
 被験物質濃度 ; 試験開始時では設定濃度に対して 69.4%~116%、換水前では 69.4%~103%であった。被験物質濃度は設定濃度の±20%以内を超えたため、結果の算出には測定濃度の幾何平均値を用いた。

(6) 藻類生長阻害試験 (原体)

(資料 No. 6)  
(GLP 対応)

試験機関：  
報告書作成年：2002 年

被験物質：EPN 原体 (純度 %)  
 供試生物：緑藻 *Pseudokirchneriella subcapitata*, ATCC22662 株 (旧学名 *Selenastrum capricornutum*)  
 初期濃度 10<sup>4</sup> cells/mL  
 方 法：暴露期間 ; 72 時間  
 暴露方法 ; 旋回振とう培養 (約 100 回/分)  
 試験培地 ; OECD 推奨培地  
 試験液量 ; 100ml/試験容器/3 連制  
 pH ; 7.5-10.3  
 照明 ; 蛍光灯による連続照明 (4, 100-4, 300 lux)  
 試験液の調製方法 ; 必要量の被験物質を秤量し、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させて、各濃度区の 10,000 倍の濃度の試験原液を調製した。この試験原液を必要量分取し、各試験容器に入れた培地と混合後、約 24 時間旋回振とうして調製した。

培養水温：23.5-23.7°C

結 果：

試験濃度 (mg/L)	設定濃度	0.100、0.316、1.00、3.16、10.0
	実測濃度 (開始時)	0.102、0.296、0.606、0.629、0.672
ErC <sub>50</sub> (mg/L) * [95%信頼限界]		24-48 時間 : >0.621 [算出できず] 24-72 時間 : >0.621 [算出できず]
EbC <sub>50</sub> (mg/L) * [95%信頼限界]		0-72 時間 : 0.448 [0.324-0.621]
NOECr (mg/L) *		24-48 時間 : 0.274 24-72 時間 : 0.274
NOECb (mg/L) *		0-72 時間 : 0.0942

\* 実測濃度 (開始時) に基づく有効成分換算値

被験物質濃度 ; 試験液中の被験物質濃度は試験開始時では設定濃度に対して 6.72%~102%、試験終了時では 6.44%~72.2%であった。被験物質濃度は設定濃度の±20%を超えたため、結果の算出には暴露開始時の測定濃度を用いた。

申請者注)

平均実測濃度 (幾何平均) に基づく結果 (試験責任者が算出)

試験濃度 (mg/L)	設定濃度	0.100、0.316、1.00、3.16、10.0
	平均実測濃度 (有効成分換算値)	0.0829、0.260、0.578、0.656、0.658 (0.0766、0.240、0.534、0.606、0.608)
ErC <sub>50</sub> (mg/L) * [95%信頼限界]		0-72 時間 : >0.608 [算出できず]
EbC <sub>50</sub> (mg/L) * [95%信頼限界]		0-72 時間 : 0.429 [0.302-0.608]
NOECr (mg/L) *		0-72 時間 : 0.606
NOECb (mg/L) *		0-72 時間 : 0.0766

\* 実測濃度 (平均) に基づく有効成分換算値

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

(7) 魚類急性毒性試験 (製剤)

コイを用いた急性毒性試験

(資料 No. 7)

試験機関 :

(GLP 対応)

報告書作成年 : 2003 年

被験物質 : 乳剤 (EPN 45.0%)

供試生物 : コイ (*Cyprinus carpio*)

一群各 10 匹, 平均全長 : 5.2cm, 平均体重 : 1.6g

方 法 : 暴露期間 ; 96 時間

暴露方法 ; 止水式

供試魚数 ; 5 匹/試験容器/2 連制

希釈水 ; 脱塩素水道水

試験液量 ; 10L/試験容器

水質 ; 溶存酸素濃度 66.7-102.9% (飽和濃度に対する割合)、pH 7.0-7.6

照明 ; 16 時間明/8 時間暗

給餌 ; 無

エアレーション ; 24 時間後から緩やかなエアレーション

試験液の調製方法 ; 被験物質を所定量秤量し、希釈水に溶解させ試験原液を調製した。この試験原液を順次希釈し試験液を調製した。

試験水温 : 21.5-22.8°C

結 果 :

試験濃度 (mg/L) *	0.088、0.13、0.20、0.30、0.44、0.67、1.0、1.5
LC <sub>50</sub> (mg/L) * [95%信頼限界]	24 時間 : 0.79 [0.66-0.94] 48 時間 : 0.62 [0.51-0.72] 72 時間 : 0.59 [0.50-0.70] 96 時間 : 0.59 [0.50-0.70]
NOEC (mg/L) *	0.30

\* 設定濃度 (製剤濃度) に基づく

症状 ; 0.67mg/L 以上で平衡失調、0.44mg/L 以上で背曲がり認められた。



(8) ジンコ類急性遊泳阻害試験 (製剤)

(資料 No. 8)  
(GLP 対応)

試験機関：  
報告書作成年：2001 年

被験物質：乳剤 (EPN 45.0%)  
 供試生物：林ジンコ (*Daphnia magna*), 一群各 20 匹 (生後 24 時間以内の個体)  
 方 法：暴露期間 ; 48 時間  
       暴露方法 ; 止水式  
       試験生物数 ; 5 匹/試験容器/4 連制  
       希釈水 ; Elendt M4  
       試験液量 ; 100mL/試験容器  
       水質 ; 溶存酸素濃度 73.7-98.3% (飽和濃度に対する割合)、pH 7.22-8.24  
       照明 ; 16 時間明/8 時間暗、  
 試験液の調製方法 ; 被験物質を所定量秤量し、希釈水に溶解させ試験原液を調製した。この試験原液を順次希釈し試験液を調製した。

試験水温 : 19.6-20.5°C

結 果 :

試験濃度 (mg/L) *	0.000066, 0.00013, 0.00027, 0.0005, 0.001, 0.002, 0.004, 0.008, 0.017, 0.033, 0.066, 0.13, 0.27, 0.05, 0.1 (0.000062, 0.00012, 0.00025, 0.0005, 0.001, 0.002, 0.004, 0.008, 0.016, 0.031, 0.062, 0.12, 0.25, 0.05, 0.1)
EC <sub>50</sub> (mg/L) * [95%信頼限界]	24 時間 : 0.0018 [0.0015-0.0022] (0.0017 [0.0014-0.0021]) 48 時間 : 0.00076 [算出できず] (0.00072 [算出できず])
NOEC (mg/L) *	0.00005 (0.00005)

\* 設定濃度 (製剤濃度) に基づく。原報は  $\mu$ l/l で示されており、申請者が比重 (1.062) を用いて mg/L に換算した。尚、換算前の値を ( ) に示す。

症状 ; 0.0001mg/L 以上で遊泳阻害が認められ、0.0017mg/L 以上では 100%の遊泳阻害率であった。尚、対照区で遊泳阻害は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

(9) 藻類生長阻害試験 (製剤)

(資料 No. 9)

試験機関 :

(GLP 対応)

報告書作成年 : 2001 年

被験物質 : 乳剤 (EPN 45.0%)

供試生物 : 緑藻 *Pseudokirchneriella subcapitata*, ATCC22662 株 (旧学名 *Selenastrum capricornutum*)

初期濃度  $10^4$  cells/mL

方 法 : 暴露期間 ; 72 時間

暴露方法 ; 振とう培養 (約 100 回/分)

試験培地 ; AGP 培地 (濾過滅菌)

試験液量 ; 100mL/試験容器/3 連制

pH ; 7.58-8.06

照明 ; 白色蛍光灯 (400-700nm) による連続照明 (4, 117-4, 216 lux)

試験液の調製方法 ; 被験物質を所定量秤量し、試験培地に溶解させ試験原液を調製した。この試験原液を順次希釈し試験液を調製した。

培養水温 : 23.7-24.0°C

結 果 :

試験濃度 (mg/L) *	0.133、0.27、0.5、1.1、2.1、4.2、8.5 (0.125、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0)
ErC <sub>50</sub> (mg/L) * [95%信頼限界]	24-48 時間 : 4.73 [算出できず] (4.45 [算出できず]) 24-72 時間 : 3.63 [算出できず] (3.42 [算出できず])
EbC <sub>50</sub> (mg/L) * [95%信頼限界]	0-72 時間 : 1.37 [算出できず] (1.29 [算出できず])
NOECr (mg/L) *	24-48 時間 : 0.5 (0.5) 24-72 時間 : 0.5 (0.5)
NOECb (mg/L) *	0-72 時間 : 0.133 (0.125)

\* 設定濃度 (製剤濃度) に基づく。原報は  $\mu$  l/L で示されており、申請者が比重 (1.062) を用いて mg/L に換算した。尚、換算前の値を ( ) に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

(10) 魚類急性毒性試験 (製剤)

コイを用いた急性毒性試験

(資料 No. 10)  
(GLP 対応)

試験機関 :

報告書作成年 : 2003 年

被験物質 : 粉剤 (EPN 1.5%)

供試生物 : コイ (*Cyprinus carpio*)

一群各 10 匹, 平均全長 : 5.4cm, 平均体重 : 1.6g

方 法 : 暴露期間 ; 96 時間

暴露方法 ; 止水式

供試魚数 ; 5 匹/試験容器/2 連制

希釈水 ; 脱塩素水道水

試験液量 ; 10L/試験容器

水質 ; 溶存酸素濃度 62.9-99.0% (飽和濃度に対する割合)、pH 7.2-7.6

照明 ; 16 時間明/8 時間暗

試験液の調製方法 ; 被験物質を所定量秤量し、希釈水に添加して調製した。

試験水温 : 20.9-22.1°C

結 果 :

試験濃度 (mg/L) *	5.9、10、17、29、49、84
LC <sub>50</sub> (mg/L) * [95%信頼限界]	24 時間 : 34.4 [26.1-44.9]
	48 時間 : 20.0 [15.2-29.5]
	72 時間 : 17.0 [13.6-21.3]
	96 時間 : 16.2 [12.9-20.2]
NOEC (mg/L) *	10

\* 設定濃度 (製剤濃度) に基づく

症状 ; 24 時間後に 84mg/L で、48 時間後に 17mg/L で出血が認められた。

(11) ジンコ類急性遊泳阻害試験 (製剤)

(資料 No. 11)  
(GLP 対応)

試験機関：  
報告書作成年：2001 年

被験物質：粉剤 (EPN 1.5%)

供試生物：材ジンコ (*Daphnia magna*)、一群各 20 匹 (生後 24 時間以内の個体)

方 法：暴露期間 ; 48 時間

暴露方法 ; 止水式

試験生物数 ; 5 匹/試験容器/4 連制

希釈水 ; Elendt M4

試験液量 ; 100mL/試験容器

水質 ; 溶存酸素濃度 80.2-105.1% (飽和濃度に対する割合)、pH 6.87-7.96

照明 ; 16 時間明/8 時間暗

試験液の調製方法 ; 被験物質を所定量秤量し、希釈水に溶解させ試験原液を調製した。この試験原液を順次希釈し試験液を調製した。

試験水温 : 19.2-19.7°C

結 果 :

試験濃度 (mg/L) *	0.0078、0.016、0.031、0.062、0.12、0.25、0.5、1.0
EC <sub>50</sub> (mg/L) *	24 時間 : 0.061 [算出できず]
[95%信頼限界]	48 時間 : 0.027 [算出できず]
NOEC (mg/L) *	0.016

\* 設定濃度 (製剤濃度) に基づく

症状 ; 0.031mg/L 以上で遊泳阻害が認められ、0.062mg/L 以上では 100%の遊泳阻害率であった。尚、対照区で遊泳阻害は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

(12) 藻類生長阻害試験 (製剤)

(資料 No. 12)

試験機関 :

(GLP 対応)

報告書作成年 : 2001 年

被験物質 : 粉剤 (EPN 1.5%)

供試生物 : 緑藻 *Pseudokirchneriella subcapitata*, ATCC22662 株 (旧学名 *Selenastrum capricornutum*)

初期濃度 10<sup>4</sup> cells/mL

方 法 : 暴露期間 ; 72 時間

暴露方法 ; 振とう培養 (約 100 回/分)

試験培地 ; AGP 培地 (濾過滅菌)

試験液量 ; 100mL/試験容器/3 連制

pH ; 7.39-7.81

照明 ; 白色蛍光灯 (400-700nm) による連続照明 (4,092-4,207 lux)

試験液の調製方法 ; 被験物質を所定量秤量し、試験培地に溶解させ試験原液を調製した。この試験原液を順次希釈し試験液を調製した。

培養水温 : 23.0-24.0°C

結 果 :

試験濃度 (mg/L) *	0.62、1.2、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0
ErC <sub>50</sub> (mg/L) * [95%信頼限界]	24-48 時間 : 49.9[算出できず] 24-72 時間 : 39.0[31.3-51.3]
EbC <sub>50</sub> (mg/L) * [95%信頼限界]	0-72 時間 : 13.2[算出できず]
NOECr (mg/L) *	24-48 時間 : 5.0 24-72 時間 : 5.0
NOECb (mg/L) *	0-72 時間 : 0.62

\* 設定濃度 (製剤濃度) に基づく

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

## 2. 水産動植物以外の有用生物に対する影響

No.	供試生物	1試験区 当りの 供試虫数	供試薬剤	試験方法 投与方法、投与量、 試験条件等	試験結果	試験実施 機関及び 報告年
1	セイヨウミツバチ (羽化後2~5週齢)	10頭 5連制	原体 ( )	経口毒性 (μg ai/頭) 0.03125~0.5	LD <sub>50</sub> (μg ai/頭) 24時間後: 0.1387 48時間後: 0.1337 影響あり	(2002年)
2	セイヨウミツバチ (羽化後2~5週齢)	10頭 5連制	乳剤 (45%)	イチゴに1,000倍液を散布し、 所定日数後に処理葉を入れた容器に放虫	試験1:春試験 残毒期間:28日以上 試験2:秋試験 残毒期間:14日以内	(2002年)
3	蚕 [春嶺×鐘月] (4齢)	20頭 3連制	乳剤 (45%)	乳剤を希釈し、製剤量で 換算して25μlを人工飼料 (50g)に混ぜ、給餌	死虫率 2日後:100% 影響あり	(2002年)
4	蚕 [春嶺×鐘月] (4齢)	50頭 2連制	乳剤 (45%)	残毒試験 桑に1,000倍希釈液を散布後、 蚕に給餌	安全日数:14日以上	(2002年)
5	キツキコモリガモ (幼体、成体)	1頭 10連制	乳剤 (45%)	虫体を希釈液(450ppm)に 浸漬	LC <sub>50</sub> (ppm) 14日:>450 影響なし	(2005年)
6	オンシツツヤコハチ (成虫)	5~10頭 3連制	原体 ( )	インゲン葉を希釈液 (450ppm)に浸漬後、成虫 を放虫	補正死虫率 1日後:100% 影響あり	(2005年)
	オンシツツヤコハチ (マミー)	50頭 2連制	原体 ( )	虫体を希釈液(450ppm)に 浸漬	補正累積羽化率 5日後:33% 影響あり	
7	チカブリタニ (雌成虫)	5頭 6連制	原体 ( )	希釈液(450ppm)を虫体に 1.7mg/cm <sup>2</sup> で直接散布	補正死虫率 7日後:53.6% 影響あり	(2005年)

## 3. 鳥類に対する影響

No.	試験の種類・ 被験物質	供試生物	1群当り の供試数	投与方法	投与量	LD <sub>50</sub> 又はLC <sub>50</sub> 及び無影響量	観察された 影響等	試験機関 (報告年)
1 GLP *2	急性経口 毒性試験 原体( )	ニワトリ 14ヶ月齢	雌 10	強制経口 投与 (14日間 観察)	0, 20, 35, 61, 107, 188 (mg/kg)	LD <sub>50</sub> :171mg/kg	全投与群で鎮静、 よろめき、激しい 運動後のつまづき 及び起立不能など の症状、107mg/kg 以上で遅発性運動 失調	(1986年)
2 GLP	混餌投与 毒性試験 原体( )	コリンヌラ 12日齢	投与群:10 対照群:20	5日間 混餌投与 (3日間 回復)	0, 12, 37, 111, 333, 1000 (mg/kg 飼料)	LC <sub>50</sub> :289.1mg/kg 飼料 NOEC:111mg/kg 飼料	333mg/kg 飼料以上 で死亡、嗜眠、円 背位/異常姿勢・平 伏、協調運動性失 調等の症状、体重/ 摂餌量減少	(2003年)

\*1 HRC : Huntingdon Research Centre Ltd.

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

## VII. 使用時安全上の注意、解毒法等

### 1. 使用時安全上の注意事項

[日産E P N乳剤]

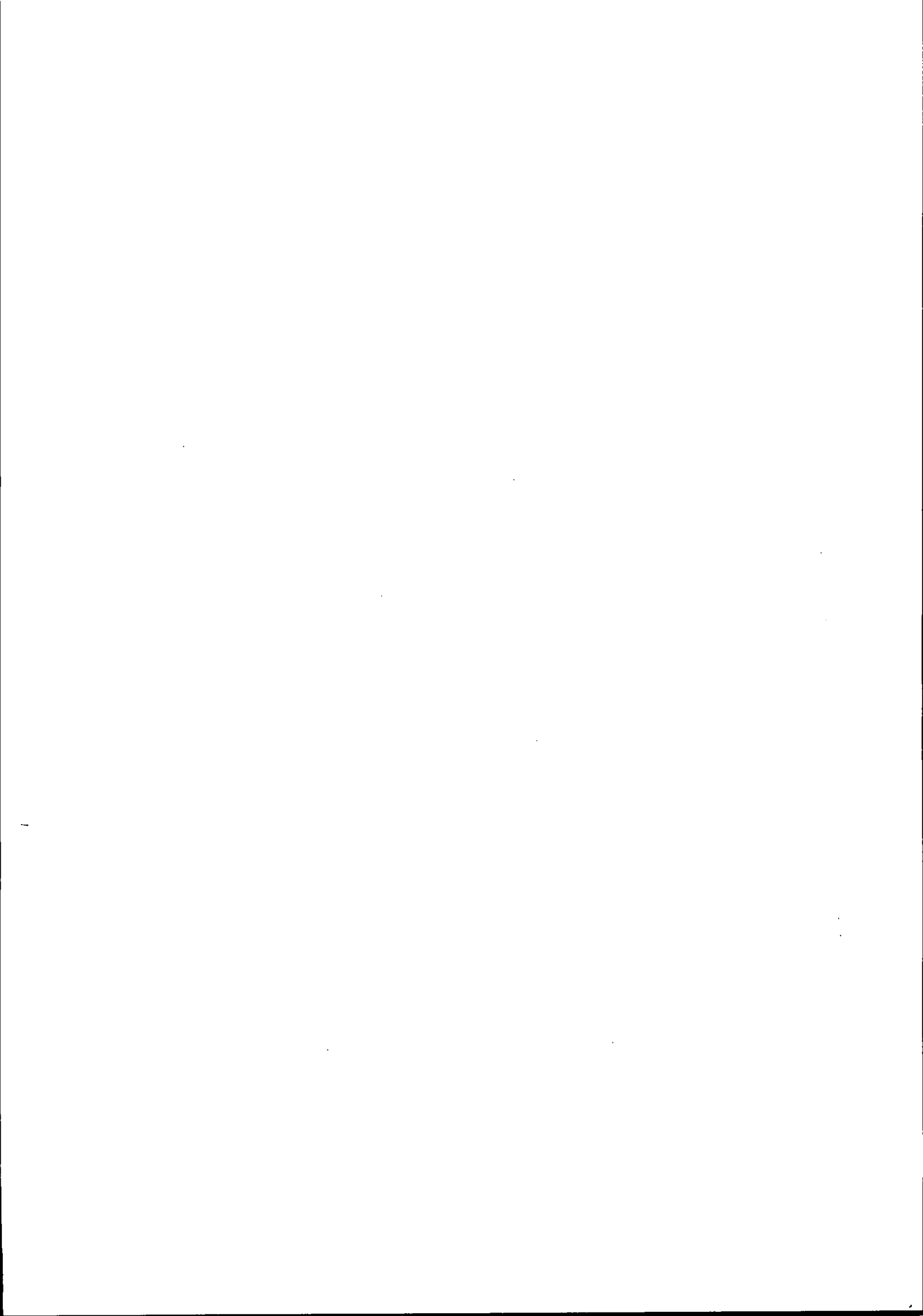
- (1) 医薬用外毒物。取扱いには特に注意すること。  
誤って飲み込んだ場合には吐き出させ、直ちに医師の手当を受けさせること。  
本剤使用中に身体に異常を感じた場合には直ちに医師の手当を受けること。
- (2) 本剤の解毒剤としては動物実験で硫酸アトロピン製剤の単独投与及び硫酸アトロピン製剤とPAM製剤の併用投与が有効であると報告されている。
- (3) 本剤は眼に対して刺激性があるので眼に入らないよう注意すること。眼に入った場合には直ちに水洗し、眼科医の手当を受けること。
- (4) 本剤は皮膚に対して弱い刺激性があるので皮膚に付着しないよう注意すること。  
付着した場合には直ちに石けんでよく洗い落とすこと。
- (5) 散布液調製時及び散布の際は保護眼鏡、防護マスク、不浸透性手袋、不浸透性防除衣などを着用すること。  
作業後は直ちに身体を洗い流し、洗眼・うがいをするとともに衣服を交換すること。
- (6) 作業時に着用していた衣服等は他のものとは分けて洗濯すること。
- (7) かぶれやすい体質の人は取扱いに十分注意すること。
- (8) 同一人が長時間散布に従事しないこと。

### 2. 解毒法及び治療法

解毒剤としては、硫酸アトロピン製剤またはPAM製剤が有効である。

### 3. 製造時、使用時等における事故例

報告例なし。





本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

VIII. 毒性

【毒性試験一覧表】

1. 原体を用いた試験成績

資料 No.	試験の種類 期間	供試動物	1群当り 供試数	投与方法	投与量 (mg/kg)	LD <sub>50</sub> 値または 無毒性量 (mg/kg)	試験機関 (報告年)	頁
I-2 GLP	急性毒性 14日間観察	ラット	雌雄 10	経口	20, 41, 84, 172, 353	雄 36 雌 24	TLL (1987年)	8
I-1 GLP		マウス	雌雄 10	経口	18, 32, 58, 78, 105, 189	雄 94.8 雌 59.4	TLL (1987年)	9
I-3 GLP		ラット	雌雄 10	経皮	雄 1000, 1600, 2560, 3238, 4096, 6554 雌 50, 95, 181, 343, 652, 1238	雄 2850 雌 538	TLL (1987年)	10
II-2 GLP	皮膚刺激性 7日間観察	ウサギ	雌 6	背部皮膚	0.5g/パッチ	わずかな刺激性 あり	TLL (1988年)	11
II-1 GLP	眼刺激性 7日間観察	ウサギ	非洗眼群: 雌 6 洗眼群: 雌 3	眼瞼結膜 嚢内投与	0.1ml/眼	刺激性あり	TLL (1987年)	12
II-6 GLP	皮膚感作性 Buehler 法 31日間観察	モット	雌 10	感作経皮: 25% 惹起経皮: 50, 100%		感作性なし	TLL (1987年)	15
III-6 GLP	急性神経毒性 14日間観察	ラット	雌雄 10	経口	0, 2, 5, 10	2mg/kg で神経系 への最小影響あり 永続的作用なし	LSR (1994年)	17
III-1 GLP	急性遅発性 神経毒性 ①14日間観察 ②29日間観察	ニワトリ	①雌 10 ②雌 40	経口	①LD50 設定; 0, 20, 35, 61, 107, 188 ②神経毒性; 0, 175	①171 ②遅発性神経毒性 症状あり	HRC (1986年)	25
III-2 GLP	急性遅発性 神経毒性 ①21日間観察 ②90日間観察 ③72時間観察 ④72時間観察	ニワトリ	①雌 5 ②雌 5 ③雌 10 ④雌 2-4	経口	①投与量設定; 78, 117, 175, 200 ②回復試験; 0, 175 ③コリンエステラーゼ測定; 88, 175 ④NTE assay; 0, 61, 107, 175	78(III-1~3 総合) ①②>175mg/kg で 遅発性神経毒性症 状、回復性あり ③コリンエステラーゼ値; 投与後低下 8時間後回復 ④NTE 活性; 107mg/kg 以上で 48 時間後に活性低下 72時間までに回復 開始	HRC (1986年)	29
III-3 GLP	急性遅発性 神経毒性 21日間観察	ニワトリ	雌 9-15	経口	0, 150	NTE 活性(脳、脊髄); 低下 脳コリンエステラーゼ値; 低下 遅発性神経毒性症状 あり(2/12例)	LSR (1995年)	35

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

資料 No.	試験の種類 期間	供試動物	1群当り 供試数	投与方法	投与量 (mg/kg)	LD <sub>50</sub> 値または 無毒性量 (mg/kg)	試験機関 (報告年)	頁
IV-4 GLP	反復経口投与 13週間	イヌ	雌雄 4	経口	0, 0.3, 1.0, 3.0	雌雄 1.0 *#	HLA (1986年)	41
IV-2 GLP	反復経口投与 13週間 +回復4週間	ラット	雌雄 10	飼料混入	0, 1, 5, 25, 125 (ppm) 雄 0.06, 0.30, 1.48, 7.34 雌 0.07, 0.38, 1.89, 11.6	雄 1.48 (25ppm) # 雌 1.89 (25ppm) # 雄 0.30 (5ppm) * 雌 0.38 (5ppm) *	HLA (1986年)	46
IV-3	反復経口投与 6ヶ月+回復1ヶ月	ラット	雌雄 15	飼料混入	0, 1, 3, 10, 50, 150, 450 (ppm) 雄 0.06, 0.18, 0.60, 3.10, 9.32, 31.1 雌 0.07, 0.20, 0.69, 3.37, 11.4, -	雄 9.32 (150ppm) # 雌 3.37 (50ppm) # 雄 0.18 (3ppm) * 雌 0.20 (3ppm) *	日産化学 (1977年)	51
IV-1 GLP	反復経口投与 90日間 +回復28日間	マウス	雌雄 10	飼料混入	0, 1, 5, 25, 125 (ppm) 雄 0.19, 0.92, 4.70, 23.9 雌 0.22, 1.18, 5.93, 30.2	雄 4.70 (25ppm) # 雌 5.93 (25ppm) # 雄 0.92 (5ppm) * 雌 1.18 (5ppm) *	HLA (1986年)	59
IV-5 GLP	反復経皮投与 21日間	ラット	雌雄 5	経皮	雄 0, 2.5, 7.5, 25.0, 75.0 雌 0, 0.5, 1.5, 5.0, 15.0	雄 2.5 # 雌 1.5 # 雄 2.5 * 雌 0.5 *	HLA (1985年)	63
IV-6 GLP	反復吸入毒性 13週間	ラット	雌雄 15	吸入	雄 0, 0.093, 0.731, 7.859 雌 0, 0.0094, 0.093, 0.731 (µg/l/日)	雄 0.731 雌 0.093 (µg/l/日)	HLE (1986年)	66
III-7 GLP	反復経口投与 神経毒性 13週間	ラット	雌雄 10	飼料混入	0, 0.5, 2.2, 10.0	雄 2.2 雌 0.5 0.5(III-6,7 総合) 神経毒性あり	LSR (1995年)	69
III-4 GLP	反復投与 遅発性神経毒性 90日間 +回復90日間	ニワトリ	雌 20	経口	0, 0.01, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0	0.5(III-4,5 総合)	HRC (1982年)	81
III-5 GLP	反復投与 遅発性神経毒性 28日間 +回復21日間	ニワトリ	雌 9-12	経口	0, 0.5, 1.0, 2.5, 6.3	1.0	LSR (1995年)	90
V-1 GLP	1年間反復経口 52週間	イヌ	雌雄 4	経口	0, 0.1, 1.0, 3.0	雌雄 1.0 *	HUK (1987年)	96
V-3 GLP	2年間反復経口/ 発がん性 104週間	ラット	雌雄 50	飼料混入	0, 3, 15, 75 (ppm) 雄 0.14, 0.73, 3.63 雌 0.18, 0.91, 4.94	雄 0.73 (15ppm) # 雌 0.91 (15ppm) # 雄 0.14 (3ppm) * 雌 0.18 (3ppm) * 発がん性なし	HLA (1989年)	100

\* 2008年11月開催の食品安全委員会において、赤血球 ChE 活性阻害に基づいて設定された無毒性量。  
# 脳 ChE 活性阻害に基づく無毒性量。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

資料 No.	試験の種類 期間	供試 動物	1群当り 供試数	投与方法	投与量 (mg/kg)	LD <sub>50</sub> 値または 無毒性量 (mg/kg)	試験機関 (報告年)	頁
V-2 GLP	発がん性 78 週間	マウス	雌雄 50	飼料混入	0, 5, 25, 125 (ppm) 雄 0.8, 3.9, 19.6 雌 1.0, 4.8, 24.9	雄 3.9 (25ppm) # 雌 4.8 (25ppm) # 雄 0.8 (5ppm) * 雌 1.0 (5ppm) * 発がん性なし	HLA (1988 年)	118
VI-1 GLP	繁殖毒性 2 世代	ラット	F <sub>0</sub> 雌雄 26 F <sub>1</sub> 雌雄 30	飼料混入	0, 3, 15, 75 (ppm) F <sub>0</sub> 雄 0.2, 1.0, 5.0 F <sub>0</sub> 雌 0.2, 1.2, 6.7 F <sub>1</sub> 雄 0.2, 1.0, 5.6 F <sub>1</sub> 雌 0.3, 1.4, 8.2	一般毒性(親・児); F <sub>0</sub> 雄 1.0 (15ppm) 雌 0.2 (3ppm) F <sub>1</sub> 雄 1.0 (15ppm) 雌 0.3 (3ppm)  繁殖毒性; 繁殖への影響なし	HLA (1988 年)	132
VI-2 GLP	発達神経毒性	ラット	雌 22	経口	0, 0.5, 1.4, 4	1.4 発達神経毒性なし	HLS (1995 年)	138
VI-3 GLP	催奇形性 10 日間	ラット	雌 25	経口	0, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	親 1.2 胎児 2.4 催奇形性なし	HLA (1986 年)	152
VI-4 GLP	催奇形性 13 日間	ウサギ*	雌 15	経口	0, 1, 3, 6, 9	親 1 胎児 3 催奇形性なし	HLA (1986 年)	156
VII-1	変異原性 Ames	サルモネラ菌: TA1535、TA1537、 TA1538、TA98、 TA100 株 大腸菌: WP2hcr <sup>+</sup> 、WP2hcr <sup>-</sup> 株		<i>in vitro</i>	S-9(-); 0, 200, 1000, 5000 S-9(+); 0, 100, 1000 ( $\mu\text{g}/\text{7}^{\circ}\text{レ}$ ト)	陰性	残研 (1976 年)	161
VII-2 GLP	変異原性 Ames	サルモネラ菌: TA1535、TA1537、 TA98、TA100 株		<i>in vitro</i>	0, 4, 20, 100, 500, 2500 ( $\mu\text{g}/\text{7}^{\circ}\text{レ}$ ト)	陰性	MRL (1985 年)	163
VII-1	変異原性 宿主経由	サルモネラ菌: G46 株 マウス		<i>in vivo</i>	0, 5, 10 (2 回投与)	陰性	残研 (1976 年)	165
VII-3 GLP	変異原性 マウスリンフォーム	マウス L5178Y 細胞		<i>in vitro</i>	0, 7.9, 15.7, 31.3, 62.5, 125, 250 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	S-9(-); 陰性 S-9(+); 陽性	MRL (1986 年)	167
VII-4 GLP	変異原性 染色体異常	CHO 細胞		<i>in vitro</i>	0, 625, 1250, 2500, 5000 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	陰性	MRL (1985 年)	169
VII-5 GLP	変異原性 染色体異常	ヒト末梢血リンパ球		<i>in vitro</i>	0, 3.125, 6.25, 12.5, 25 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	陽性	TLL (1987 年)	171
VII-6 GLP	変異原性 小核	マウス	雌雄 5	経口	0, 30	陰性	MRL (1985 年)	173
VII-1	変異原性 Rec-Assay	枯草菌		<i>in vitro</i>	0, 20, 100, 200, 500, 1000, 2000 ( $\mu\text{g}/\text{disk}$ )	陰性	残研 (1976 年)	175
VII-7 GLP	変異原性 UDS	HeLa細胞		<i>in vitro</i>	0, 0.0064, 0.032, 0.16, 0.8, 4, 20, 100, 500 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	陰性	MRL (1985 年)	176

\* 2008 年 11 月開催の食品安全委員会において、赤血球 ChE 活性阻害に基づいて設定された無毒性量。

# 脳 ChE 活性阻害に基づく無毒性量。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

資料 No.	試験の種類 期間	供試動物	1群当り 供試数	投与方法	投与量 (mg/kg)	LD <sub>50</sub> 値または 無毒性量 (mg/kg)	試験機関 (報告年)	頁	
VIII-1	《一般薬理試験》							実医研 (1992年)	178
	一般症状	マウス	雌雄 5	経口	0, 3, 5, 8, 12, 18	5mg/kg 以上で 症状発現 12mg/kg 以上で 死亡例あり			
	脳波	ウサギ	雄 3	腹腔内	2, 5	影響なし			
	自発運動量	マウス	雄 10	経口	0, 3, 5, 8	8mg/kg で 自発運動量増加			
	最大電撃痙攣	マウス	雄 10	経口	0, 3, 5, 8	影響なし			
	Penterazol 痙攣	マウス	雄 10	経口	0, 3, 5, 8	影響なし			
	協調運動 (回転棒法)	マウス	雄 10	経口	0, 3, 5, 8	8mg/kg で影響あり			
	体温	ウサギ	雄 3	経口	0, 12.5, 25, 50	25mg/kg 以上で 体温低下			
	睡眠時間	マウス	雄 10	経口	0, 3, 5, 8	影響なし			
	鎮痛作用	マウス	雄 10	経口	0, 3, 5, 8	影響なし			
	筋弛緩作用 (傾斜板法)	マウス	雄 10	経口	0, 3, 5, 8	8mg/kg で 筋弛緩作用			
	筋弛緩作用 (懸垂法)	マウス	雄 10	経口	0, 3, 5, 8	8mg/kg で 筋弛緩作用			
	呼吸・循環器	ウサギ	雄 6	腹腔内	2, 5	5mg/kg で 心拍数減少			
	瞳孔径	ウサギ	雄 3	経口	0, 12.5, 25, 50	影響なし			
	摘出回腸	モルモット	雄 3	<i>in vitro</i>	0, 10 <sup>-9</sup> ~10 <sup>-3</sup> (g/ml)	影響なし			
	横隔膜神経筋	ラット	雄 3	<i>in vitro</i>	0, 10 <sup>-7</sup> ~10 <sup>-3</sup> (g/ml)	影響なし			
	前脛骨筋収縮	ウサギ	雄 6	腹腔内	2, 5	影響なし			
	小腸輸送能	ラット	雄 6	経口	0, 6, 12.5, 25, 50	12.5mg/kg 以上で 輸送能低下			
	溶血性 (Parpart 法)	ウサギ	雄 2	経口	0, 12.5, 25, 50	影響なし			
血液凝固 (APTT 法)	ウサギ	雄 3	経口	0, 12.5, 25, 50	影響なし				

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

資料 No.	試験の種類 期間	供試動物	1群当り 供試数	投与方法	投与量 (mg/kg)	LD <sub>50</sub> 値または 無毒性量 (mg/kg)	試験機関 (報告年)	頁
VIII-2	解毒 11日間観察	マウス	雌雄 10	経口	0, 9.6~41.5 アトピ'ン(単回); 60	アトピ'ンで症状軽減	臨医研 (1986年)	186
VIII-3 GLP	解毒 7日間観察	ラット	雄 10	経口	検体; 20, 50 アトピ'ン(5回投与); 0.1, 1, 10 アトピ'ン+PAM(5回投与); 0.1+2.5, 1+25, 10+250	アトピ'ン単独及びアト ピ'ン+PAMで症状軽 減 アトピ'ン+PAM(1+25 mg/kg)の併用が最 も有効	動繁研 (1994年)	188
VIII-4	解毒 14日間観察	ラット	雌雄 15	経口	検体; 雄 46, 雌 24 アトピ'ン; 30×1+10×3 アトピ'ン; 30×4 2-PAM; 50×2/日×3日 アトピ'ン+2-PAM; (30×1+10×3)+(50×2/ 日×3日) アトピ'ン+2-PAM; (30×4)+(50×2/日× 3日)	アトピ'ン単独及び アトピ'ン+2-PAM併用 で治療効果あり	実医研 (2002年)	191

## 2. 原体中混在物及び代謝物を用いた試験成績

資料 No.	試験の種類 期間	供試動物	1群当り 供試数	投与方法	投与量 (mg/kg)	LD <sub>50</sub> 値または 無毒性量 (mg/kg)	試験機関 (報告年)	頁
I-12 <sup>#</sup> GLP	代謝物 急性毒性 14日間観察	ラット	雌雄 5	経口	2000	雌雄 >2000	SPL (1999年)	194

# 2004年2月2日追加提出

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

### 3. 製剤を用いた試験成績

#### 3-1. 45%乳剤

資料 No.	試験の種類 期間	供試動物	1群当り 供試数	投与方法	投与量 (mg/kg)	LD <sub>50</sub> 値または 無毒性量 (mg/kg)	試験機関 (報告年)	頁
I-5	急性毒性 45%乳剤 7日間観察	ラット	雌雄10	経口	13.9, 16.7, 20.0, 24.0, 28.8, 34.6	雄19.50 雌21.50	日医研 (1978年)	195
I-4 GLP	急性毒性 45%乳剤 14日間観察	マウス	雌雄10	経口	2.5, 10, 40, 80*, 160, 640 *雌のみ	雄152 雌126	TLL (1987年)	196
I-6 GLP		ラット	雌雄10	経皮	0, 0.25, 0.50, 1.00 (ml/kg)	雌雄>1.00 (ml/kg)	日医研 (1985年)	197
I-7 GLP		ラット	雌雄5	吸入	雄0, 49.23, 184.96, 362.11, 550.28, 1392.82 雌0, 49.23, 130.84, 184.96, 198.61, 303.55(μg有効成分/l)	雄351 雌121 (μg有効成分/l)	HUK (1988年)	198
II-3 GLP	皮膚刺激性 45%乳剤 7日間観察	ウサギ	雄6	背部皮膚	0.5ml(原液0.1ml) / パッチ	中等度の 刺激性あり	環保研 (1985年)	200
II-3 GLP	眼刺激性 45%乳剤 14日間観察	ウサギ	非洗眼群: 雄6 洗眼群: 雄3	眼瞼結膜 囊内投与	0.1ml(原液0.02ml) / 眼	刺激性あり	環保研 (1985年)	202
II-7 GLP	皮膚感作性 45%乳剤 Maximization法 24日間観察	モモト	雌20	感作皮内: 5% 感作経皮: 100% 惹起経皮: 50, 100%		中等度の感作性あり (9/16匹で陽性)	TLL (1987年)	204

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

3-2. 1.5%粉剤

資料 No.	試験の種類 期間	供試 動物	1群当り 供試数	投与方法	投与量 (mg/kg)	LD <sub>50</sub> 値または 無毒性量 (mg/kg)	試験機関 (報告年)	頁
I-9 GLP	急性毒性 1.5%粉剤 14日間観察	ラット	雌雄 10	経口	25, 75, 225, 390(雌), 675, 2025	雄 675 雌 403	TLL (1987年)	206
I-8 GLP		マウス	雌雄 10	経口	667, 1000, 1500, 2250, 3375	雄 3001 雌 2256	TLL (1987年)	207
I-10 GLP		ラット	雌雄 10	経皮	2000	雌雄>2000	TLL (1987年)	208
I-11 GLP		ラット	雌雄 5	吸入	0, 5.56(mg/l)	雌雄>5.56 (mg/l)	IRI (1992年)	209
II-5 GLP	皮膚刺激性 1.5%粉剤 7日間観察	ウサギ	雌 6	背部皮膚	0.5g/パッチ	刺激性なし	TLL (1986年)	211
II-4 GLP	眼刺激性 1.5%粉剤 7日間観察	ウサギ	非洗眼群: 雌 6 洗眼群: 雌 3	眼瞼結膜 囊内投与	0.1g/眼	極く軽度の 刺激性あり	TLL (1986年)	212
II-8 GLP	皮膚感作性 1.5%粉剤 Maximization法 24日間観察	モット	雌 20	感作皮内: 5% 感作経皮: 50% 惹起経皮: 25, 50%		中等度の感作性あり (13/20匹で陽性)	TLL (1987年)	215

注1) 試験機関名として以下の略称を用いた。

TLL	: Toxicol Laboratories Limited	日産化学	: 日産化学工業株式会社 生物化学研究所
LSR	: Pharmaco-LSR Ltd.	残研	: 残留農薬研究所
HRC	: Huntingdon Research Centre	実医研	: 株式会社実医研
HLA	: Hazleton Laboratories America, Inc.	臨医研	: 臨床医科学研究所
HLE	: Hazleton Laboratories Europe Ltd.	動繁研	: 動物繁殖研究所
HUK	: Hazleton UK	日医研	: 日本実験医学研究所
HLS	: Huntingdon Life Sciences Ltd.	環保研	: 環境保健生物研究センター
MRL	: Microtest Research Limited		
SPL	: Safepharm Laboratories Limited		
IRI	: Inveresk Research International Limited		

注2) 代謝物として以下の記号を用いた (構造式はIX-4頁参照)

代謝物 :

## 1. 原体

### (1) 急性毒性

#### ① ラットにおける急性経口毒性試験

(資料No. I-2)

試験機関 : Toxicol Laboratories Limited (GLP 対応)

報告書作成年 : 1987 年

検体の純度 : %

供試動物 : SD(Cr1:CD BR)系ラット、1群雌雄各 10 匹、体重 : 雄 129-146g 雌 106-121g

観察期間 : 14 日間観察 (投与日を 1 日として起算)

投与方法 : 検体をポリエチレン・グリコール 400 液に懸濁し、一晚絶食したラットに単回強制経口投与した。投与容量は 10ml/kg とした。

観察・検査項目 : 一般症状及び死亡について投与当日は投与後 30 分間、1、2 及び 4 時間に観察した。その後、一般症状については 1 日 1 回、死亡については 1 日 2 回観察した。体重は投与開始前、投与後 8 及び 15 日に測定し、死亡した動物は解剖時に測定した。死亡動物及び観察期間終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を実施した。

結果 :

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	20, 41, 84, 172, 353
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 36 (25-48) 雌 24 (16-34)
死亡開始及び終了時間	雄 投与後 30 分以内/投与後 5 日 雌 投与後 30 分以内/投与後 6 日
症状発現及び消失時間	投与後 30 分以内/投与後 11 日
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	—

死亡 ; 全ての死亡は投与後 6 日までに認められた。

症状 ; 雌雄に関係なく、流涎、嗜眠、振戦、立毛及び円背位が認められた。他に、下痢、頬・鼻・泌尿生殖器・肛門周囲の被毛の汚れ、呼吸困難及び紅涙の増加も認められた。尚、41mg/kg 群の雌雄 1 匹で立毛及び鼻周囲の被毛の汚れが投与後 10 日まで認められた。

体重 ; 全生存動物で体重増加が認められた。

肉眼的病理検査 ; 初期に死亡したラットに胃腸管のガス及び液体による膨満、腺胃の粘膜壁の肥厚を伴う発赤が多く認められた。生存動物で異常は認められなかった。



② マウスにおける急性経口毒性試験

(資料No. I-1)

試験機関 : Toxicol Laboratories Limited (GLP 対応)

報告書作成年 : 1987 年

検体の純度 : %

供試動物 : ICR(Cr1:CD-1 BR)系マウス、1群雌雄各10匹、体重:雄20-31g 雌19-24g

観察期間 : 14日間観察(投与日を1日として起算)

投与方法 : 検体をポリエチレン・グリコール400液に懸濁し、一晩絶食したマウスに単回強制経口投与した。投与容量は10ml/kgとした。

観察・検査項目: 一般症状及び死亡について投与当日は投与後30分間、1、2及び4時間に観察した。その後、一般症状については1日1回、死亡については1日2回観察した。体重は投与開始前、投与後8及び15日に測定し、死亡した動物は解剖時に測定した。死亡動物及び観察期間終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を実施した。

結果 :

投与方法	経口
投与量(mg/kg)	18、32、58、78、105、189
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 94.8(75.2-126.4) 雌 59.4(46.9-70.4)
死亡開始及び終了時間	投与後30分以内/投与後15日
症状発現及び消失時間	雄 投与後30分以内/投与後12日 雌 投与後30分以内/投与後5日
死亡例の認められなかった最高投与量(mg/kg)	雌雄 18

死亡 ; 大部分の死亡は投与後30分以内に認められた。投与後15日に死亡した32mg/kg群の雌雄各1匹を除き、全ての死亡は投与後5日までに認められた。

症状 ; 雌雄に関係なく、立毛、円背位、調和不能、嗜眠及び振戦が認められた。他に、痙攣、体温低下、全身衰弱、脱毛、鼻及び眼周囲の汚れも認められた。これら症状のほとんどは投与後5日までに消失したが、立毛は投与後11日、脱毛は投与後10日まで認められた。

体重 ; 生存動物における体重増加は、低用量群では正常であったが投与量が増加するにつれて減少した。

肉眼的病理検査 ; 検体投与に関連した異常として、胃腸管の液体による膨満、105mg/kg群に胃粘膜の発赤が認められた。その他検体投与に関連した異常は認められなかった。

③ ラットにおける急性経皮毒性試験

(資料No. I-3)

試験機関 : Toxicol Laboratories Limited (GLP 対応)

報告書作成年 : 1987 年

検体の純度 : %

供試動物 : SD(Cr1:CD BR)系ラット、1群雌雄各 10 匹、体重 : 雄 236-296g 雌 202-245g

観察期間 : 14 日間観察 (投与日を 1 日として起算)

投与方法 : 蒸留水で湿らせた検体を、投与前日に刈毛した背部皮膚 20 cm<sup>2</sup> に塗布した。塗布部位はガーゼで被覆し、包帯で固定した。塗布 24 時間後、被覆物を取り除き、塗布部位を温水で洗浄した。

観察・検査項目 : 一般症状及び死亡を投与当日は投与後 30 分間、1、2 及び 4 時間に観察した。その後は毎日 1 回観察した。体重は投与開始前、投与後 8 及び 15 日に測定し、死亡した動物は解剖時に測定した。死亡動物及び観察期間終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を実施した。

結果 :

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	雄 1000、1600、2560、3238、4096、6554 雌 50、95、181、343、652、1238
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 2850 (2252-3587) 雌 538 (340-1095)
死亡開始及び終了時間	雄 投与後 2 日/投与後 15 日 雌 投与後 3 日/投与後 9 日
症状発現及び消失時間	雄 投与後 30 分以内/投与後 15 日まで消失せず 雌 投与後 1 時間/投与後 15 日まで消失せず
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 - 雌 95

死亡 ; 死亡は投与後 2-15 日に認められた。

症状 ; 雌雄に関係なく、立毛、自発運動の低下、鼻周囲の被毛の汚れ、協調不能、円背位、振戦が観察された。他に、呼吸困難、頻呼吸、頭部または全身の被毛の汚れ、側臥位、虚脱、消瘦も認められた。鼻周囲の被毛の汚れを除き、これら症状は投与後 2 日から認められた。

体重 ; 全生存動物で体重増加が認められた。

肉眼的病理検査 ; 検体投与に関連した異常として、胃腸管のガス膨満及び胃内壁の刺激性変化が認められた。その他検体投与に関連した異常は認められなかった。

(2) 皮膚及び眼に対する刺激性

① ウサギを用いた皮膚刺激性試験

(資料No. II-2)

試験機関 : Toxicol Laboratories Limited (GLP 対応)

報告書作成年 : 1988 年

検体の純度 : %

供試動物 : ニュージーランド白色ウサギ、雌 6 匹、体重 : 2.7-3.2kg

観察期間 : 7 日間 (適用日を 0 日として起算)

投与方法 : 検体 0.5g を蒸留水 0.5ml で湿らせた後、2.5cm×2.5cm のリント布に塗り、投与前日に剪毛した背部皮膚に適用して包帯で閉塞した。暴露時間は 4 時間とし、皮膚に残った検体は 37°C の水に浸した生綿を使って洗浄した。

観察項目 : 暴露終了後 1、24、48、72 時間及び 7 日に適用部位の刺激性変化 (紅斑、痂皮、浮腫) の有無を Draize 法に従って採点した。

結果 : 観察した刺激性変化の採点は以下の表のとおりである。

動物番号	項目	最高評点	暴露後時間				
			1h	24h	48h	72h	7日
240	紅斑・痂皮	4	1	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0
435	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0
443	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0
447	紅斑・痂皮	4	1	1	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0
450	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0
451	紅斑・痂皮	4	0	1	1	1	0
	浮腫	4	0	1	0	0	0
合計*	紅斑・痂皮	24	2	2	1	1	0
	浮腫	24	0	1	0	0	0
平均*	紅斑・痂皮	4	0.33	0.33	0.17	0.17	0
	浮腫	4	0	0.17	0	0	0

\*: 申請者が算出した

暴露後 1 時間に 2 匹で非常に軽度の紅斑が認められた。暴露後 24 時間には別の 1 匹に非常に軽度の紅斑及び浮腫が認められ、紅斑は暴露後 72 時間まで続いた。その他に刺激性は認められなかった。

以上の結果から、EPN 原体はウサギの皮膚に対してわずかな刺激性を有するものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

② ウサギを用いた眼刺激性試験

(資料No. II-1)

試験機関 : Toxicol Laboratories Limited (GLP 対応)

報告書作成年 : 1987 年

検体の純度 : %

供試動物 : ニュージーランド白色ウサギ、非洗眼群 : 雌 6 匹、洗眼群 : 雌 3 匹、体重 : 2.1-2.5kg

観察期間 : 7 日間 (適用日を 0 日として起算)

投与方法 : ペースト状にした検体 0.1ml を右眼の下眼瞼結膜嚢内に適用し、数秒間眼瞼を閉じあわせた。適用後 6 匹は洗眼せず、3 匹は適用後 2 分に 37 度の蒸留水約 40ml で 1 分以上洗眼した。

観察項目 : 適用後 1、24、48、72 及び 168 時間に角膜、虹彩、結膜の損傷ならびに刺激性変化を観察し、Draize 法に従って採点した。

結果 : 観察した刺激性変化の採点を次頁の表に示す。

適用後約 18 時間に非洗眼群 5 匹、洗眼群 2 匹が死亡した。

剖検では鼻及び肛門周囲の被毛の汚れ、脾臓及び腎臓の退色が認められた。さらに 48 時間以内に非洗眼群の 1 匹が死亡し、剖検では鼻及び肛門周囲の被毛の汚れ、脾臓及び腎臓の退色、肺及び肝臓の変色が認められた。

角膜及び虹彩の刺激性変化は非洗眼群、洗眼群ともに認められなかった。

結膜の刺激性変化は適用後 1 時間から非洗眼群、洗眼群ともに認められた。

洗眼群の 1 匹は刺激性変化が残存せず、適用後 7 日間生存した。

以上の結果から、EPN 原体はウサギの眼粘膜に対して結膜刺激性を有するが、速やかに回復するものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

《非洗眼群》

項 目				最高 評点	適 用 後 時 間				
					1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	168 時間
非 洗 眼 群	動物 番号 436	角 膜	混 濁	4	0				
			面 積*	4	0				
		虹 彩			2	0			
		結 膜	発 赤	3	2				
			浮 腫	4	2				
			分泌物*	3	1				
	動物 番号 438	角 膜	混 濁	4	0				
			面 積*	4	0				
		虹 彩			2	0			
		結 膜	発 赤	3	2				
			浮 腫	4	1				
			分泌物*	3	1				
	動物 番号 439	角 膜	混 濁	4	0				
			面 積*	4	0				
		虹 彩			2	0			
		結 膜	発 赤	3	2				
			浮 腫	4	1				
			分泌物*	3	1				
	動物 番号 440	角 膜	混 濁	4	0	0			
			面 積*	4	0	0			
		虹 彩			2	0	0		
		結 膜	発 赤	3	2	0			
			浮 腫	4	0	0			
			分泌物*	3	2	0			
動物 番号 441	角 膜	混 濁	4	0					
		面 積*	4	0					
	虹 彩			2	0				
	結 膜	発 赤	3	1					
		浮 腫	4	2					
		分泌物*	3	1					
動物 番号 442	角 膜	混 濁	4	0					
		面 積*	4	0					
	虹 彩			2	0				
	結 膜	発 赤	3	2					
		浮 腫	4	1					
		分泌物*	3	1					
合計**				660	50	0			
平均**1)				110	8.33	0			

\*：農水省ガイドラインには記載なし

\*\*：申請者が算出した

1) Draize 法による評価点 (最高 110 点)

空欄：死亡のため評価不可能

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

《洗眼群》

項目			最高 評点	適用後時間				
				1時間	24時間	48時間	72時間	168時間
洗眼群# (3匹平均)	角膜	混濁	4	0	0	0	0	0
		面積*	4	0	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1.67	1	0	0	0
		浮腫	4	0.33	0	0	0	0
		分泌物*	3	-	0	0	0	0
	合計**1)			110	4	2	0	0

\*：農水省ガイドラインには記載なし

\*\*：申請者が算出した

#：適用後24時間以降は死亡のため1匹のみの数値を示した

1) Draize法による評価点（最高110点）

-：洗眼のため評価不可能

(3) 皮膚感作性

① モルモットを用いた皮膚感作性試験

(資料No. II-6)

試験機関 : Toxicol Laboratories Limited (GLP 対応)

報告書作成年 : 1987 年

検体の純度 : %

供試動物 : Dunkin Hartley 系アルビノモルモット、雌、1 群 10 匹、体重 : 340-397g

観察期間 : 感作開始から惹起終了後 48 時間観察まで (31 日間)

試験操作 : [Buehler 法]

感作 ; 検体の 25%流動パラフィン溶液 0.5ml を 20mm<sup>2</sup>のリント布にしみこませ、投与前日に剪毛した左肩部に適用し包帯で閉塞し、6 時間皮膚に接触させた。対照群は流動パラフィン液を同様に適用した。この操作を 1 週間毎に 2 回 (8 及び 15 日) 繰り返した。

惹起 ; 28 日目に全動物の両脇腹を剪毛し、翌日 (29 日目) に、左脇腹に検体の 100%流動パラフィン溶液を、右脇腹に検体の 50%流動パラフィン溶液を感作と同様に適用し、6 時間皮膚に接触させた。

観察項目 : 惹起 24、48 時間後に適用部位の紅斑及び浮腫の有無を肉眼的に観察し、採点した。  
採点及び評価方法 ; 各観察時に下記に示した基準に従い採点した。

皮膚反応の程度	評価
反応なし	0
非常に微かな紅斑、非融合性発疹	0.5
微かな紅斑、通常融合性発疹	1
中等度の紅斑	2
強度の紅斑、浮腫を伴う、または伴わない	3

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

結果：各観察時における感作性変化が認められた動物数を下表に示す。

群	処理		匹数	感作反応動物数										陽性 動物数	感作率 (%)
	感作(3回)	惹起		皮膚反応評点											
				24時間後					48時間後						
				0	0.5	1	2	3	0	0.5	1	2	3		
検体 投与 群	25%検体流動 パラフィン溶液	100%検体流動 パラフィン溶液	雌 10	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0
		50%検体流動 パラフィン溶液		10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0
陰性 対照 群	流動パラフィン液	100%検体流動 パラフィン溶液	雌 10	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0
		50%検体流動 パラフィン溶液		10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0

検体投与群及び陰性対照群のいずれにおいても感作反応は認められなかった。

なお、陽性対照物質 DNCB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene) を用いた感受性確認試験は 1986-1987 年に実施され、感作率は 50-65%であった。

以上の結果から、EPN 原体の皮膚感作性は陰性であると判断する。



(4) 急性神経毒性

① ラットを用いた急性神経毒性試験

(資料No. III-6)

試験機関 : Pharmaco-LSR Ltd. (GLP 対応)

報告書作成年 : 1994 年

試験の目的 : 検体をラットに単回経口投与した場合の急性神経毒性を明らかにするため、米国 EPA のガイドライン (Pesticide Assessment Guidelines, Sub-division F, series 82-7, 1991) に従って実施した。

検体の純度 : %

供試動物 : SD(Cr1:CD)系ラット、1群雌雄各 10 匹、開始時 5-6 週齢

開始時体重 : 雄 126-172g、雌 109-154g

観察期間 : 14 日間 (1993 年 6 月 23 日-1993 年 7 月 8 日)

(投与日を 1 日として起算)

投与方法 : 検体をコーン油に溶解し、フレキシブルゴムカテーテルを用い、単回強制経口投与した。投与容量は 5ml/kg とした。対照群にはコーン油のみを同様に投与した。

投与群	投与量 (mg/kg)	使用動物数	
		雄	雌
対照群	0	10	10
検体投与群	2	10	10
	5	10	10
	10	10	10

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

統計学的評価法：標本統計量を用いて標準偏差を求めた。記載が無い時は、投与群の平均値は、対照群に比べて有意な差が無いことを示す ( $p > 0.05$ )。バッテリー式機能検査 (FOB) の各変数は、性別、各測定時点毎に分析した。2 値反応 (2 尺度反応) の場合、すなわち、眼球突出、立毛、瞳孔、危機、痛覚反応及び屈筋反応、及び驚愕、耳介、正向反射については、ロジスティック回帰により解析し、対比により群間比較を行った。3 ないしそれ以上の尺度からなる観察項目、すなわち流涙、流涎、被毛状態、眼瞼閉鎖状態、振戦、痙攣、異常姿勢、異常歩行、異常行動、ケージからの取りだし、排尿、排糞 (堅さ)、活動度/覚醒状態、呼吸数、ハンドリングの容易さは Wilcoxon の順位和検定により解析した。連続値をとる変量、すなわち落下時開脚度、自発運動量、体温、糞塊数は、まず Bartlett の検定により等分散性を確認し、Shapiro-Wilk の検定によりステューデント化した残差の正規性について確認した。等分散性と正規性の仮定が当てはまる時は、データをパラメトリックな検定である Dunnett の検定により、当てはまらない時は、Wilcoxon の順位和検定により解析した。変化の方向が 1 方向に限定されていると仮定できる場合、つまり正常値が 0 と決まっている時は、検出力を上げるため片側検定を適用した。呼吸数や尿量等両側に变化する変量は両側検定を適用した。落下開脚度と体温は Dunnett の検定により、糞塊数については Wilcoxon の順位和検定により分析した。糞の堅さの解析は、排糞した動物についてのみ実施した。臓器重量と体重は Bartlett の検定により等分散性を確認し、有意ならば Behrens-Fisher の検定により、また、有意でない時は、Dunnett の検定により対比較した。

#### 観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡；全ての動物について、投与当日は投与直後、投与後 4-5 時間、勤務時間終了時に観察した。その後は 1 日 2 回観察した。

結果を下表に示す。

#### 《死亡》

投与量 (mg/kg)		0	2	5	10
死亡率 (%)	雄	0	0	0	0
	雌	0	0	0	30

10mg/kg 群の雌 3 匹が投与後約 5 時間 (最大作用発現時) で死亡した。死亡はすべて FOB の用手法検査時に生じた。最大作用発現時は投与後 4-5 時間であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

《最大作用発現時間（投与後 4-5 時間）の症状》

性別	雄				雌			
投与量 (mg/kg)	0	2	5	10	0	2	5	10
検査例数	10	10	10	10	10	10	10	10
主症状								
立毛		1	1	9		4	9	10
流涎								10
低活動		1	1	2		2	1	10
眼球突出							2	6
異常呼吸				2				10
蒼白								10
よろめき歩行								4
振戦				3			1	10
円背位								

《投与後 1 日の症状》

性別	雄				雌			
投与量 (mg/kg)	0	2	5	10	0	2	5	10
検査例数	10	10	10	10	10	10	10	7
主症状								
立毛				7		3	7	7
流涎								4
低活動				2				7
眼球突出								3
異常呼吸				1				7
蒼白								7
よろめき歩行								1
振戦				2				7
円背位								

《投与後 3 日の症状》

性別	雄				雌			
投与量 (mg/kg)	0	2	5	10	0	2	5	10
検査例数	10	10	10	10	10	10	10	7
主症状								
立毛				1				6
流涎								
低活動								3
眼球突出								
異常呼吸								5
蒼白								3
よろめき歩行								1
振戦								2
円背位								5

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

投与に関連した症状は全ての検体投与群の動物に観察され、雌がより重篤な影響を受けた。投与日の症状は主として最大作用発現時にみられたが、動物によっては当日の最終観察時刻まで認められた。

体重 ; 投与直前、投与後 5 時間 (最大作用発現時)、投与後 4、7、11 及び 14 日に測定した。結果を下表に示す。

経過日数 \ 投与量 (mg/kg)	雄				雌			
	0	2	5	10	0	2	5	10
投与直前		99	100	101		104	103	101
投与後 5 時間	(96)	99 (97)	101 (97)	101 (96)	(96)	105 (94)	102 (96)	95 (91)
4 日		99	100	96		103	99	72
7 日		100	101	98		104	100	82
11 日		98	101	99		102	101	87
14 日		98	100	100		103	103	92
Gain 1-4 日	26	25 96%	25 96%	16 62%	18	18 100%	14↓ 78%	-21↓
Gain 4-7 日	28	28 100%	30 107%	31 111%	9	10 111%	10 111%	21↑ 233%
Gain 7-11 日	37	34 92%	36 97%	40 108%	24	21 88%	26 108%	30↑ 125%
Gain 11-14 日	24	24 100%	23 96%	26 108%	10	11 110%	12 120%	17↑ 170%
Gain 1-14 日	114	111 97%	114 100%	113 99%	60	60 100%	62 103%	47 78%

Behrens-Fisher、Dunnnett 検定 ↑ ↓ : p<0.05 ♂ ♀ : p<0.01

数字は対照群に対する変動率(%)を表す。

但し ( ) 内数字は投与前体重に対する変動率(%)を表す。

Gain 欄上段は絶対値(g)、下段は対照群に対する変動率(%)を表す。

投与後 5 時間の体重は全群で減少したが、とりわけ 10mg/kg 群雌で顕著な減少が観察された。投与後最初の 4 日間の増加量は、10mg/kg 群雌で減少し、10mg/kg 群雄及び 5mg/kg 群雌で抑制され、雌で有意であった。

10mg/kg 群雌ではその後増加傾向に転じ有意に増加した。1 日から 14 日までの総体重増加量は、有意ではないが、対照群の 78%と低値であった。

その他の群は対照群と同等であった。

摂餌量 ; 毎日測定した。観察期間中の摂餌量は以下の通りであった。

経過日数 \ 投与量 (mg/kg)	雄				雌			
	0	2	5	10	0	2	5	10
1 日		96.3	96.3	100.0		100.0	95.2	9.5
3 日		93.8	96.9	87.5		107.4	96.3	33.3
7 日		96.8	100.0	106.5		86.2	103.4	106.9
14 日		100.0	96.9	103.1		100.0	100.0	95.7
Total 1-14 日	445	432 97.0%	438 98.0%	447 100.4%	360	353 98.0%	366 102.0%	288 80.0%

数字は対照群に対する変動率(%)を表す。

Total 欄上段は絶対値(g)、下段は対照群に対する変動率(%)を表す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

投与後1日の10mg/kg 群雌の摂餌量は極端に少なかったが、その後回復し7日には対照群と同等となった。雄に影響は認められなかった。

詳細な状態観察；以下の項目について、投与開始前、投与日の投与後5時間(最大作用発現時)、投与後7及び14日に実施した。

バッテリー式機能検査(FOB: Functional Observation Battery)：

a) ホームケージ

流涙  
眼球突出  
流涎  
被毛の状態  
立毛  
眼瞼閉鎖状態  
振戦  
痙攣  
異常姿勢  
異常歩行  
異常運動

b) ホームケージからの取り出し

c) オープンフィールド

排尿  
排糞  
振戦  
痙攣  
異常姿勢  
異常歩行  
異常運動  
活動度/覚醒状態  
呼吸数

d) 用手法検査

ハンドリング  
瞳孔縮小反応  
落下時開脚度  
痛覚反応(尾を摘む)  
屈筋(逃避)反応  
危機反応  
驚愕反射  
耳介反射  
正向反射  
体温  
握力-前後脚

対照群と比較して統計学的有意差が認められた項目を下表に示す。

性別	雄				雌			
	0	2	5	10	0	2	5	10
ホームケージ観察 (投与後 5 時間)								
流涙 <sup>2)</sup> (わずか～中程度)								7/10***
眼球突出 <sup>1)</sup> (+)				1/10				9/10***
流涎 <sup>2)</sup> (わずか～大量)				1/10				8/10***
被毛の汚れ <sup>2)</sup> (わずか～顕著)		1/10	1/10	2/10			2/9	9/10***
立毛 <sup>1)</sup> (+)							3/9*	3/10*
振戦 <sup>2)</sup> (わずか～顕著)				2/10			1/9	10/10***
異常姿勢 <sup>2)</sup> (わずか～中程度)				1/10				9/10***
異常歩行 <sup>2)</sup> (静止)	2/10	3/10	5/10	2/10	2/10	4/10	2/9	7/10*
ケージからの取り出し <sup>2)</sup> (極めて容易)				1/10				8/10***
オープンフィールド観察 (投与後 5 時間)								
排尿 <sup>2)</sup> (少量～中程度)	3/10	4/10	2/10	2/10	1/10	1/10	3/10	8/10**
活動度/覚醒 <sup>2)</sup> (低活動)	1/10	2/10	2/10	2/10	1/10			9/10***
呼吸 <sup>2)</sup> (緩徐)				2/10				9/10***
振戦 <sup>2)</sup> (わずか～顕著)				1/10			1/10	9/10***
異常姿勢 <sup>2)</sup> (わずか～中程度)		1/10		1/10			1/10	10/10***
異常歩行 <sup>2)</sup> (静止)								6/10***
用手法検査 (投与後 5 時間)								
ハンドリング <sup>2)</sup> (極めて容易)				1/10		1/10		9/9***
驚愕反射 <sup>1)</sup> (-)							1/10	3/9*
耳介反射 <sup>1)</sup> (-)				1/10				2/9*
屈筋反応 <sup>1)</sup> (-)				2/10*				5/9**
正向反射 <sup>1)</sup> (-)	1/10			1/10				7/8***
痛覚反応 <sup>1)</sup> (-)				2/10*				9/9***
体温 <sup>3)</sup>	38.37	38.32	38.29	37.11*	38.55	38.49	38.6	33.13***

1) シグニフィカンス回帰 \* : p<0.05 \*\* : p<0.01 \*\*\* : p<0.001

2) Wilcoxon の順位検定 \* : p<0.05 \*\* : p<0.01 \*\*\* : p<0.001

3) Dunnett 検定, Wilcoxon の順位検定 \* : p<0.05 \*\* : p<0.01 \*\*\* : p<0.001

表中の数字は認められた所見数/検査動物数を表す。但し、体温(°C)は測定値を表す。

空欄は「0」を示す。

( )は程度の尺度を示す。

最大作用発現時 (投与後 5 時間) に、投与に関連した明らかな反応が 10mg/kg 群雌雄、5mg/kg 群雌で認められ、症状の程度は雌でより著しかった。10mg/kg 群雄では屈筋、痛覚反応の消失がみられ、同群雌では驚愕、耳介、屈筋、正向、痛覚の反射あるいは反応が消失した。また、体温低下が 10mg/kg 群雌雄に、流涙、流涎、尿量の増加が雌に観察された。さらに雌では、活動低下、呼吸の乱れ、振戦、ハンドリングに対する反応低下、異常姿勢、異常歩行も認められた。その他、統計学的に有意ではないが投与に関連した反応として、投与当日に 10mg/kg 群雄で振戦、呼吸数の減少、流涎、眼球突出、異常姿勢、異常歩行、蒼白、10mg/kg 群雌で腹臥、よろめき歩行、蒼白、5mg/kg 群雌で立毛、振戦が認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

握力；結果を下表に示す。

性別		雄				雌			
投与量(mg/kg)		0	2	5	10	0	2	5	10
投与前	前肢	100	99.0	104.6	101.0	100	96.2	97.0	94.3
	後肢	100	93.6	99.9	93.2	100	95.2	105.7	101.7
投与後 5時間	前肢	100	105.5	99.5	89.2	100	89.3	103.6	44.7↓
	後肢	100	102.6	100	94.7	100	84.8	96.1	45.0↓
投与後 7日	前肢	100	101.3	93.5	96.0	100	95.6	97.3	93.9
	後肢	100	102.6	101.2	110.3	100	100.3	101.7	89.2
投与後 14日	前肢	100	104.1	100.4	102.2	100	95.4	100.4	87.5
	後肢	100	97.9	96.0	103.8	100	103.4	114.7	79.9

Dunnett 検定、Wilcoxon の順位検定    ↑ ↓ : p<0.01    ↑↓ : p<0.001

数字は対照群に対する変動率(%)を表す。

10mg/kg 群雌で、前後肢握力の有意な低下が投与後 1 日に認められ、投与後 7 日及び 14 日においても有意ではないが若干の低下が観察された。

自発運動量；投与開始前、投与日の投与後 5 時間(最大作用発現時、投与後 1 日と表示)、投与後 7 及び 14 日に自動計測器で測定した。各動物を透明ポリカーボネート製ケージに入れた。ケージには 8 つの赤外線ビームが通っており、動物の立ち上がり回数と水平運動量が計測出来る。測定は用手法による諸検査の直後に行い、6 分間の観察を連続して 10 回行った(総計 1 時間)。

自発運動量総量(60 分間)を下表に示す。1 日(最大作用発現時)は最初の 6 分間も併記した。

性別		雄					雌				
投与量 (mg/kg)	ビーム レベル	投与前	1 日 最大作用発現時		7 日	14 日	投与前	1 日 最大作用発現時		7 日	14 日
		60 分 総計	最初の 6 分	60 分 総計	60 分 総計	60 分 総計	60 分 総計	最初の 6 分	60 分 総計	60 分 総計	60 分 総計
		0	高	100	100	100	100	100	100	100	100
	低	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2.0	高	136.6	115.0	113.4	83.8	79.2	97.2	60.4	53.0	132.3	93.5
	低	150.7	119.6	102.9	82.4	138.2	121.3	70.2	56.7	137.7	105.2
5.0	高	82.2	96.9	125.0	67.7	115.9	112.8	83.6	89.2	147.3	93.0
	低	94.7	67.1	130.4	75.0	113.9	101.5	76.6	80.0	77.2	75.1
10.0	高	89.8	28.8↓	48.6	71.5	104.5	89.6	6.9↓	3.8↓	72.5	87.4
	低	154.8	71.4	118.5	108.0	114.8	111.3	67.9	94.1	97.3	91.0

Dunnett 検定、Wilcoxon の順位検定    ↑ ↓ : p<0.05    ↑ ↓ : p<0.01    ↑↓ : p<0.001

数字は対照群に対する変動率(%)を表す。

10mg/kg 群雌雄では投与後 1 日の測定で立ち上がり回数の有意な減少が認められた。雌は 7 日にも、有意ではないが低値を示した。その他の群で影響は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

肉眼的病理検査；死亡動物及び観察期間終了時の全生存動物について実施した。観察期間終了時にペントバルビタール腹腔内投与で全身麻酔し、大動脈よりアルデヒド系 Karnovsky 固定液を灌流し固定した。屠殺の順番は群間比較が充分可能なように選んだ。

検体投与に関係する変化は認められなかった。

臓器重量；各動物の脳及び下垂体重量を測定し、対体重比も算出した。

対照群と投与群の脳及び下垂体の重量はほぼ同程度であった。

病理組織学的検査；各群雌雄各 5 匹を対象に実施した。灌流固定の後、脳、脊髄（頸部、胸部、腰部）、眼球、視神経、下垂体、坐骨神経、脛骨神経を摘出しさらに浸漬固定した。パラフィン包埋の後、脳（すべての主要部分）、脊髄（頸部、胸部、腰部の横断及び縦断面）は 5 ミクロンに薄切しヘマトキシリンエオジン染色し標本とした。左坐骨神経、脛骨神経の近位及び遠位部分の横断及び縦断面は樹脂包埋により行った。1 ミクロンの薄切標本を作成し、トルイジンブルーで染色した。

いずれの動物にも特記すべき神経組織学的所見はなかった。

FOB における動物の反応から、EPN が神経系に影響をおよぼすことは明らかであった。最も重篤な作用は、高用量群雌で、投与当日に観察された。高用量群の雌で認められた握力のわずかな低下を除き、これら投与に対する反応と発現した症状や異常反応は投与後 14 日には消失した。観察された所見の多くはコリンエステラーゼ活性阻害作用により生じた自律神経系のコリン作動性シナプス、神経筋接合部及び中枢神経系の変化に関連したものであった。副交感神経節後シナプスにおける過剰アセチルコリンに対する反応としては、流涎、流涙、排尿の増加、低血圧（顕著な体温の低下と蒼白に示される）及び呼吸緩徐が挙げられる。これらの兆候は投与後 1 日の症状観察時にも、また FOB 検査時にも観察された。中枢作用としては、顕著な活動低下、感覚受容の低下（驚顎反応、耳介反射、痛覚反応、屈筋あるいは、瞳孔反応の消失あるいは低下に示される）や立毛が挙げられる。神経筋作用は、落下開脚度のわずかな増加、握力の低下（観察全期間わたり高用量群の雌で観察された）や振戦に認められる。よろめき歩行は神経筋に対する作用というよりおそらくは活動性の低下に付随した変化と考えられた。高用量群の雌 3 匹の死亡は、検体の直接作用も否定出来ないものの、おそらく投与後 1 日の FOB の用手法検査によるストレスが加わって生じたものと考えられた。死亡前に認められた症状から、EPN の中枢作用により呼吸あるいは循環不全が生じたとも考えられる。投与後初期に見られた体重減少あるいは顕著な体重増加量の減少、また、摂餌量の減少は EPN の急性毒性によるものと考えられる。症状が回復するに従い、摂餌量と体重増加量は改善された。臓器重量、肉眼的及び病理組織学的所見に投与に関連した変化は認められず、投与後 14 日には神経学的兆候からのほぼ完全な回復が認められたことから、EPN は 10mg/kg 単回投与において永続的な神経学的障害を生じないと考えられた。

EPN の 5 及び 10mg/kg の単回経口投与により神経学的変化が生じ、雄より雌の方がより影響を受けた。大部分の神経学的変化は明らかに回復可能であり、神経組織学的所見は全くなく、神経系への永続的な障害作用の事実は認められなかった。2mg/kg 投与群では投与後約 5 時間に少数の動物で、最小の影響（立毛、低活動）が認められたのみであった。



(5) 急性遅発性神経毒性

① ニワトリを用いた急性遅発性神経毒性試験

(資料No. III-1)

試験機関 : Huntingdon Research Centre (GLP 対応)

報告書作成年 : 1986 年

検体の純度 : %

供試動物 : ニワトリ (Hybrid Brown Laying 種)、

LD50 値設定試験 ; 14 ヶ月齢、神経毒性試験 ; 13 ヶ月齢、

1 群雌 10-40 羽 (溶媒対照及び陽性対照群は各 10 羽)、

前処理開始時体重 : 2010-2760g

観察期間 : ①LD50 値設定試験 ; 14 日間

②神経毒性試験 ; 29 日間 (投与日を 1 日として起算)

投与方法 : 検体をコーン油に溶解し、一晚絶食したニワトリにプラスチックカテーテルを用いて単回強制経口投与した。投与容量は LD50 値設定試験で 2 ml/kg、神経毒性試験で 2.5 ml/kg とした。保護剤は用いなかった。

陽性対照群には tri-ortho-cresyl-phosphate (TOCP) を、溶媒対照群にはコーン油のみを同様に投与した。

投与量は下記のとおりである。

試験	群	投与量 (mg/kg)	動物数	観察期間 (日)
①LD50 値設定試験	1	0	10	14
	2	20	10	
	3	35	10	
	4	61	10	
	5	107	10	
	6	188	10	
②神経毒性試験	1	0	10	29
	2	500 (TOCP)	10	21
	3	175	40	29

観察・検査項目：

①LD50 値設定試験；一般状態、死亡及び神経症状について 14 日間毎日観察した。体重は投与前 14、7 日、投与直前、投与後 7、14 日に測定した。肉眼的病理検査は実施しなかった。

②神経毒性試験；一般状態及び死亡について検体投与群及び溶媒対照群は 29 日間、陽性対照群は 21 日間、1 日 1 回観察した。神経毒性の評価として運動失調の観察を行い、Cavanagh らの方法に準じた判定方法で点数化した（グレード 1-8）。体重及び摂餌量は週 2 回測定した。観察期間終了時に、投与後 6 日以前の死亡動物を除いた全生存動物について肉眼的病理検査を実施した。肉眼的病理検査を実施した動物について、心臓からの灌流固定後、以下の組織を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。その後、パラフィン包埋して 8 $\mu$ m 厚の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色、Glees and Marsland 軸索染色、Solochrome Cyanin 髄鞘染色を施し、病理組織学的に検査した。病変の程度は 5 段階に分けた（グレード I-V）。

脳（延髄／橋、小脳皮質及び大脳皮質）

脊髄（頸部、胸部、腰仙椎部の横断面及び縦断面多数）

末梢神経（坐骨神経の近位及び遠位部と脛骨神経の遠位枝）

結果：

①LD50 値設定試験

一般状態及び死亡；結果を下表に示す。

投与量 (mg/kg)	動物数	死亡数	遅発性運動失調を示した動物数
0	10	0	0
20	10	0	0
35	10	1	0
61	10	0	0
107	10	1	4
188	10	7	3

全ての検体投与群で投与当日から鎮静、よろめき、激しい運動後のつまづき及び起立不能などが認められた。死亡は 35 及び 107 mg/kg 群の各 1 羽、188 mg/kg 群の 7 羽に認められた。遅発性運動失調は 107 mg/kg 群以上で認められた。

体重；投与後 7 日間は対照群で平均体重のわずかな増加が認められたが、その他の群では用量相関的に減少した。投与後 14 日には 188 mg/kg 群でさらにわずかに減少したが、その他の群では増加し回復傾向が認められた。

以上の結果より、LD50 値は 171mg/kg と算出された。従って、神経毒性試験の投与量を 175mg/kg と設定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

## ②神経毒性試験

一般状態及び死亡；結果を下表に示す。

投与量 (mg/kg)	動物数	死亡数	遅発性運動失調を示した動物数
対照群；0	10	0	0
検体；175	40	28	6
TOCP；500	10	3	6

一般状態では、全ての群でよろめき、嗜眠、流涎、振戦、あえぎ、虚弱及び起立不能等が認められた。

死亡は検体投与群で40羽中28羽に、陽性対照群で10羽中3羽に認められた。遅発性運動失調は、検体投与群の生存動物6羽（最高グレード：2-4）に、陽性対照群の6羽（最高グレード：3-7）に認められた。

体重；投与後3日間は検体投与群で体重が著しく減少し、その多くは投与後3-7日に増加したが、観察期間後期には再び減少した。陽性対照群では投与後10-21日に著しく減少した。

摂餌量；投与後3日間は検体投与群で摂餌量が著しく減少し、その直後に正常の量まで回復したが、投与後21-28日に減少する例も認められた。陽性対照群では投与後10-21日に減少した。

肉眼的病理検査；検体投与による影響は認められなかった。

病理組織学的検査；検査結果を次ページの表に示す。

検体投与群の大部分の動物で、投与に関連すると考えられる軸索変性が認められ、特に脊髄頸部で顕著であった。

陽性対照群ではTOCPの影響と考えられる軸索変性が脊髄及び末梢神経に認められた。

以上の結果から、EPNはニワトリに175mg/kg (LD50値：171mg/kg)を単回経口投与した場合、遅発性神経毒性を有すると判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

<神経軸索変性>

検査項目		投与量 (mg/kg)	対照群 0	検体投与群 175	陽性対照群 (TOCP) 500
		検査動物数	10	12	9
脳	前脳	I	10	12	9
		II			
		III			
		IV			
	中・後脳	I	9	6	8
		II	1	5	1
		III		1	
		IV			
脊髄	上部頸部	I	6	1	1
		II	4	2	2
		III		3	5
		IV		6	1
	下部頸部	I	6	2	
		II	4	8	4
		III		2	5
		IV			
	胸部	I	5		
		II	4	12	4
		III	1		4
		IV			1
	腰部	I	7	2	3
		II	3	7	5
		III		3	1
		IV			
末梢	近位 坐骨神経	I	8	7	2
		II	2	4	4
		III		1	2
		IV			1
	遠位 坐骨神経	I	10	4	2
		II		5	6
		III		3	1
		IV			
	脛骨神経	I	8	4	5
		II	2	3	1
		III		4	2
		IV		1	1

空欄は「0」を示す。

グレード I : 異常なし

グレード II : 時々、神経軸索の分裂

グレード III : 2、3の神経軸索の分裂、ひずみ

グレード IV : 中くらいの数の神経軸索の分裂、ひずみ

グレード V : 多数の神経軸索の分裂、ひずみ

② ニワトリを用いた急性遅発性神経毒性試験

(資料No. III-2)

試験機関 : Huntingdon Research Centre (GLP 対応)

報告書作成年 : 1986 年

検体の純度 : %

供試動物 : ニワトリ (Hybrid Brown Laying 種)、12 ヶ月齢、雌、体重 : 1880-2790g

観察期間 : ①投与量設定試験 ; 21 日間

②回復試験 ; 90 日間

③コリンエステラーゼ活性測定試験 ; 72 時間

④神経障害標的エステラーゼ (NTE) 活性定量試験 ; 72 時間

(投与日を 1 日として起算)

投与方法 : 検体をコーン油に溶解し、一晩絶食したニワトリにプラスチックカテーテルを用いて単回強制経口投与した。投与容量は 2.5 ml/kg とした。保護剤として硫酸アトロピンを投与する場合は検体投与直前に 10mg/kg を胸筋に筋注した。

陽性対照群には tri-ortho-cresyl-phosphate (TOCP) を、溶媒対照群にはコーン油のみを同様に投与した。

投与量は下記のとおりである。

試験	投与量 (mg/kg)	硫酸アトロピン (10mg/kg) 投与	動物数	屠殺日
①投与量設定試験	78	-	5	21
	117	-	5	21
	175	+	5	21
	200	+	5	21
②回復試験	0	-	5	45
	0	-	5	90
	175	+	5	10
	175	+	5	15
	175	+	5	20
	175	+	5	25
	175	+	5	30
	175	+	5	35
	175	+	5	40
	175	+	5	45
	175	+	5	50
③コリンエステラーゼ 活性測定試験	175	-	10	-
	88	-	10	-
	88*	-	10	-
④神経障害標的 エステラーゼ (NTE) 活性定量試験	0	-	4	-
	500 (TOCP)	-	2	-
	61	+	2	-
	107	+	4	-
	175	+	4	-

\* : 高度死亡による追加投与群

観察・検査項目：

①投与量設定試験；一般状態及び死亡について21日間毎日観察した。神経毒性の評価として運動失調の観察を行い、Cavanaghらの方法に準じた判定方法で点数化した（グレード1-8）。体重は投与前14、7日、投与直前、投与後7、14、21日に測定した。観察期間終了時に全生存動物について肉眼的病理検査を実施した。なお投与後7日以前の死亡動物について肉眼的病理検査は実施されなかった。

②回復試験；一般状態及び死亡について90日間毎日観察した。神経毒性の評価として運動失調の観察を行い、Cavanaghらの方法に準じた判定方法で点数化した（グレード1-8）。体重及び摂餌量は投与前14、7日、投与直前、投与後は5日毎に測定した。観察期間終了時に、投与後7日以前の死亡動物を除いた全動物について肉眼的病理検査を実施した。肉眼的病理検査を実施した動物について、心臓からの灌流固定後、以下の組織を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。その後、パラフィン包埋して7 $\mu$ m厚の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色、Glees and Marsland軸索染色、Solochrome Cyanin 髄鞘染色を施し、病理組織学的に検査した。病変の程度は5段階に分けた（グレードI-V）。

脳（延髄／橋、小脳皮質及び大脳皮質）

脊髄（頸部、胸部、腰仙椎部の横断面及び縦断面多数）

末梢神経（坐骨神経と脛骨神経（遠位枝）の近位及び遠位部）

③コリンエステラーゼ活性測定試験；投与24時間前、投与後1、2、4、8、24、48、72時間に血液を採取し、コリンエステラーゼを定量した。

④神経障害標的エステラーゼ（NTE）活性定量試験；溶媒対照群及び検体投与群は投与後48、72時間、陽性対照群は投与後24、48時間に脳及び脊髄のNTE活性を測定した。

結果：

①投与量設定試験

一般状態及び死亡；結果を下表に示す。

投与量 (mg/kg)		動物数	死亡数	遅発性運動失調を示した動物数
検体	硫酸アトロピン			
78	—	5	0	0
117	—	5	0	0
175	10	5	1	1
200	10	5	1	2

全群で振戦、よろめき、激しい運動後のつまづき、起立不能、鎮静などが認められたが、投与後7日までに回復した。死亡は175及び200mg/kg群の各1羽で認められた。

神経症状；遅発性運動失調は175及び200mg/kg群で認められた（最高グレード2-6）。

体重；投与後7日間は全群の平均体重が減少し、特に175及び200mg/kg群で顕著であったが、投与後7-14日に全群で増加した。投与後14-21日には78及び117mg/kg群で平均体重が減少したが、175及び200mg/kg群では増加した。

以上の結果から、遅発性神経毒性を示すのは175mg/kg以上と判断された。また、アトロピンの保護効果も確認された。従って、回復試験における投与量は175mg/kgとし、保護剤として硫酸アトロピンを用いることとした。

## ② 回復試験

一般状態及び死亡；検体投与群の全動物で鎮静、よろめき、激しい運動後の虚脱、起立不能が認められたが、投与後9日までに回復した。

検体投与による影響と考えられる死亡は、投与後11日までに追加予備動物も含めた84羽中5羽に認められた（予備動物を除いた場合は55羽中3羽）。

神経症状；結果を下表に示す。

投与群	対照群		検体 175 mg/kg+硫酸アトロピン										
	45	90	10	15	20	25	30	35	40	45	50	60	90
屠殺日	45	90	10	15	20	25	30	35	40	45	50	60	90
動物数	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
死亡数	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
運動失調*を示した動物数	0	0	0	0	2	0	0	1	1	1	2	2	1
最高グレード					2			2	6	4	3	3	5
最終グレード					2			2	6	2	2	2	2

\*：Cavanaghらの方法に準じた判定方法でグレード2以上を示した。

遅発性運動失調は、検体を投与した55羽中10羽に認められた。

観察期間が45日以上動物では、症状の回復または軽減傾向が認められた。

体重；投与後5日間は検体投与群の全動物で体重減少が認められたが、その後は概ね正常値の範囲内であった。

摂餌量；投与後5日間は全ての検体投与群で摂餌量が減少したが、その後は正常値の範囲内であった。

肉眼的病理検査；運動失調が認められた動物のうち、失調の程度が一番大きかった1羽に骨格筋萎縮が認められた。

病理組織学的検査；検査結果を次ページの表に示す。

脳（小脳白質）、脊髄及び末梢神経に、投与に関連した軸索変性が認められた。

脳の変化は、40日屠殺群で出現し、60日屠殺群まで認められたが、90日屠殺群では認められなかった。

脊髄の変化は、20日屠殺群で出現し、40日屠殺群まで激しさは増強した。90日屠殺群でも、軽度ではあったが、変化が認められた。

末梢神経の変化は、15日屠殺群で出現し、20日屠殺群で最も著明となり、最後は40日屠殺群の1羽で認められた。その他の群では認められなかった。

変性は、特に脊髄頸部で顕著に認められ、神経膠症を示した例もあった。

<神経軸索変性>

投与群		対照群		検体 175mg/kg+硫酸アトロピン												
屠殺日		45	90	10	15	20	25	30	35	40	45	50	60	90		
検査動物数		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
脳	前脳	I	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
		II														
		III														
		IV														
	中・後脳	I	4	5	5	5	3	4	2	1		1			3	
		II	1				2	1	3	4	1	1	3	3	2	
		III									4	3	2	2		
		IV														
脊髄	上部頸部	I	5	1	4	1										
		II		4	1	4	2	3		1	1			1		
		III					3	1	3		3				3	
		IV						1	2	4	1	5	5	5	1	
		V									1					
	下部頸部	I	3	3	4	4	2	1							1	
		II	2	2	1	1	2	4	1	3	1	1		3	3	
		III							3		1	2	2	2	1	
		IV					1		1	2	3	2	3			
	胸部	I	1	3	3	4	1	1	2		1				2	
		II	4	2	2	1	4	4	1	3	3	3	4	1	2	
		III							2	2	1	2	1	2	3	
		IV														
	腰部	I	5	5	5	3	2	3	1		1		2	2		
		II				2	2	2	4	2	2	3	3	3	3	
		III					1			2		2			2	
		IV								1	2					
	末梢	近位坐骨神経	I	4	5	4	3	4	4	3	2	2	3	4	5	5
			II	1		1	2	1	1	2	3	3	2	1		
			III													
IV																
遠位坐骨神経		I	5	4	4	1	3	4	4	5	2	5	5	5	5	
		II		1	1	4	1	1	1		2					
		III					1				1					
		IV														
脛骨神経		I	5	5	4	4	2	4	5	4	3	5	5	5	5	
		II			1		1	1		1	2					
		III				1	1									
		IV					1									

空欄は「0」を示す。

グレードI：異常なし

グレードII：時々、神経軸索の分裂

グレードIII：2、3の神経軸索の分裂、ひずみ

グレードIV：中くらいの数の神経軸索の分裂、ひずみ

グレードV：多数の神経軸索の分裂、ひずみ



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

③ コリンエステラーゼ活性測定試験

血漿コリンエステラーゼ活性 ; 結果を下表に示す。

投与量 (mg/kg)	投与後時間							
	-24	1	2	4	8	24	48	72
175	100 (10)	31 (3)	-	-	-	-	-	-
88	100 (10)	-	46 (1)	55 (2)	94 (2)	78 (1)	82 (1)	99 (2)
88	100 (10)	-	54 (2)	-	92 (2)	87 (4)	85 (4)	119 (4)

表中の数字は投与前 24 時間の値に対する変動率 (%) を示す。

( ) 内の数字は動物数を示す。

- : 実施せず

血漿コリンエステラーゼ活性値は投与後低下し、2-4 時間は低値にとどまった。

88mg/kg 群では、投与後 8 時間に投与前の値に回復した。

④ 神経障害標的エステラーゼ (NTE) 活性定量試験

NTE 活性 ; 結果を下表に示す。

投与量 (mg/kg)	動物数	投与後 時 間	組 織	KCl 活性化 NTE 活性 a (%対照)	KF 再活性化 NTE 活性 b (%対照)	NTE 活性阻害	
						UI-NTE (b-a%)	AI-NTE (100-b%)
61	2	48	脳 脊 髄	59 68	75 84	16 16	25 16
		72	脳 脊 髄	54 68	76 91	22 23	24 9
107	4	48	脳 脊 髄	25 31	55 69	30 39	45 31
		72	脳 脊 髄	51 61	70 79	19 18	30 21
175	4	48	脳 脊 髄	15 21	51 61	36 40	49 39
		72	脳 脊 髄	27 35	53 55	26 20	47 45
TOCP 500	2	24	脳 脊 髄	14 24	15 24	1 0	85 76
		48	脳 脊 髄	14 25	- -	/	

原報から申請者が作成した。

NTE : neuropathy target esterase. 神経組織に存在するエステラーゼで、その活性の阻害度と遅発性神経毒性 (DNT) の出現に高い相関が認められている。

KCl : 塩化カリウム

KF : フッ化カリウム

UI-NTE : unaged inhibited NTE. フェニルチオリン酸エステル (EPN) で修飾された NTE 酵素たん白であり、NTE 活性の阻害の程度で表わす。DNT の防御因子とされ、フッ化カリウムによって再活性化される。この酵素たん白複合体のリン酸残基のエステル側鎖が 1 個外れて、モノアニオン形をとる変性をうける状態を aging という。

AI-NTE : aged inhibited NTE. DNT の誘発因子であり、求核試薬 (KF) による UI-NTE 再活性化の阻害の程度で表わす。神経組織における生成が DNT 発症の引き金を引くと考えられ、50% の生成を臨界として 70% 以上の生成が重篤な DNT を誘発する。

- : 実施せず

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

61mg/kg 群では、48 及び 72 時間の NTE 活性に顕著な差は認められなかった。NTE 活性は軽度に阻害されたが(脳 41-46%、脊髄 32%)、KF 再活性化により NTE 活性は脳 75-76%、脊髄 84-91%に回復した。

107 及び 175mg/kg 群では、NTE 活性は 48 時間より 72 時間で高かった。これは活性の阻害がピークに達した後、72 時間までに回復し始めることを示している。KF 再活性化により NTE 活性はいずれも 50%以上に回復したことから Aging を受けた NTE は 50%以下となり、一般に重篤な遅発性神経毒性を発現させるとされている 70%を下回っている。

一方、陽性対照の TOCP 500mg/kg 群は高い NTE 活性阻害(脳 86%、脊髄 75-76%)を示し、KF による再活性化は殆どなく、また 24 時間から 48 時間にかけて NTE 活性に回復傾向は認められなかった。

各試験の結果を以下に総括する。

回復試験では、EPN175mg/kg 単回投与により 55 羽中 10 羽が遅発性神経毒性の兆候(運動失調)を示したが、45 日以上の観察群では程度の軽減傾向が認められた。検体投与動物の神経病理学的検査では神経組織に軸索の変性が観察された。軸索変性の程度は 20-60 日で最大となった後、90 日後にはほとんど変化が認められない程度まで回復していた。

コリンエステラーゼ活性測定試験では、EPN88mg/kg 単回経口投与後の、コリンエステラーゼ活性の低下は 8 時間後には回復することが確認された。

また、神経障害標的エステラーゼ(NTE)活性定量試験では、61、107 及び 175mg/kg 投与の 48 時間後に NTE 活性の低下が認められたが、72 時間後には回復傾向にあることが示された。Aging を受けた NTE はいずれも 50%以下であり、一般に重篤な遅発性神経毒性を発現させるとされている 70%を下回っていた。

以上の試験成績から、EPN 投与による神経系への影響は、生化学的及び組織学的に回復性を有する事が示唆された。

③ ニワトリを用いた急性遅発性神経毒性試験

(資料No. III-3)

試験機関 : Pharmaco-LSR Ltd. (GLP対応)

報告書作成年 : 1995年

試験の目的 : 急性遅発性神経毒性を評価するため、米国 EPA のガイドライン (Pesticide Assessment Guidelines, Sub-division F, series 81-7, 1991) に従って実施した。

検体の純度 : %

試験動物 : ニワトリ (Sterling Ranger 交雑系)、開始時約 12 ヶ月齢、1 群雌各 9-15 羽、  
開始時体重 : 1.83-2.47kg

観察期間 : 21 日間 (投与日を 1 日として起算)

投与方法 : 検体をコーン油に溶解し、前日夕刻 17:00 より絶食したニワトリにフレキシブルゴムカテーテルを用い、そ嚢内に単回強制経口投与した。投与容量は検体投与群及び溶媒対照群で 4 ml/kg、陽性対照群で 0.6 ml/kg とした。

陽性対照群には tri-ortho-cresyl-phosphate (TOCP) を、溶媒対照群にはコーン油のみを同様に投与した。全ての動物には、保護剤として硫酸アトロピンを投与 5-10 分前に 20mg/kg、投与 3 時間後に 10mg/kg 筋肉内注射した。また、必要に応じて追加治療処置した。

投与量は下記のとおりである。

群	投与量 (mg/kg)	使用動物数	
		計画屠殺群	中間屠殺群*
1. 溶媒対照群(コーン油)	0	6	3
2. 陽性対照群(TOCP)	696	6	3
3. 検体投与群	150	12	3

\* : NTE (Neurotoxic esterase) と脳アセチルコリンエステラーゼ測定用

統計学的評価法 : 標本統計量を用いて標準偏差を求めた。記載が無い時は、投与群の平均値は、対照群に較べて有意な差が無いことを示す ( $p > 0.05$ )。酵素活性の群間差は、誤差分散をプールして用いた Student の  $t$  検定により評価した。病理組織学的検査の群間差は、Fisher の直接確率 (両側検定) により評価した。

観察・検査項目及び結果：

一般症状、死亡及び運動失調；症状は、コリンエステラーゼ活性阻害によるものと、遅発性神経毒性(DNT)による運動失調の2つのカテゴリーに分け観察した。

①コリンエステラーゼ阻害を視点にした観察は、投与当日は頻繁に、2日目以降は1日2回観察した。

②運動失調は、週2回ニワトリを群れにして放ち、閉鎖領域内で追い立てて検出した。歩行異常に関する診断基準は以下の通りとした。

異常あるいはよろめき歩行(軽度、中等度、重度)

低活動

飛節座り

起立困難：接触刺激で立ち上がるが、放すと座ってしまう

起立不能：刺激の有無に関わらず立ち上がろうとするが、立ち上がれない

腹臥位：体躯を脚で支えられない状態

結果を下表に示す。

群	投与量 (mg/kg)	使用 動物数	症状発現動物数		死亡動物	
			急性のコリンエステラーゼ 阻害に伴う症状	遅発性神経 毒性症状	数	症状
1. 溶媒対照群	0	6	0	0	0	
2. 陽性対照群	696	6	0	6	1*	遅発性神経毒性 (18日)
3. 検体投与群	150	12	12	2	1	急性コリンエステラーゼ 活性阻害(7日)

\*：人道的屠殺

検体投与群の全動物でコリンエステラーゼ活性阻害による症状が観察された。うち2羽には遅発性神経毒性による運動失調が認められた。

体重；投与前日、当日、8日、15日及び22日に測定した。

体重の変化を下表に示す。

群	溶媒対照群	陽性対照群	検体投与群
-1日	2.23	2.22	2.24
1日	2.17	2.12	2.14
8日	2.21	2.03	1.98
15日	2.29	2.18	2.21
22日	2.27	1.97	2.19
体重増加量 (-1~22日)	0.05	-0.23	-0.04

表中の数値は絶対値(kg)を表す。

投与開始週に検体投与群及び陽性対照群で軽度な体重減少が認められた。その後、検体投与群で1羽を除き体重増加が認められたが、陽性対照群では投与3週にも体重減少が認められた。

脳及び脊髄の酵素活性測定；各群 3 羽のニワトリを投与 48 時間後に、断頭により屠殺した。全脊髄を取りだし、精秤して氷冷した Tris/EDTA 緩衝液中に置いた。脳を取りだし、髄膜と血管を除いて余分な水分を拭き取った。約 1/3 量の脳を精秤して氷冷した生理食塩液中に置き、残り 2/3 を精秤して氷冷した Tris/EDTA 緩衝液中に置いた。脊髄及び脳の標本をホモジナイズした。緩衝液中の脊髄及び脳のホモジネートについて神経毒性エステラーゼ (NTE = Neurotoxic esterase) 活性を、生理食塩液中の脳ホモジネートについてアセチルコリンエステラーゼ活性を測定した。

[測定法]

脳アセチルコリンエステラーゼ活性；Ellman et al., 1960

(Biochem. Pharmacol. 7, 88)

神経毒性エステラーゼ活性；Chemsyn Science Laboratories Kit,

Johnson, M. K. 1977 (Arch. Tox. 37, 113-115)

結果を下表に示す。

群	投与量 (mg/kg)	使用 動物数	アセチルコリンエステラーゼ <sup>*</sup> 神経毒性エステラーゼ <sup>*</sup> 活性		
			脳 活性 (iu/l)	脳 (nmol phenol/mg protein/min)	脊髄
1. 溶媒対照群	0	3	7900 (0%)	17.0 (0%)	7.6 (0%)
2. 陽性対照群	696	3	9267 (-)	2.8 <sup>↓</sup> (84%)	1.5 <sup>↓</sup> (80%)
3. 検体投与群	150	3	3933 <sup>↓</sup> (50%)	8.1 <sup>↓</sup> (52%)	2.0 <sup>↓</sup> (74%)

Student t 検定 ↑↓: p<0.05    ↑↓: p<0.01    ↑↓: p<0.001

( ) は溶媒対照群に対する減少率 (%) を示す。

溶媒対照群に比べ、検体投与群では脳アセチルコリンエステラーゼ活性が 50%、脳神経毒性エステラーゼ活性が 52%、脊髄神経毒性エステラーゼ活性が 74% それぞれ抑制された。

病理組織学的検査：人道的に屠殺した動物及び観察期間終了時の生存動物は、過剰量のペントバルビタール B. P. Vet. の静脈内注射により屠殺した。ニワトリを背位にし、内臓を露出させ、心臓を経由した陽圧灌流を行った。左心室から蠕動ポンプにより 300-500ml の緩衝 4%ホルムアルデヒド溶液を流した。速やかな寫血と動脈循環系の灌流を達成するため後大動脈を切断した。内臓を取り出し、頭部、脊柱、脚を分離した。脊髄をそのままの位置で全長にわたり露出し、頭蓋骨を除いて脳を露出した。仙骨神経叢、坐骨神経、脛骨神経を露出し、切断はしなかった。露出した神経は固定液をしみこませたティッシュペーパーを当てて解剖中湿潤に保った。そのままの状態ですべてを組織標本作成まで固定液中に最低 4 日間浸漬した。

死亡動物を除いた全てのニワトリの中枢及び末梢神経系の横断及び縦断面の標本を作成した。組織をアルコール水溶液系列で脱水し、パラフィン包埋して約 5 ミクロンの切片を作製した。切片をスライドガラスにマウントしヘマトキシリンエオジン (H+E)、Palmgren あるいは Crystal violet で対比染色した Luxol fast blue 染色を施し、病理組織学的に検査した。

観察した標本は以下の通りである。

1. 延髄、大脳及び小脳皮質(横断面のみ)
2. 上部脊髄の球部(S. C. CERV)
3. 胸部脊髄中間部(S. C. THOR)
4. 腰仙部脊髄(S. C. LUMB)
5. 左右脛骨神経の近位部(L. TI, N and R. TI. N)及びその側枝

結果を下表に示す。

群	投与量 (mg/kg)	使用 動物数	組織学的に神経毒性病 変を認めた動物数
1. 溶媒対照群	0	6	0
2. 陽性対照群	696	6	6
3. 検体投与群	150	12*	1

\*: 途中死亡例1羽を含む。

陽性対照群の全動物で、食胞の存在/軸索の分節性肥厚/髄鞘球形成を特徴とする軸索の変性が脛骨神経及び脊髄で認められた。これらの所見は、検体投与群では12羽中1羽にのみ確認された。

病変は、陽性対照群で頸部、胸部及び腰部脊髄の背側索及び腹索の白質中に認められ、検体投与群で頸部、胸部及び腰部脊髄の背索及び側索の白質中にそれぞれ認められた。

EPNを150mg/kg体重で単回投与した結果、脳及び脊髄の双方で神経毒性エステラーゼ活性値及び脳アセチルコリンエステラーゼ活性値の顕著な低下が認められた。EPNを投与した12羽のニワトリのうち、2羽が遅発性神経毒性の兆候を示した。このうち1羽のニワトリの神経組織に軸索の変性を主とする神経病理学的変化が観察されたが、病変の出現頻度に統計学的な差は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

注) ニワトリを用いた急性遅発性神経毒性試験のまとめ

ニワトリを用いた急性遅発性神経毒性試験とその結果を下表に示した。

[遅発性神経毒性：DNT]

資料 No.	実施機関	結果
III-1	HRC (1986)	・ 予備：LD50=171mg/kg. 107mg/kg 以上で DNT 発現 (61 以下無し). ・ 本試：175mg/kg で DNT 発現 (アトロピン保護なし).
III-2	HRC (1986)	・ アトロピン保護有効. 175mg/kg 以上で DNT 発現 (117 以下無し). ・ DNT 及び神経組織学的変化に回復性が認められた (175mg/kg). ・ 血漿 ChE 活性阻害は 8 時間で回復が認められた (88mg/kg). ・ NTE (aging) 活性阻害は 39-49% (175mg/kg).
III-3	P-LSR (1995)	・ 150mg/kg で DNT 発現 (アトロピン保護あり).

以下に、各試験の概要を示す。

III-1：LD50 設定のため、EPN20、35、61、107、188mg/kg を 1 群 10 羽に単回強制経口投与し 14 日間観察した結果、DNT が 107mg/kg 以上を投与した群で認められ、LD50 値は 171mg/kg と推定された。

次いで、175mg/kg を単回強制経口投与し 29 日間観察した結果、生存した 12 羽の大部分に脊髄頸部を主とする軸索変性が認められ、6 羽が DNT 徴候を示した。

III-2：本試験は以下の 4 試験から成る。

試験 1：アトロピンの保護効果及び DNT の発現用量を確認するため、1 群 5 羽の投与群に 78、117、175、200mg/kg を単回強制経口投与し 21 日間観察した結果、アトロピンに保護効果が認められ、DNT は 175mg/kg 以上を投与した群でのみ認められた。

試験 2：DNT の回復性を見極める目的で、175mg/kg の単回強制経口投与後 90 日まで観察し、この間経時的に 1 群 5 羽ずつ解剖した。DNT は投与後 10 日から試験終了時までの期間に 55 羽中 10 羽に認められたが、45 日以降回復傾向を示した。脳、脊髄、末梢神経の病理組織学的検査では、投与後 15 日から軸索変性が末梢神経に認められ、この変化は順次、脊髄及び脳でも観察された。末梢の変化は 45 日以降完全に回復し、脳の変化も 50 日以降回復傾向にあった。最も変化の程度が著明であった脊髄でも、90 日には回復傾向が認められた。DNT と神経病理組織学的変化に明瞭な関係は認められなかった。

試験 3：急性中毒期のコリンエステラーゼ活性阻害の程度を確認するため、88 あるいは 175mg/kg を単回強制経口投与後、72 時間に亘り経時的に血漿コリンエステラーゼ活性を測定した結果、88mg/kg 投与では 8 時間後に回復傾向を示し、72 時間後には完全に回復した。175mg/kg 群では死亡により測定できなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

試験 4 : 脳・脊髄の神経毒性エステラーゼ (NTE) 活性阻害の程度を確認するため、61、107、175mg/kg を単回強制経口投与後 48 及び 72 時間に NTE 活性を測定した結果、全群で用量相関性の活性阻害が認められたが、72 時間後には活性の回復傾向が認められた。DNT の指標とされる “aging” (老化) した NTE は、175mg/kg 群でも 39-49% であった。

III-3 : 予備試験の結果 LD50 値が 150mg/kg と推定されたため、150mg/kg を単回強制経口投与し 21 日間観察した結果、12 羽中 1 羽に脊髄の軸索変性が認められ、2 羽が DNT 徴候を示した。投与後 48 時間の脳アセチルコリンエステラーゼ活性及び NTE 活性は 50% 以上阻害されていた。

以上の試験から、本剤は急性遅発性神経毒性を有することが示されたが、発現率は 20% 程度であり、症状・病変共に回復し得る性質のものであることが確認された。

尚、急性遅発性神経毒性の無毒性量は、資料 No. III-2 では 117mg/kg であるが、資料 No. III-1 の 107mg/kg で遅発性神経毒性が認められていることから、資料 No. III-2 の最低用量である 78mg/kg と考えられた。



(6) 90日間反復経口投与毒性

① イヌを用いたカプセル投与による13週間反復経口投与毒性試験 (資料No. IV-4)

試験機関 : Hazleton Laboratories America, Inc. (GLP 対応)  
報告書作成年 : 1986 年

検体の純度 : %

供試動物 : ビーグル犬、1 群雌雄各 4 匹、開始時 26-30 週齢

開始時体重範囲 : 雄 9.7-13.1 kg、雌 9.1-12.1 kg

投与期間 : 13 週間 (1985 年 9 月 4 日-1985 年 12 月 5 日)

投与方法 : 検体を 0、0.3、1.0、3.0mg/kg/日の用量でゼラチンカプセルに充填し、毎日 1 回、13 週間にわたって強制経口投与した。投与量は前週末の体重をもとに計算し、カプセルは週 1 回調製した。

観察・検査項目及び結果 :

一般状態及び死亡率 ; 一般状態は 1 日 1 回、死亡は 1 日 2 回観察した。

死亡及び検体投与に関連した症状は何ら認められなかった。

体重変化 ; 全動物について投与開始前日、その後は毎週 1 回測定した。

何ら変化は認められなかった。

摂餌量 ; 全動物について投与開始前日から毎週、個体別に摂餌量を算出した。

何ら変化は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

血液学的検査；投与開始3週間前、投与4、7及び13週に全動物について、一晚絶食後に頸静脈から採血し、以下の検査項目を測定した。

赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血小板数、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、総白血球数、白血球百分比、細胞形態

対照群と比べ統計学的有意差のみられた項目を下表に示す。

性別		雄			雌		
投与量(mg/kg/日)		0.3	1.0	3.0	0.3	1.0	3.0
赤血球数	4週						
	7週			85↓			84↓
	13週			88↓			
ヘマトクリット	4週						
	7週						
	13週			90↓			

Dunnett 検定 ↑↓: p< 0.05

表中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

3.0mg/kg/日群では、赤血球数が投与7週の雌雄及び投与13週の雄において、また、ヘマトクリット値が投与13週の雄で有意に減少した。

血液生化学的検査；投与開始3週間前、投与4、7、13週に全動物について、一晚絶食後に頸静脈から採血し、以下の検査項目を測定した。

Na、K、Cl、総蛋白質、アルブミン、グロブリン、A/G比、Ca、無機リン、総ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、グルコース、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アルカリホスファターゼ(ALKP)、血漿コリンエステラーゼ(PL-CHE)、赤血球コリンエステラーゼ(RBC-CHE)、脳コリンエステラーゼ(BR-CHE) [13週のみ]

血漿コリンエステラーゼ活性が1.0mg/kg/日群雄及び3.0mg/kg/日群雌雄の投与4、7、13週において有意に低下した。赤血球コリンエステラーゼ活性も3.0mg/kg/日群雌雄の投与4、7、13週において有意に低下し、脳コリンエステラーゼ活性も3.0mg/kg/日群雌雄の投与13週において有意に低下した。

その他いくつかの項目で統計学的に有意な変化が認められたが、検体投与に関連する変化とは考えられなかった。

対照群と比べ統計学的有意差のみられた項目を下表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

性別		雄			雌		
投与量 (mg/kg/日)		0.3	1.0	3.0	0.3	1.0	3.0
Na	4週						
	7週						
	13週					102 ↑	
Cl	4週						
	7週						103 ↑
	13週					103 ↑	
総タンパク	4週						
	7週	91 ↓		91 ↓			
	13週						
グロブリン	4週						
	7週						
	13週	82 ↓	85 ↓				
A/G比	4週						
	7週						
	13週	131 ↑					
無機リン	4週						
	7週						
	13週						117 ↑
総ビリルビン	4週						
	7週			0 ↓			
	13週						
グルコース	4週						
	7週						
	13週					122 ↑	115 ↑
ALT	4週						
	7週				75 ↓		
	13週						
PL-CHE	4週		73 ↓	61 ↓		(84)	61 ↓
	7週		69 ↓	54 ↓		(87)	56 ↓
	13週		71 ↓	54 ↓		(81)	56 ↓
RBC-CHE	4週		(90)	37 ↓		(97)	29 ↓
	7週		(89)	32 ↓		(106)	27 ↓
	13週		(85)	28 ↓		(105)	19 ↓
BR-CHE	13週		(106)	65 ↓		(87)	45 ↓

Dunnett 検定 ↑ ↓: p < 0.05

表中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

( )内数値は比較のために算出した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

尿検査；全動物について投与開始3週間前、投与4、7、13週に、一晚絶食後、以下の検査項目を測定した。

pH、比重、グルコース、還元物質、ケトン体、尿蛋白、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン、沈渣

対照群と比べ統計学的有意差は認められなかった。

眼科学的検査；全動物について投与開始2週間前及び投与13週に検査した。

検体投与による影響は何ら認められなかった。

臓器重量；試験終了時、全動物を対象として、解剖ののち、以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

副腎、脳(脳幹を含む)、心臓、腎臓、肝臓(胆嚢を含む)、精巣(精巣上体を含む)、肺、卵巣、下垂体、前立腺、脾臓、甲状腺(上皮小体を含む)

対照群と比べ統計学的有意差のみられた項目を下表に示す。

性別		雄			雌		
投与量 (mg/kg/日)		0.3	1.0	3.0	0.3	1.0	3.0
最終体重							130 ↑
肝臓	絶対重量						128 ↑
	相対重量						(95)
脳	絶対重量						
	相対重量						71 ↓

Dunnett 検定 ↑ ↓:  $p < 0.05$

表中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

( )内数値は比較のために算出した。

3.0mg/kg/日群雌で肝臓重量が有意に増加したが、相対重量に変化はなかった。また脳相対重量も有意に減少していた。これらの変化は、有意に増加した最終体重を反映したものであると考えられ、検体投与による影響とは考えられなかった。

肉眼的病理検査；試験終了時、全動物を対象として検査を行なった。

検体投与による影響と考えられる所見は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

病理組織学的検査；試験終了時、全動物を対象として、以下の組織標本を作製し、鏡検した。

副腎、大動脈、骨髄、脳(脳幹を含む)、結腸、盲腸、直腸、十二指腸、空腸、回腸、食道、胆嚢、心臓、腎臓、肝臓、肺、腸間膜リンパ節、卵巣、前立腺、膵臓、下垂体、唾液腺(下顎)、坐骨神経、脾臓、胸骨(骨髄を含む)、胃、精巣(精巣上体を含む)、胸腺、甲状腺(上皮小体を含む)、気管、膀胱、子宮、肉眼的異常部

3.0mg/kg/日群雄2匹に膵臓の腺房細胞萎縮、1匹に肝臓の類洞細胞色素沈着が検体投与による影響として認められた。

以上の結果から、本剤のビーグル犬の13週間反復経口投与毒性試験における影響として

1.0mg/kg/日群以上で血漿コリンエステラーゼ活性の低下が認められ、さらに3.0mg/kg/日群では赤血球数、ヘマトクリット値の減少、赤血球及び脳コリンエステラーゼ活性の低下並びに肝臓及び膵臓に病理組織学的所見が認められたことにより、無影響量は雌雄ともに0.3-1.0mg/kg/日であると考えられた。

申請者注) 1990年に世界保健機関(WHO)が発表した「食品中の残留農薬の毒性学的評価の原理」(Environmental Health Criteria 104)に従い無毒性量(NOEL)を再評価した。WHO基準では血漿コリンエステラーゼ活性の阻害は毒性学的に有害作用とは考えておらず、脳コリンエステラーゼ活性の阻害が赤血球コリンエステラーゼ活性の阻害より安全性評価上極めて重要であるとされている。本試験の1.0mg/kg/日群では赤血球及び脳コリンエステラーゼ活性阻害に起因すると考えられる有害作用は認められず、臨床症状、体重増加量、摂餌量、血液学的検査項目、生化学的検査項目、臓器重量及び病理組織学的所見に影響は認められなかった。以上のことより、1.0mg/kg/日群での影響は有害作用と考えられず、無毒性量は雌雄ともに1.0mg/kg/日であると再評価された。

上記考察は平成20年のADI設定時には採用されなかったが、ARfD設定の為の無毒性量に関しては、「農薬の急性参照用量設定における基本的考え方」(平成26年2月14日農薬専門調査会決定)に従い、20%以上の脳ChE活性阻害を根拠とした1.0mg/kg/日が妥当と考える。

② ラットを用いた飼料混入投与による13週間反復経口投与毒性試験

(資料No. IV-2)

試験機関 : Hazleton Laboratories America, Inc. (GLP 対応)  
報告書作成年 : 1986 年

検体の純度 : %

供試動物 : SD(Cr1:CD BR)系ラット、1群雌雄各10匹、開始時8週齢  
(最高投与群には雌雄各10匹の回復群を設けた。)

開始時体重 : 雄 239.1-327.2g、雌 167.1-211.6g

投与期間 : 13週間+回復4週間(1985年6月19日-1985年9月18日)

投与方法 : 検体を0、1、5、25、125ppmの濃度で飼料に混入し、13週間にわたって随時摂食させた。回復群については検体を混入した飼料を13週間摂取させた後、飼料のみを4週間与えた。検体を混入した飼料は週1回調製した。

観察・検査項目及び結果 :

一般状態及び死亡率 ; 一般状態及び死亡は1日2回観察した。詳細な状態観察は1日1回行った。

試験期間を通じて125ppm群雌に振戦、尿による被毛の汚れがみられ、これらは投与による影響と思われた。全群の雌雄に脱毛、眼の異常(斜視、不透明、小型、腫脹)、流涙が散発的に認められたが、投与による影響とは考えられなかった。その他125ppm群雌の2-3匹で投与8、10週に衰弱がみられた。

試験期間中、死亡は認められなかった。

体重変化 ; 投与開始時、その後は毎週1回全生存動物の体重を測定した。

平均体重の変化を下表に示す。

性別	雄				雌			
	1	5	25	125	1	5	25	125
投与量 (ppm)	1	5	25	125	1	5	25	125
	7週							82↓
体重	13週							80↓

Dunnett検定 ↑↓ : p<0.05

表中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

125ppm群雌の投与7、13週の平均体重は対照群に比較して有意に低かった。雄の平均体重は全群とも類似していた。回復期間中の平均体重は、雌雄とも順調に増加した。

摂餌量 ; 全動物の摂餌量を毎週1回測定した。

検体投与による影響は認められなかった。

検体摂取量 ; 摂餌量及び飼料中検体濃度から算出した1日あたりの平均検体摂取量は以下の通りであった。

投与量 (ppm)		1	5	25	125
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	0.06	0.30	1.48	7.34
	雌	0.07	0.38	1.89	11.6

注) 申請者が報告書の表5より計算した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

血液学的検査;投与終了時(第14週)及び回復期間終了時(第18週)の全生存動物を対象として、  
一晩絶食後に眼窩静脈叢から採血し、以下の検査項目について測定した。

赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、白血球数、白血球百分比、  
血小板数

対照群と比べ統計学的有意差のみられた項目を下表に示す。

性別	雄				雌			
	1	5	25	125	1	5	25	125
赤血球	14週			94↓				88↓
	18週	-	-	(98)	-	-	-	(97)
ヘモグロビン	14週							89↓
	18週	-	-	-	-	-	-	(99)
ヘマトクリット	14週							90↓
	18週	-	-	-	-	-	-	(101)

Dunnett 検定 ↑ ↓ : p<0.05

- : 測定せず ( ) : 参考値

表中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

18週の値は14週の対照群に対する変動率(%)を表す。

投与終了時に125ppm群雌雄で赤血球数、雌でヘモグロビン量及びヘマトクリット  
値の有意な減少がみられた。回復期間終了時には何ら変化は認められなかった。

血液生化学的検査;投与終了時(第14週)及び回復期間終了時(第18週)の全生存動物を対象と  
して、一晩絶食後に眼窩静脈叢から採血し、以下の検査項目について測定した。

Ca、P、Cl、Na、K、グルコース、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、  
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、アルカリフォスファターゼ  
(ALP)、尿素窒素、アルブミン、グロブリン、総蛋白、クレアチニン、総ビ  
リルビン

さらに投与開始時、投与4、7週、投与終了時及び回復期間終了時、一晩絶食後に  
全生存動物を対象として血漿コリンエステラーゼ(PL-CHE)、赤血球コリンエステラ  
ーゼ(RBC-CHE)を測定した。脳コリンエステラーゼ(BR-CHE)は投与終了時及び回復  
期間終了時にのみ測定した。

対照群と比べ統計学的有意差のみられた項目を下表に示す。

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		1	5	25	125	1	5	25	125
グルコース	14 週								84 ↓
	18 週	-	-	-		-	-	-	(98)
PL-CHE	4 週				70 ↓				59 ↓
	7 週				56 ↓				49 ↓
	14 週				70 ↓				52 ↓
	18 週	-	-	-	(91)	-	-	-	(106)
RBC-CHE	4 週			49 ↓	20 ↓			53 ↓	16 ↓
	7 週			54 ↓	26 ↓			51 ↓	23 ↓
	14 週			58 ↓	29 ↓			57 ↓	25 ↓
	18 週	-	-	-	(96)	-	-	-	(94)
BR-CHE	14 週			(96)	65 ↓			(99)	40 ↓
	18 週	-	-	-	(89)	-	-	-	(88)

Dunnett 検定 ↑ ↓ : p<0.05

- : 測定せず ( ) : 参考値

表中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

18 週のは 14 週の対照群に対する変動率(%)を表す。

125ppm 群雌では、投与終了時にグルコースの有意な減少が認められた。回復期間終了時に異常は認められなかった。125ppm 群雌雄では、投与期間を通じて、血漿及び赤血球コリンエステラーゼ活性が有意に低下し、投与終了時には脳コリンエステラーゼ活性も有意に低下した。25ppm 群雌雄では、投与期間を通じて赤血球コリンエステラーゼ活性が有意に低下した。回復期間終了時には、血漿、赤血球及び脳コリンエステラーゼ活性とも対照群とほぼ同等であった。

眼科学的検査；投与開始前、投与終了時（第 13 週）及び回復期間終了時（第 17 週）の全生存動物を対象に、1%トロピカミドを点眼後、間接検眼鏡を用いて眼の検査を実施した。投与に関連した影響は認められなかった。

臓器重量；投与終了時（第 14 週）及び回復期間終了時（第 18 週）の全生存動物を対象として、解剖ののち、以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

副腎、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、卵巣、下垂体、脾臓、精巣（精巣上体を含む）、胸腺、甲状腺（上皮小体を含む）

対照群と比べ統計学的有意差のみられた項目を下表に示す。

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		1	5	25	125	1	5	25	125
対 体 重 比	最終体重	14 週							81 ↓
	肺	14 週							125 ↑
	肝臓	14 週							119 ↑
	脾臓	14 週							117 ↑
	腎臓	14 週							127 ↑
	脳	14 週							122 ↑
	心臓	14 週							120 ↑
	副腎	14 週							139 ↑

Dunnett 検定 ↑ ↓ : p<0.05

表中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

125ppm 群雌では、投与終了時に肺、肝臓、脾臓、腎臓、脳、心臓、副腎のいずれも対体重比が対照群と比較して有意に増加したが、これは体重の減少によるものと考えられた。

肉眼的病理検査；投与終了時及び回復期間終了時の全生存動物を対象として検査を行なった。

検体投与による影響は認められなかった。

病理組織学的検査；全動物を対象として、以下の臓器の病理標本を作成し、鏡検した。

胸部大動脈、大腿骨/骨髓、結腸、盲腸、直腸、十二指腸、空腸、回腸、食道、涙腺、眼、大腿骨、リンパ節(腸間膜)、乳腺、膵臓、唾液腺(下顎)、坐骨神経、皮膚、脊髄、胃、大腿筋組織、気管、膀胱、子宮、副腎、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、卵巣、下垂体、脾臓、精巣(精巣上体を含む)、胸腺、甲状腺(上皮小体を含む)

対照群と比べ統計学的有意差のみられた項目を下表に示す。

性別		雄					雌					
投与量 (ppm)		0	1	5	25	125	0	1	5	25	125	
脾臓	色素沈着	14 週			1		1	9	10	10	9	10
	増加	18 週	-	-	-	-	10	-	-	-	-	10

-: 測定せず 空欄は「0」を示す。

表中の数値は動物数を表す。

投与終了時(第14週)及び回復期間終了時(第18週)に、投与に関連した所見として、脾臓の色素沈着増加が雌の全群と雄の回復群に認められた。

この所見を軽微(+1)、軽度(+2)、中程度(+3)、高度(+4)の分類で評価し、程度の平均値を下表に示した。

性別		雄					雌					
投与量 (ppm)		0	1	5	25	125	0	1	5	25	125	
脾臓	色素沈着	14 週	0	0	0.2	0	0.2	1.1	1.5	1.8↑	1.9↑	1.9↑
	増加	18 週	-	-	-	-	1.8	-	-	-	-	3.3

RIDI法 ↑ ↓ : p<0.05

-: 測定せず

脾臓の色素沈着増加は、雌において顕著であった。125ppm 群雌の投与終了時の色素沈着増加は、赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリット値の有意な低下に関連すると考えられた。5、25ppm 群雌の色素沈着増加は、赤血球数及びヘモグロビン濃度が正常範囲内であることから、その生物学的意義は明らかではなかった。また、回復期間終了時の雌雄ラットにおける脾臓の色素沈着増加も赤血球数やヘモグロビン濃度は正常範囲内であったことから、毒性の遅発効果を示しているのではなく、投与終了時の影響が累積されたものと考えられた。

その他の病変は検体投与に関連するものではないと考えられた。

以上の結果から、本剤のラットにおける13週間反復経口投与毒性試験における影響として、125ppm 群に体重減少(雌のみ)、赤血球系パラメータの低下、血漿、赤血球及び脳コリンエステラーゼ活性の低下並びに脾臓の色素沈着増加が認められ、また25ppm 群に赤血球コリンエステラーゼ活性の低下が認められたことより、無影響量は5ppm(雄0.30mg/kg/日、雌0.38mg/kg/日)であると考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

申請者注) 1990年に世界保健機関(WHO)が発表した「食品中の残留農薬の毒性学的評価の原理」(Environmental Health Criteria 104)に従い無毒性量(NOEL)を再評価した。WHO基準では血漿コリンエステラーゼ活性の阻害は毒性学的に有害作用とは考えておらず、脳コリンエステラーゼ活性の阻害が赤血球コリンエステラーゼ活性の阻害より安全性評価上極めて重要であるとされている。本試験の25ppm群では赤血球及び脳コリンエステラーゼ活性阻害に起因すると考えられる有害作用は何ら認められず、臨床症状、体重増加量、摂餌量、血液学的検査項目、生化学的検査項目及び臓器重量にも影響は認められなかった。さらに本剤におけるコリンエステラーゼ活性阻害は可逆的で、4週間の回復期間終了後には正常であった。同群の雌のみに脾臓におけるヘモジデリン沈着程度の増強が認められたが、赤血球パラメータは正常値であり、骨髄における造血の代償性反応も認められなかった。以上のことより、25ppm群における変化は有害作用と考えられず、無毒性量は25ppm(雄 1.48mg/kg/日、雌 1.89mg/kg/日)であると再評価された。

上記考察は平成20年のADI設定時には採用されなかったが、ARfD設定の為の無毒性量に関しては、「農薬の急性参照用量設定における基本的考え方」(平成26年2月14日農薬専門調査会決定)に従い、20%以上の脳ChE活性阻害を根拠とした25ppm(雄 1.48mg/kg/日、雌 1.89mg/kg/日)が妥当と考える。