

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

(3) 急性神経毒性

ラットにおける急性神経毒性試験

(資料 T8)

試験機関：

(GLP 対応)

報告書作成年：2004 年

被験物質：イミシアホス原体

供試動物：Crl:CD*(SD)IGS BR 系ラット、5～6 週齢、

体重：雄 124～186 g、雌 105～167 g、1 群雄雌各 10 匹

試験期間：14 日間観察

(本試験 2003 年 3 月 18 日～4 月 4 日、追加試験 2003 年 12 月 2 日～12 月 17 日)

投与方法：被験物質を PEG400 に溶解し、6.25、25 及び 100 mg/kg の用量を 1 回経口投与した。絶食時の個体別体重に基づいて、4 ml/kg の容量を単回経口投与した。

100 mg/kg 投与群については、雄 5 匹に被験物質を投与後に強い毒性がみられたため、残りの 5 匹及び雌 10 匹には 60 mg/kg を投与した。観察期間終了時の解剖で、雄の脳重量に用量相関性のない変化がみられたため、雄のみ、1 群 10 匹を用いて追加試験を実施した。追加試験の高用量群については、60 mg/kg を投与した。試験群の詳細は、下表の通りである。

表 1：試験群と供試動物数

性別	雄					雌			
	試験群	対照	低用量	中用量	高用量	対照	低用量	中用量	高用量
投与量 (mg/kg)	0	6.25	25	60	100	0	6.25	25	60
本試験	10 (5)	10 (5)	10 (5)	5 (5)	5 (5)	10 (5)	10 (5)	10 (5)	10 (5)
追加試験	10 (5)	10 (5)	10 (5)	10 (5)	—	—	—	—	—

() は灌流固定に供した動物数

用量設定根拠：

観察・検査項目及び結果：

死亡率；生死を 14 日間毎日観察した。

本試験；100 mg/kg 投与群雄では、投与直後から重篤な症状がみられたため、投与後 5.5 時間に安楽死させた。投与量を 60 mg/kg に下げた後、高用量群に死亡はみられなかった。その他の投与群には、死亡はみられなかった。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

追加試験；いずれの投与群にも、死亡はみられなかった。

一般状態； 被験物質投与後、毎日毒性徴候及び健康状態等を観察した。

本試験；100 mg/kg 投与群雄では、投与後約5時間までに円背位、無気力、立毛、呼吸状態の変化、開脚歩行、排尿過多及び被毛の湿りなどがみられ、瀕死状態に陥ったため屠殺し、高用量群の残りの雄及び高用量群の全ての雌については、用量を60 mg/kg に下げた。これらの動物でも第1日以降、つま先歩行、円背位、立毛、無気力、眼球突出、脱水症状及び頻呼吸などがみられた。観察された徴候は雌よりも雄で重篤であったが、雄雌共に回復して11日までには症状は消失した。25 mg/kg 投与群雌2例において、1及び2日のみに円背位がみられた。6.25 mg/kg 群には、明らかな臨床症状の変化は認められなかった。

追加試験；60 mg/kg 投与群雄では、円背位、立毛、無気力、開脚歩行、眼球突出、流涎、流涙、体毛の汚れ等のほか、投与当日一時的な振戦が認められた。これらの症状は回復し、3日には円背位、つま先歩行及び眼球突出のみとなった。全ての動物は、4日までに対照群と同等になった。25及び6.25 mg/kg 投与群の動物では、症状は認められなかった。

体重変化；試験0日(被験物質投与前)、7日及び14日に生存する全ての動物の体重を測定した。

本試験；60 mg/kg 投与群雄の第1週には、統計学的に有意な体重増加抑制 ($p < 0.001$) が認められたが、第2週の体重増加量は対照群と同等であった。60 mg/kg 投与群の雌及び25または6.25 mg/kg 投与群雌では、体重増加量は対照群と同等であった。

追加試験；本試験と同様、60 mg/kg 投与群雄では第1週の体重増加量が有意に低かった。同群の第2週及び他の投与群の体重増加量は、対照群と同等であった。

表2：被験物質投与後の体重推移

	投与量 (mg/kg)	動物数 (雄/雌)	雄			雌		
			0日	7日	14日	0日	7日	14日
本試験	0	10/10	145 (-)	205 (60)	267 (61)	140 (-)	171 (31)	198 (27)
	6.25	10/10	148 (-)	206 (58)	263 (57)	132 (-)	168 (37)	188 (20)
	25	10/10	148 (-)	208 (60)	269 (61)	141 (-)	171 (30)	195 (24)
	60(100)	10(5)/10	143 (-)	182 (37♣)	242 (60)	129 (-)	158 (29)	183 (24)
追加試験	0	10/10	158 (-)	218 (59)	277 (60)	-	-	-
	6.25	10/10	160 (-)	221 (61)	280 (59)	-	-	-
	25	10/10	160 (-)	218 (58)	278 (60)	-	-	-
	60	10/10	167 (-)	204 (38♣)	267 (63)	-	-	-

♣： $p < 0.001$ (Dunnettの検定またはMann-WhitneyのU検定)
上段は平均体重(g)、下段は平均体重増加量(g)

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

詳細な状態の観察；投与開始前、投与後 2 時間、5 時間、7 日及び 14 日に生存動物全例を対象に以下の観察を行った。

外観（皮膚、被毛の状態、眼瞼閉鎖）、体位・姿勢、自律神経系（体温、流涙、立毛、排泄状態、眼球突出）、運動協調性、歩行異常、奇異／異常／常同行動、神経系（振戦、痙攣、筋収縮）、覚醒移動、挙尾、呼吸の状態等

観察された所見及び発現頻度を表 3～5 に示す。

本試験；100 mg/kg を投与した雄における投与後 5 時間の所見が、最も重篤であった。開脚歩行／つま先歩行、円背位、呼吸状態の変化及び流涎増過多の症状がみられた。これらの動物を直ちに屠殺した。

60 mg/kg を投与した動物でも、投与後 2 及び 5 時間につま先歩行、円背位及び呼吸増加がみられた。7 日には、円背位及びつま先歩行が各 1 例認められるのみで、14 日には消失した。

25 mg/kg 投与群では、投与後 5 時間まで円背位、つま先歩行、開脚歩行、呼吸状態の変化といった症状がみられ、これらは雄の方が重篤であった。このような症状は 7 及び 14 日の観察ではみられなかった。

6.25 mg/kg 投与群では、円背位及びつま先歩行が投与後 5 時間に雄 2 例に認められたのみで、発現数が少なく、継続した所見ではないことから、偶発的なものまたは毒性学的意義がないものと考えられた。

追加試験；観察された症状の種類や発現頻度は、本試験と類似していた。60 mg/kg 投与群では円背位、立毛、流涙、つま先歩行、開脚歩行及び呼吸数増加などの症状がみられた。7 日における症状は眼球突出のみで、14 日には異常は認められなかった。

25 mg/kg 投与群では、投与後 2 及び 5 時間に円背位が認められた。

6.25 mg/kg 投与群では、異常は認められなかった。

機能検査；投与開始前、投与後 2 時間、5 時間、7 日及び 14 日に生存動物全例を対象に以下の検査を行った。

- 自発運動量 — 自動赤外線運動量測定装置（1 時間計測）
- 握力（前肢及び後肢） — 握力計
- 握り反応 — 動物の体躯を握った時の反応
- 発声 — 観察期間中の発声の有無
- つま先痛覚 — ピンセットでつま先を挟んだ時の反応
- 尾痛覚 — ピンセットで尾の先端部を挟んだ時の反応
- 指先視認 — 動物の顔の先に指をかざし、指を動かした時の反応
- 逃避行動 — 動物に触れようとした時の反応
- 瞳孔反射 — 暗所で光を当てたときの瞳孔の状態
- 瞬膜反射 — 目に触れようとした時の反応
- 驚愕反射 — 音に対する反応、自動計測

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

握力及び自発運動量を表 6、各種刺激に対する反応を表 7~9 及び聴覚反応を表 10 に示す。

本試験；前肢及び後肢握力には、雄雌とも被験物質投与の影響は認められなかった。

60 mg/kg 投与群雌において、被験物質投与後 2 時間に有意な活動時間の増加がみられた。また、同群雄では、14 日に移動時間の有意な増加がみられた。その他の投与群には、対照群と比較して有意差はみられなかった。

100 mg/kg 投与群では、投与後 5 時間につま先痛覚、尾痛覚、指先視認、逃避行動の低下がみられた。60 mg/kg 投与群を含めて、その他の投与群の刺激に対する反応には、被験物質投与の影響はみられなかった。

聴覚刺激に対する反応には、被験物質投与の影響はみられなかった。

追加試験；握力には、被験物質投与の影響はみられなかった。

60 mg/kg 投与群において、被験物質投与後 2 時間に活動時間の有意な増加がみられた。その他の投与群の自発運動量及び各種刺激に対する反応には、被験物質投与の影響はみられなかった。

聴覚刺激に対する反応では、60 mg/kg 投与群で投与後 2 時間に有意な低下がみられたが、測定値は対照群の本試験と同等な値であった。その他の群には、被験物質の影響はみられなかった。

病理学的検査；観察期間終了時に全例を屠殺剖検した。各群雄雌各 5 例（但し、高用量群は 100 mg/kg を投与し、投与当日屠殺した 5 例を含めて雄雌全例）について、麻酔し、生理食塩液で還流した後、グルタルアルデヒド：ホルマリン溶液で還流固定した。これらの動物について、剖検後、以下の臓器器官を採取し、パラフィン切片作成後、HE 染色標本を作製した。対照群及び高用量群について、鏡検した。

- | | | |
|----------|---|--------------------------------|
| 驚愕反射 | — | 音に対する反応、自動計測 |
| 脳 | — | 嗅球、大脳の前脳中心部（海馬を含む）、中脳、小脳、橋及び延髄 |
| 後根神経節 | — | 頸部及び腰部 |
| 背根及び腹根線維 | — | 縦頸部及び腰部切片縦断面 |
| 眼 球 | — | 縦断面 |
| 視神経 | — | 縦断面 |
| 坐骨神経 | — | 近位一縦及び横断面 |
| 脛骨神経 | — | 近位(膝部)及び腓腹筋分岐部一縦及び横断面 |
| 骨格(腓腹)筋 | — | 横断面 |
| 脊 髄 | — | 頸部及び腰部の縦及び横断面 |

また、還流固定した動物の脳について、重量を測定し、剖検時体重から体重比重量を算出した。

還流固定しなかった動物は、屠殺後、肉眼的病理検査を実施したが、その他の検査は実施しなかった。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

各群の平均脳重量及び対体重比を表 10 に示す。

本試験:被験物質投与群雄において、統計学的に有意な脳重量の増加が認められた。しかし、用量相関性は認められず、雌では同様の変化は認められなかった。
肉眼的病理検査及び病理組織学的検査では、100 mg/kg を投与し、切迫屠殺した雄 5 例を含めて、いずれの動物にも被験物質投与と関連する所見は認められなかった。
よって、被験物質投与群雄において認められた脳重量の増加は、被験物質投与とは関連しないものと考えられた。

追加試験;脳重量には、被験物質投与の影響は認められなかった。肉眼的病理検査及び病理組織学的検査では、いずれの動物にも被験物質投与と関連する所見は認められなかった。

以上の結果から、致死量に近い用量 (100 及び 60 mg/kg) を投与した場合、体重増加抑制の他、歩行異常、円背位、流涎、自発運動の低下、痛覚反応の低下、逃避行動低下、聴覚反応低下等の被験物質投与と関連する神経症状が認められ、25 mg/kg でも歩行異常、円背位、呼吸数の変化が認められたため、本試験における無毒性量は 6.25 mg/kg と考えられる。しかし、いずれの投与群にも神経病理組織学的な変化は認められなかった。

表 3: 雄において観察された所見及び頻度 [本試験]

性別	投与量 (mg/kg)	0					6.25					25					100/60					
		0 h	2 h	5 h	7 日	14 日	0 h	2 h	5 h	7 日	14 日	0 h	2 h	5 h	7 日	14 日	0 h	2 h	5 h	7 日	14 日	
雄	歩行異常 (0~8)	0	10	10	10	10	10	10	9	10	10	10	9	5	10	10	10	7			5	5
		Wt							1				1	4				2	6			
	Ws												1					1	4			
	異常行動	0	10	10	10	10	10	10	8	10	10	10	9	2	10	10	10	7	1	5	5	
		H							2				1	8				3	9			
	流涎 (0~4)	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	8	10	5	5	
		2																2				
	呼吸異常	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	10	10	10	10	7	5	5	
		RI												1					2			
		Rd																	1			
	排尿 (回数)	0	8	8	7	8	10	7	7	9	9	10	7	6	6	8	8	8	6	8	5	4
		1	2	2	3	2		3	3	1	1		3	3	3	2	2	2	4	1		1
		3																		1		
	排便 (回数)	0	10	9	5	9	10	10	9	8	9	9	10	9	6	9	9	9	6	10	3	4
		1			3	1			1		1			1	2	1		1	4		2	1
		2		1	1					1					1		1					
		4								1					1							
		5			1																	
	覚醒移動 (0~8)	0												1						2		
		2			1		1		2	3		1		1	2		3		5	7	2	1
4		10	10	9	10	9	10	8	7	10	9	10	9	7	10	7	9	4	1	3	4	
6																	1	1				

Wt: つま先歩行、Ws: 開脚歩行、H: 円背位、RI: 努力呼吸、Rd: 呼吸数低下

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

表 4：雌において観察された所見及び頻度〔本試験〕

性別	投与量 (mg/kg)	0					6.25					25					60					
		経過時間					経過時間					経過時間					経過時間					
		0	2	5	7	14	0	2	5	7	14	0	2	5	7	14	0	2	5	7	14	
		h	h	h	日	日	h	h	h	日	日	h	h	h	日	日	h	h	h	日	日	
雌	歩行異常 (0~8)	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	10	10	10	5	2	8	10
		Wt													1				5	8	2	
		Ws																	1			
	異常行動	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5	10	10	10	10	10	2	10
		H													5				10	10	8	
	呼吸異常	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	10	10	10	9	10	10	10
		Ri													1				1			
	排 尿 (回数)	0	7	7	10	8	7	7	10	10	8	8	8	8	9	7	10	7	9	9	8	9
		1	3	2		2	3	3			2	2	2	1	1	3		3	1	1	2	1
		7		1																		
	排 糞 (回数)	0	9	10	10	10	10	7	10	7	9	10	10	10	7	10	10	7	5	7	10	10
		1	1					3		2	1		0		2			3	4	1		
		2																	1	1		
		3								1												
		4																		1		
		6													1							
	覚醒移動 (0~8)	0																				
		2					1			1					1	1	1		2	2	1	1
4		10	10	10	10	9	8	10	9	10	9	10	10	9	9	9	10	8	8	9	9	
	6					2				1												

Wt: つま先歩行、Ws: 開脚歩行、H: 円背位、Ri: 呼吸数増加

表 5：雄において観察された所見及び頻度〔追加試験〕

性別	投与量 (mg/kg)	0					6.25					25					60						
		経過時間					経過時間					経過時間					経過時間						
		0	2	5	7	14	0	2	5	7	14	0	2	5	7	14	0	2	5	7	14		
		h	h	h	日	日	h	h	h	日	日	h	h	h	日	日	h	h	h	日	日		
雄	歩行異常 (0~8)	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	8	1	10	10	
		Wt																	2	7			
		Ws																		2			
	異常行動	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	7	10	10	10	6	1	10	10	
		H												1	3				4	9			
	呼吸異常	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	7	6	10	10	
		Rd																	3	4			
		Ri																					
	排 尿 (回数)	0	9	8	8	8	9	10	9	9	10	10	9	5	7	9	9	8	2	7	6	10	
		1	1	2	1	2	1		1	1			1	4	3	1	1	2	8	1	4		
		2												1						1			
		3			1															1			
	排 糞 (回数)	0	8	8	8	4	9	8	7	5	4	9	9	7	2	5	7	8	4	4	5	4	
		1	2	1		5		2	2	1	4		1	2	4	3	2	2	2	3	3	1	
		2		1	2	1			1	3				1		1		2	1	1	3		
		3					1				1				3				1			1	
		4																			1	1	
		5								1						1		1	1	1			
6										1	1												
7																1							
9																			1				
覚醒移動 (0~8)	0																	3					
	2		2	2	1	2		3		3	2		2	3	6	1		1	7	2	4		
	4	10	8	8	9	8	10	7	9	7	8	10	8	7	4	9	10	6	3	8	6		
	6							1															
立 毛 (1~4)	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	10	10	10		
	2																	1					
流 涙	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	10	10		
	+																	1	1				
眼球突出	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	10		
	+																			1			

Wt: つま先歩行、Ws: 開脚歩行、H: 円背位、Ri: 呼吸数増加、Rd: 呼吸数低下

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

表 6 : 握力及び自発運動量の推移

検査項目	投与量 (mg/kg)	雄				雌				雄 (追加試験)			
		0	6.25	25	100/ 60	0	6.25	25	60	0	6.25	25	60
前肢握力 (g)	0時間	291	324	304	279	407	410	419	409	524	439	524	531
	2時間	321	355	323	337	306	431	389	374	481	424	431	449
	5時間	280	281	282	270	345	349	360	370	480	446	430	473
	7日	507	540	468	507	402	389	423	369	507	491	500	522
	14日	476	449	450	456	451	454	443	422	629	605	599	654
後肢握力 (g)	0時間	154	134	135	148	139	120	133	137	221	184	199	199
	2時間	130	127	136	142	107	121	122	112	179	170	209	204
	5時間	137	142	132	140	100	117	113	114	236	234	215	212
	7日	168	168	153	147	142	145	141	127	224	228	237	238
	14日	183	191	198	187	164	168	156	149	288	267	271	254
観察期間中 の活動時間 (%)	0時間	32.6	27.0	28.8	33.6	31.1	31.8	31.2	33.0	45.3	37.3	40.3	39.6
	2時間	13.1	14.3	13.5	15.4	11.6	24.9	24.8	23.6	27.7	24.3	13.0	19.9
	5時間	28.3	22.3	18.5	19.6	17.4	12.2	22.1	27.4	19.3	13.2	17.0	10.9
	7日	19.8	25.3	22.2	24.8	24.9	28.3	35.2	36.7	30.4	26.5	31.9	25.5
	14日	23.1	30.5	24.1	20.5	30.4	22.4	35.1	25.8	21.4	19.7	27.7	30.2
観察期間中 の移動時間 (%)	0時間	6.7	7.3	7.6	9.4	8.5	9.5	8.4	10.6	11.7	10.5	10.3	12.2
	2時間	1.5	2.1	2.4	2.7	1.8	2.6	2.2	03.5	1.0	1.4	1.2	02.4
	5時間	2.0	3.2	3.1	6.7	2.4	1.9	2.6	3.7	1.9	1.6	1.9	1.8
	7日	4.2	6.9	4.9	6.8	5.0	6.4	6.8	6.7	6.0	6.1	4.8	7.2
	14日	3.5	4.1	5.1	16.4	8.9	6.1	8.5	7.0	4.8	7.0	5.0	6.4

† : p<0.05, ♂ : p<0.01 (Dunnett の検定または Mann-Whitney の U 検定)

表 7 : 雄における各種刺激に対する反応

性別	投与量 (mg/kg)	雄																		
		0					6.25					25					100/60			
項目及び評点	0	2	5	7	14	0	2	5	7	14	0	2	5	7	14	0	2	5	7	14
	h	h	h	日	日	h	h	h	日	日	h	h	h	日	日	h	h	h	日	日
握り反応 (0~6)	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5	5
発声 (0~6)	0	6	10	10	10	10	8	9	9	10	8	9	10	8	10	9	9	10	5	5
	1	4					2	1	1		1	1		1		1	1			
つま先痛覚 (0~6)	0																		2	
	2													1						
	4			1																
尾痛覚 (0~6)	0																		2	
	2													1					1	
	4	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	10	10	10	10	8	5	5
指先視認 (0~6)	0																		2	
	2	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	10	10	10	10	8	5	5
	6												1							
逃避行動 (0~6)	0																		2	
	2												2						2	
	4	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	7	10	10	8	9	6	5	5
瞳孔反射 (0~6)	0																			
	2	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5	5
	6																			
瞬膜反射 (0~6)	0																			
	2	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5	5
	6																			

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

表 8 : 雌における各種刺激に対する反応

性別	雌																				
	0					6.25					25					60					
投与量 (mg/kg)	0	2	5	7	14	0	2	5	7	14	0	2	5	7	14	0	2	5	7	14	
項目及び評点	h	h	h	日	日	h	h	h	日	日	h	h	h	日	日	h	h	h	日	日	
握り反応 (0~6)	0	10	10	10	10	10	9	10	10	10	10	8	9	10	10	10	10	10	10	10	
	2						1					2	1								
発声 (0~6)	0	3	5	5	7	7	2	7	10	4	5	5	5	7	6	7	3	8	8	6	9
	1	6	5	4	3	3	8	2		6	4	4	1	3	4	1	3	2	2	2	1
	2	1		1				1			1	1	3			2	3			2	
	3											1					1				
つま先痛覚 (0~6)	2						1														
	4							1													
	6	10	10	10	10	10	10	9	9	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
尾痛覚 (0~6)	2	1						1											1		
	4	9	10	10	10	10	10	10	9	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	10	10
指先視認 (0~6)	2	9	10	10	10	10	10	9	8	10	10	10	9	9	9	10	10	10	8	10	10
	4	1						1													
	6						1	1				1	1	1					2		
逃避行動 (0~6)	2							1				1							1		
	4	8	8	10	9	10	9	8	8	9	10	8	8	9	10	9	9	10	9	10	10
	6	2	2		1		1	2	1	1		2	1	1		1	1				
瞳孔反射 (0~6)	4	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
瞬膜反射 (0~6)	4	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

表 9 : 雄 (追加試験) における各種刺激に対する反応

性別	雄 (追加試験)																				
	0					6.25					25					60					
投与量 (mg/kg)	0	2	5	7	14	0	2	5	7	14	0	2	5	7	14	0	2	5	7	14	
項目及び評点	h	h	h	日	日	h	h	h	日	日	h	h	h	日	日	h	h	h	日	日	
握り反応 (0~6)	0	6	10	10	10	10	5	10	10	10	10	7	10	10	10	10	8	10	10	10	10
	1	1																			
	2	3				5					2					2					
	4										1										
発声 (0~6)	0	6	6	7	5	8	5	8	9	10	9	6	8	7	6	9	8	10	9	9	10
	1	2	3	2	5	2	4	2	1		1	2	1	1	4	1	2		1	1	
	2	2	1	1			1					1		1							
	3												1	1							
	4											1									
つま先痛覚 (0~6)	2						1				2					3			1		
	4									1		1					4	1			
	6	10	10	10	10	10	10	9	10	10	9	8	9	10	10	10	7	6	9	9	10
尾痛覚 (0~6)	2										2					2					
	4	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	8	10	10	10	10	8	10	10	10	10
指先視認 (0~6)	2	10	10	10	10	10	7	10	10	9	10	9	10	10	10	10	8	10	10	10	10
	4															1					
	6					3			1		1					1					
逃避行動 (0~6)	4	9	5	9	8	9	7	9	9	8	10	6	8	8	8	7	5	10	9	7	10
	6	1	5	1	2	1	3	1	1	2		4	2	2	2	3	4		1	3	
瞳孔反射 (0~6)	4	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
瞬膜反射 (0~6)	4	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

表 10 : 脳重量 (g) 及び対体重比 (g/100g)

性 別		雄				雌			
投与量 (mg/kg)		0	6.25	25	100/60	0	6.25	25	60
本試験	湿重量	1.608	↑2.229	↑2.150	↑2.196	2.024	2.051	2.046	2.052
	対体重比	0.610	◆0.820	◆0.824	◆0.883	1.041	1.121	1.076	1.106
追加試験	湿重量	2.352	2.276	2.302	2.343	—	—	—	—
	対体重比	0.850	0.793	0.832	0.853	—	—	—	—

↑ : p<0.01, ◆ : p<0.001 (Dunnett の検定または Mann-Whitney の U 検定)

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

(4) 急性遅発性神経毒性

ニワトリを用いた遅発性神経毒性試験

(資料 T9)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2005 年

被験物質：イミシアホス原体

第 1 相 (用量設定試験)

供試動物：単冠白色レグホーン (*Gallus gallus domesticus*)

急性毒性試験；10 ヶ月齢産卵鶏、1 群 5 羽、体重；1131～1709 g、

アトロピン防御試験；11 ヶ月齢産卵鶏、1 群 5 羽、体重；1132～1605 g

試験期間：急性毒性試験；7 日間観察 (2002 年 3 月 26 日～4 月 2 日)

アトロピン防御試験；7 日間観察 (2002 年 4 月 10 日～17 日)

試験方法：急性毒性試験；被験物質原体を脱イオン水に溶解し、1、2、4、8、16 及び 32 mg/kg の用量を絶食した試験鳥に経口投与した。対照群には脱イオン水を同様に投与した。被験物質を投与後 7 日間、症状を観察するとともに、体重及び摂餌量を測定した。7 日間の累積死亡率から LD₅₀ 値を算出した。

アトロピン防御試験；急性毒性試験で求められた LD₅₀ 値相当量 (13 mg/kg) 及びその 2 倍量 (26 mg/kg) を絶食した試験鳥に経口投与し、同時に硫酸アトロピン (5 mg/kg) を胸部の筋肉内に投与した。その後症状を個別に観察しながら、72 時間まで、最大 1 日 3 回硫酸アトロピン (2 または 5 mg/kg) を筋肉内投与し、症状の軽減に対する効果について検討した。動物は被験物質投与後 7 日間観察した。

試験結果：急性毒性試験；対照群に死亡は認められなかった。試験第 2 日に跛行が 1 例認められた以外は、試験期間を通じて対照群の鶏の外観および行動は正常であった。また、1、2 および 4 mg/kg 投与群でも死亡はみられなかった。しかし、8 mg/kg 群では死亡率 20% (1/5)、16 mg/kg 群では死亡率 60% (3/5)、そして 32 mg/kg 群では死亡率 100% (5/5) であった。LD₅₀ 値は約 13 mg/kg (95%信頼限界 8～22 mg/kg) であった。

アトロピン防御試験；13 および 26 mg/kg 投与群で死亡は認められなかった。13 mg/kg 投与群では、投与後約 20 分に毒性徴候が発現し、全例に軽度の協調運動失調、外部刺激に対する反応の低下 (首および動き)、羽毛の逆立ち、嗜眠、鬱状態、協調運動失調、脚力低下、伏臥状態および正向反射の喪失が観察された。投与当日、2 または 3 回アトロピンの追加注射を行った。第 1 日にはアトロピンを 2 回注射、第 2 日には 1 回注射した。試験第 2 および 3 日にも毒性徴候は継続して観察されたが、すべての鶏の症状は改善し、第 2 日の午後までには起立歩行がみられた。第 5 日にはすべての鶏の外観および動作は正常となり、その後は試験期間を通じて異常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および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

26 mg/kg 投与群では、投与後約 3 分に毒性徴候が発現し、外部刺激に対する反応の低下、伏臥姿勢、協調運動失調、鬱状態、脚力低下、伏臥状態、昏眠、正向反射の喪失、瀕死状態が認められた。試験第 0 日にアトロピンの追加注射を 3 回、第 1 および 2 日に 2 回、第 3 日に 1 回注射した。第 3 日の午後までにすべての鶏が直立できるようになり、第 5 日の午後までにはすべてが起立歩行するようになった。したがって、硫酸アトロピンの筋肉内投与により、被験物質投与により発現した症状を軽減するとともに死亡発現を軽減できると判断された。

第 2 相 (急性遅発性神経毒性試験)

供試動物：単冠白色レグホーン (*Gallus gallus domesticus*)

本試験；11ヶ月齢産卵鶏、1群 20羽 (対照群 15羽、陽性対照群 12羽)、
体重；1242～1604g

追加試験；9ヶ月齢産卵鶏、1群 24羽 (対照群 10羽、陽性対照群 23羽)、
体重；1309～2060g

試験期間：本試験； 21日間観察 (2002年4月22日～5月14日)

追加試験； 28日間観察 (2003年4月14日～5月15日)

投与方法：

本試験；被験物質原体を脱イオン水に溶解し、約 18 時間絶食した試験鳥に 26 mg/kg の用量でステンレス製カニューレを用いて、素嚢内に投与した。被験物質投与前に硫酸アトロピン 5 mg/kg を筋肉内投与し、さらに症状に応じて投与当日及び翌日硫酸アトロピンを 1～3 回投与 (2 または 5 mg/kg) した。溶媒対照群には脱イオン水、陽性対照群 I には 800 mg/kg の TOCP (tri-ortho cresyl phosphate) をコーン油に溶解して経口投与した。但し、陽性対照群 I では、明らかな遅発性神経毒性症状が認められなかったため、別に陽性対照群 II を設定し、同用量の TOCP 原液を経口投与した。

追加試験；本試験において、脳及び脊髄のアセチルコリンエステラーゼ (以下 AChE) 及び神経毒エステラーゼ (以下 NTE) 活性に被験物質の有意な影響がみられたため、無影響用量及び回復性を検討するための追加試験を実施した。脱イオン水に溶解した被験物質を約 16.5 時間絶食した試験鳥に 0.2～25 mg/kg の用量で素嚢内に投与した。被験物質投与前に硫酸アトロピン 5 mg/kg を筋肉内投与し、さらに症状に応じて、投与当日及び翌日硫酸アトロピンを 1～3 回投与 (2 または 5 mg/kg) した。溶媒対照群には脱イオン水、陽性対照群には 800 mg/kg の TOCP 原液を経口投与した。

用量設定根拠；

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

観察・検査項目：

本試験；試験鳥に被験物質を経口投与後、24時間及び48時間に各3羽を屠殺し、脳及び脊髄組織のNTE及びAChE活性の測定に供した。その他の試験鳥は3週間の観察期間中、週2回歩行異常及び強制運動に対する反応を観察するとともに、体重及び摂餌量を定期的に測定した。また、観察期間終了時に生存試験鳥全例について中性緩衝ホルマリンで環流固定して、神経組織のHE染色及びLFB（ルクソルファーストブルー）/PAS染色標本を作製し、神経組織の病理組織学的検査を行った。

強制運動観察項目：

- 落下 — 止まり木に留まる能力、地上60 cmからの着地能力
- 歩行 — 強制歩行（8 m）
- 跳躍 — 連続5段の跳躍、高さ約10 cm
- 戻り歩行 — 元の場所への集団回帰

強制歩行評点：

- 0：異常なし
- 1：軽度な協調運動失調、軽度なよろめき歩行や翼下げがみられる
- 2：よろめき歩行、尾及び脚反射に軽度な影響がある
- 3：継続したよろめき歩行、尾及び脚反射に明らかな影響がある
- 4：短時間しか起立できない、尾及び脚反射に明らかな影響がある
- 5：起立不能、尾及び脚反射がほとんどない

病理組織学的検査実施部位：

- 脳—冠状断面（大脳皮質、小脳皮質、延髄及び脳橋を含む）
- 脊髄—頸部脊髄上部、胸部脊髄中央部、腰部脊髄の横断面及び縦断面
- 坐骨神経（遠位、近位）—横断面及び縦断面
- 脛骨神経（後節、中央分岐、近位）—横断面及び縦断面

追加試験；試験鳥に被験物質を経口投与後、1日～28日の間に8回各3羽を屠殺し、脳及び脊髄組織を採取して均質化し、AChE活性及びNTE活性を測定した。

試験結果；強制歩行運動に対する評点を以下に示す（4項目の評点の合計点の平均値）。

試験群	投与量 (mg/kg)	第3日	第7日	第9日	第11日	第14日	第18日	第21日
溶媒対照	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
陽性対照 I	800	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.2	0.8
陽性対照 II	800	0.0 (第2日)	2.2 (第6日)	2.0	6.9 [∩] (第13日)	13.9 [∩] (第16日)	15.9 [∩] (第20日)	—
イミシアホス	26	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2

∩：p<0.01（Wolcoxonの順位和検定）

イミシアホス投与群では、投与後5日間は毒性徴候がみられ、この間に3例が死亡した。しかし、通常遅発性神経症状が現れる被験物質投与後10日～15日以降、典型的な遅発

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

性神経毒性症状は認められなかった。試験 21 日に実施した跳躍テストで、2 例に軽度な運動失調が認められたが、有意な変化ではなかった。

一方、TOCP を投与した試験鳥では、陽性対照Ⅱにおいて、試験 11 日以降、著しい協調運動障害や嗜眠、下肢の脆弱化等が認められた。

各群の平均体重 (g) 推移を下表に示す。

試験群	投与量 (mg/kg)	第 0 日	第 1 日又は第 2 日 ^{a)}	第 3 日	第 7 日	第 14 日	第 21 日
溶媒対照	0	1400	1442	1457	1405	1444	1388
陽性対照Ⅰ	800	1493	1416	1409	1493	1498	1468
陽性対照Ⅱ	800	1298	1228	1170	1119	1221	1064
イミシアホス	26	1388	1334 ↓	1155 ↓	1190 ↓	1345	1386

^{a)}: AChE&NTE 測定日、↓: p<0.05 (Student の t 検定)

被験物質投与群では、投与直後から体重の有意な低下がみられたが、第 7 日以降増加に転じ、第 21 日の体重は対照群と同等であった。

陽性対照群では、統計学的に有意な体重の変化は認められなかった。

被験物質または溶媒対照物質投与後、24 時間及び 48 時間の脳及び脊髄組織の AChE 活性及び NTE 活性を以下に示す。

試験群		例数	AChE (μmol/min·g)		NTE (nmol/min·g)			
			脳		脳		脊髄	
			24 時間	48 時間	24 時間	48 時間	24 時間	48 時間
本試験	溶媒対照	3	18.9	19.0	1660	1940	487	280
	陽性対照Ⅰ	3	16.7	—	83.8 ↓	—	92.7 ↓	—
	イミシアホス	3	3.39 ↓	4.18 ↓	736 ↓	1220 ↓	232 ↓	178
追加試験	溶媒対照	1	18.3	—	1680	—	314	—
	陽性対照Ⅱ	3	16.6	—	55.3	—	36.3	—

↓: p<0.05, ↓↓: p<0.01 (Student の t 検定)

被験物質投与群では、投与後 24 時間及び 48 時間の脳及び脊髄組織中 AChE 活性及び NTE 活性に有意な低下がみられた。

陽性対照Ⅰ群では、脳及び脊髄組織中 NTE 活性に有意な低下がみられたが、AChE 活性には有意な変化はみられなかった。別に実施した陽性対照Ⅱ群でも、同時に実施した溶媒対照群が 1 例であったため統計学的解析はできなかったが、NTE 活性の著しい低下がみられた。

被験物質投与後 21 日に環流固定して採取した脳及び神経組織の病理組織学的検査結果を別表に示す。

被験物質投与と関連する所見は認められなかった。観察された所見は、すべて偶発的変

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

化と考えられた。

陽性対照Ⅰ群でも明らかな TOCP 投与の影響は認められなかったが、陽性対照Ⅱ群では種々の神経毒性を示唆する所見が認められた。

追加試験で測定した脳の AChE 活性及び NTE 活性を以下に示す。

測定項目	経過日数	溶媒対照	陽性対照	イミシアホス (mg/kg)			
				0.2	1	5	25
AChE ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$)	1	20.6	18.3	20.2	19.6	8.92 \downarrow	2.48 \downarrow
	2	21.1	21.7	20.9	20.0	14.5 \downarrow	3.08 \downarrow
	4	20.9	17.1	20.6	22.3	13.3 \downarrow	3.5 \downarrow
	7	20.3	20.8	20.9	19.7	14.6 \downarrow	10.3 \downarrow
	10	18.0	19.1	—	—	15.5 \downarrow	13.3 \downarrow
	14	20.8	19.4	—	—	17.5 \downarrow	16.0 \downarrow
	21	20.8	19.6	—	—	17.2 \downarrow	17.8
	28	17.9	21.1	—	—	18.2	18.4
	(平均)	(20.2)	—	—	—	—	—
NTE ($\text{nmol}/\text{min}\cdot\text{g}$)	1	2684	112 \downarrow	2610	2740	2770	718 \downarrow
	2	3099	243 \downarrow	3000	2660	2870	598 \downarrow
	4	2760	532 \downarrow	2840	2910	2770	709 \downarrow
	7	2900	1030 \downarrow	2810	2880	2550	1340 \downarrow
	10	2793	1460 \downarrow	—	—	2650	1770 \downarrow
	14	2723	1680 \downarrow	—	—	2670	2050 \downarrow
	21	2983	2500	—	—	2080	2740
	28	2236	2210 \downarrow	—	—	2300 \downarrow	2220 \downarrow
	(平均)	(2760)	—	—	—	—	—

\downarrow : $p < 0.05$, \downarrow : $p < 0.01$ (Student の t 検定、溶媒対照群全例の平均値と比較)

被験物質投与群では、5 mg/kg 以上の用量群で投与後 1 日より有意な AChE 活性の低下がみられ、25 mg/kg 投与群で NTE 活性の低下がみられた。AChE 活性は、日数の経過とともに回復し、21 日にはほぼ正常に回復した。NTE 活性も 21 日にはほぼ正常に回復したと考えられた。28 日の最終検査では陽性対照群及びイミシアホス投与群の NTE 活性に統計学的に有意な低下が認められたが、対照群とほぼ同じ値であったことから、偶発的変化であると考えられた。

以上の結果から、イミシアホス原体の産卵鶏を用いた経口投与による遅発性神経毒性試験では、症状及び病理組織学的に遅発性神経毒性を示唆する所見は認められなかった。また、本剤の投与により、5 mg/kg 以上の用量では、神経組織中 AChE 活性及び NTE 活性の低下が誘発されるが約 3 週間で回復し、1 mg/kg 以下の用量では、AChE 活性及び NTE 活性に影響を及ぼさないことが示唆された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

(別表 1) 神経組織の病理組織学的所見一覧表

検査部位	観察面	所見	溶媒対照	陽性対照 I	イミニアホス	陽性対照 II	
		検査動物数	9	9	11	9	
脳	冠状面	小脳軸索腫脹				1	
		小脳グリア細胞増生			1	6	
		小脳神経線維変性				4	
		小脳神経細胞クロマチン融解				1	
		大脳グリア細胞増生	2	1	5	1	
		大脳単核細胞浸潤	3	2	1	2	
		脈絡叢単核細胞浸潤	5		3	1	
		髄膜単核細胞浸潤	5	1	4	3	
		髄膜慢性炎症	1	2	3		
		髄膜石灰化				1	
		中脳軸索腫脹				1	
		中脳グリア細胞増生	1		1		
		橋/延髄グリア細胞増生	2		1		
橋/延髄単核細胞浸潤	1		1				
坐骨神経	遠位、左	横断面	神経鞘単核細胞浸潤	2	1		2
			神経線維変性				2
		縦断面	神経鞘単核細胞浸潤	1	1	1	1
			神経線維変性		1		5
	遠位、右	横断面	軸索腫脹				1
			神経鞘単核細胞浸潤	2	1	1	1
			神経線維変性				1
		縦断面	神経単核細胞浸潤			1	
			軸索腫脹				1
			神経鞘単核細胞浸潤	2	2	1	
	近位、左	横断面	神経線維変性			1	8
			神経単核細胞浸潤	1		2	1
			神経鞘単核細胞浸潤	1			1
		縦断面	神経鞘単核細胞浸潤	3	2	2	3
			神経線維変性		1		8
			神経単核細胞浸潤			1	1
	近位、右	横断面	神経鞘単核細胞浸潤	1		1	
			神経鞘活動型慢性炎症	1			
			神経線維変性				3
		縦断面	軸索腫脹				2
			神経鞘単核細胞浸潤	2	4	2	3
			神経鞘活動型慢性炎症	1			
	脊髄	頸部	横断面	神経線維変性		1	9
				神経単核細胞浸潤	3	2	1
白質軸索腫脹					3		9
縦断面			白質グリア細胞増生				2
			白質神経線維変性				1
			神経鞘単核細胞浸潤				1
			灰白質軸索腫脹		2		
			髄膜単核細胞浸潤		1		2
			白質軸索腫脹		1		9
腰部		横断面	白質グリア細胞増生		3	1	9
			白質単核細胞浸潤	1			2
			白質神経線維変性	2	1	1	3
腰部		横断面	灰白質軸索腫脹		2		
			髄膜単核細胞浸潤	1		1	
			神経細胞クロマチン融解				2
			白質軸索腫脹		1		4
			白質グリア細胞増生				2
						1	

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

〔別表 2〕 神経組織の病理組織学的所見一覧表

検査部位	観察面	所見	溶媒対照	陽性対照 I	イミシアホス	陽性対照 II	
		検査動物数	9	9	11	9	
脊 髄	腰部	縦断面	灰白質軸索腫脹	4	2	1	
			灰白質グリア細胞増生		1		
			神経細胞クロマチン融解		2		1
			白質軸索腫脹	1	1	1	6
			白質グリア細胞増生	1		1	4
			白質神経線維変性	2	1		7
	胸部	横断面	灰白質軸索腫脹	1			1
			髄膜単核細胞浸潤	1			
			神経細胞クロマチン融解				1
			白質軸索腫脹	1	2		8
			白質グリア細胞増生				2
			白質神経線維変性				
		縦断面	灰白質軸索腫脹	1			
			灰白質グリア細胞増生	1			
			髄膜単核細胞浸潤				1
			神経細胞クロマチン融解				1
			神経細胞空胞化	1			
			白質軸索腫脹	1	2	2	7
脛 骨 神 経	後節分岐、 左	横断面	髄膜単核細胞浸潤		1		
			神経線維変性				2
		縦断面	髄膜単核細胞浸潤	1	1		2
			髄膜慢性炎症	1			
	後節分岐、 右	縦断面	髄膜単核細胞浸潤	1	3	1	1
			神経線維変性		1		9
	中央分岐、 左	横断面	髄膜単核細胞浸潤	1	3	1	
			軸索腫脹				1
		縦断面	髄膜単核細胞浸潤	2	3	3	4
			髄膜慢性炎症	1			
			神経線維変性				8
			神経単核細胞浸潤	1		2	1
	中央分岐、 右	横断面	髄膜単核細胞浸潤			1	1
			神経線維変性				2
		縦断面	軸索腫脹				1
			髄膜単核細胞浸潤	1	2	1	2
	近位、左	横断面	神経線維変性		3		9
			神経単核細胞浸潤	2		1	1
縦断面		髄膜単核細胞浸潤			1		
		髄膜単核細胞浸潤	3	5	3	3	
		髄膜慢性炎症	1				
		神経線維変性				9	
近位、右	横断面	髄膜単核細胞浸潤	2	1	1		
		髄膜活動型慢性炎症	1				
		神経線維変性				2	
	縦断面	神経単核細胞浸潤				1	
		軸索腫脹				1	
		髄膜単核細胞浸潤	4	1	3	2	
		神経線維変性		1		9	
		神経単核細胞浸潤				2	

HE 染色標本と LFB/PAS 染色標本の所見には差はみられなかったため、LFB/PAS 染色標本の試験は省略した。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

(5) 90 日間反復経口投与毒性及び反復経口投与神経毒性

① ラットを用いた 90 日間反復経口投与毒性及び神経毒性併合試験

(資料 T10)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2002 年

被験物質：イミシアホス原体

供試動物：CrI:WI(Glx/BRL/Han)BR 系ラット、投与開始時 雄 6 週齢、雌 7 週齢、
1 群雄雌各 15 匹 (但し、対照群及び高用量群は雄雌各 25 匹、うち雄雌各 10 匹は休薬試験群)、体重；雄 113.5～160.3 g、雌 140.4～171.4 g

投与期間：13 週間 (2000 年 7 月 17 日～2000 年 10 月 17 日)

投与方法：被験物質をアセトンに溶解して、0、3、10 及び 50 ppm の濃度で飼料に混入し、13 週間にわたって自由に摂取させた。被験物質混入飼料は毎週調製し、7 つに分けて凍結保存したものを毎日解凍して動物に与えた。4 週間の休薬期間期間中は被験物質を含まない飼料を与えた。

用量設定根拠；

観察・検査項目及び結果：

死亡率；動物の生死を毎日 2 回観察した。

いずれの投与群にも、投与期間中及び休薬試験期間中に死亡した動物はみられなかった。

一般状態；一般状態を毎日観察するとともに、詳細な観察を行った。

いずれの投与群にも、被験物質投与と関連する所見は認められなかった。

体重変化；被験物質投与開始直前、開始から剖検まで毎週 1 回全ての動物の体重を測定した。

いずれの投与群にも、被験物質投与の体重に対する影響はみられなかった。

摂餌量；全動物の摂餌量を毎日測定し、週単位の摂餌量を算出した。

いずれの投与群にも、被験物質投与と関連する摂餌量の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および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

被験物質摂取量；被験物質投与期間中の各動物の摂餌量・体重及び飼料中被験物質濃度から算出した被験物質摂取量は以下の通りであった（平均摂取量は申請者の計算値）。

	投与量 (ppm)		
	3	10	50
雄	0.2~0.4 (0.28)	0.7~1.5 (0.93)	3.5~7.4 (4.86)
雌	0.2~0.3 (0.28)	0.8~1.2 (0.99)	4.3~6.1 (5.13)

単位：mg/kg/day、上段は摂取量の範囲、下段は平均摂取量

詳細な状態の観察；投与開始前及び投与期間中、並びに休薬試験期間中に1群雄雌各10匹及び休薬試験群雄雌各5匹を対象として、以下の項目について毎週検査を行った。

ホームケージにおける観察（姿勢、痙攣の有無、行動、異常発声、歩行、ケージ閉鎖時の覚醒、振戦の有無）、ホームケージから取出す際の所見（取出しの容易性、流涙、取扱いの容易性、流涙の種類、異常発声、流涎、振戦、呼吸、痙攣、立毛、眼瞼閉鎖、被毛の状態、眼球突出、その他）、ホームケージの外での観察（オープンフィールドにおける2分間観察：行動を起こすまでの時間、歩行の程度、姿勢、常同症、覚醒、振戦、旋回、痙攣、歩行状態、その他）。

以下に被験物質投与期間中に観察された症状及び観察された累積発現数を示す。

検査項目	性別	雄				雌			
	投与量 (ppm)	0	3	10	50	0	3	10	50
	検査動物数	15	10	10	15	15	10	10	15
取出時	逃避	7	4	4	27	2	3	1	3
	無動作					1			
	攻撃的	1	4		10				
取扱時	中程度	1	1		2	1			
	硬直	7	1		7				
	困難		1		11				
異常発声	あり	1		2	1				
流涙	赤色							1	
立毛	あり	2			1				
移動量	増加				1				
	低下								1
尿量	増加	2							

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

以下に休薬期間中に観察された症状及び観察された累積発現数を示す。

検査項目	性別	雄		雌	
	投与量 (ppm)	0	50	0	50
	検査動物数	5	5	5	5
取出時	逃避	4	3	3	1
	無動作				
	攻撃的	3	5	1	1
取扱時	中程度				
	硬直	1	2		
	困難	2	4	1	1
異常発声	あり	1		1	1
覚醒状態	過敏反応				1

被験物質投与期間中、対照群と比較していくつかの観察項目に僅かな差が認められたが、これらは単独かつ偶発的に認められたもので、被験物質投与に関連したものとは考えられなかった。休薬期間中の観察では、対照群と比較して明らかな差は認められなかった。

機能検査；第4週、8週及び13週に以下の項目について全例を対象に検査を行った。

感覚機能（接近反応、接触反応、尾挟反応（痛覚反応）、正向反射、瞳孔反射、角膜反射、聴覚反応）、後肢開脚幅、前肢及び後肢握力、自発運動量

試験期間中、3回実施した刺激－反応検査で異常のみられた所見及び発現数を以下に示す。

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		0	3	10	50	0	3	10	50
動物数		15	10	10	15	15	10	10	15
接近反応	欠如	4週	1						1
		8週							
		13週			1				
接触反応	攻撃的	4週							
		8週							
		13週				1			
尾挟反応	欠如	4週				1			
		8週				1		1	1
		13週				2			
瞳孔反射	異常	4週							
		8週					1		
		13週							

いずれの投与群にも被験物質投与に起因する刺激－反応の異常は認められなかった。

試験期間中、3回実施した機能検査における測定値及び自発運動量を以下に示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

検査項目	性別	雄				雌				
	投与量 (ppm)	0	3	10	50	0	3	10	50	
	動物数	15	10	10	15*	15	10	10	15	
機能検査	着地開脚幅 (mm)	第4週	85.4	52.7	58.5	71.6	87.4	51.3	53.4	82.9
		第8週	85.6	55.0	61.7	80.4	74.6	46.7	53.7	73.9
		第13週	85.1	54.2	55.6	72.7	85.9	56.3	62.9	82.4
	前肢握力 (kg)	第4週	0.787	0.528	0.570	0.683	0.838	0.538	0.551	0.805
		第8週	0.875	0.651	0.660	0.804	0.884	0.628	0.640	0.850
		第13週	1.096	0.699	0.794	0.958	0.951	0.659	0.643	0.903
	後肢握力 (kg)	第4週	0.322	0.211	0.193	0.277	0.349	0.198	0.214	0.359
		第8週	0.451	0.306	0.320	0.425	0.452	0.295	0.299	0.452
		第13週	0.477	0.335	0.328	0.389	0.423	0.303	0.323	0.441
自発運動量	移動量	第4週	168	230†	174	160	119	172†	131	101
		第8週	139	146	137	130	108	99	110	83
		第13週	120	151	155	125	115	132	120	97
	総運動量	第4週	570	657	561	508	451	510	452	384
		第8週	436	463	431	404	401	348	370	320
		第13週	398	446	490	389	395	419	408	340

* : 1匹は攻撃性が強すぎたため、機能検査未実施、† : p<0.05 (Dunnettの多重検定)

着地開脚幅及び前後肢の握力には、被験物質投与による変化はみられなかった。

高用量群では、雄雌とも軽度な自発運動量の低下する傾向がみられたが、統計学的に有意な変化ではなかった。

低用量群の雄雌では第4週に移動量の有意な増加がみられたが、用量相関性のない変化であった。

血液学的検査：第13週に全身還流固定用動物を除く全動物の尾静脈から採血し、以下の検査を行った。なお、採血前には一夜絶食させた。

ヘモグロビン濃度、赤血球数、赤血球容積 (ヘマトクリット)、網状赤血球数、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、ヘモグロビン分布幅、赤血球分布幅、血小板数、血小板容積、平均血小板容積、血小板分布幅、白血球数、白血球型別百分率、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)

対照群と比較して有意差の認められた項目及び対照群に対する変動率 (%) を以下に示す。

性別	雄			雌		
投与量 (ppm)	3	10	50	3	10	50
赤血球数						↓ 96
網状赤血球 (%)			↑ 121			↑ 139
網状赤血球絶対数						↑ 133
P T	↓ 93		↓ 92			
APTT		↑ 118	↑ 111			
好中球数		↓ 71				

†↓ : p<0.05、↓ : p<0.01、↑↓ : p<0.001 (Dunnettの多重検定)

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

高用量群の雌において、赤血球数の軽微な低下とともにヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の低下傾向が認められた。同群雄でも、同様な傾向が認められた。また、同群では、雄雌ともに網状赤血球の増加が認められた。中用量群及び高用量群の雄では、軽微な活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が認められた。
低用量及び高用量群の雌において、軽微なプロトロンビン時間の短縮が認められたが、用量相関性はなかった。また、中用量群雄においては、用量相関性のない好中球比率の低下がみられた。

血液生化学的検査；血液学的検査用血液採取時に同時に採血した血液から血漿を採取し、以下の検査を行った。

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)、アルカリフォスファターゼ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、無機リン、クロール、総蛋白、アルブミン、グロブリン、A/G 比、総コレステロール、グルコース、尿素、総ビリルビン、クレアチニン、尿素窒素

対照群と比較して有意差の認められた項目及び対照群に対する変動率(%)を以下に示す。

性別	雄			雌		
	3	10	50	3	10	50
ナトリウム		↓ 99				
クレアチニン				↑ 116		
総蛋白			↓ 97			
グロブリン			↓ 91			
グルコース			↑ 112			

↑↓ : p<0.05, ↓↓ : p<0.01, ↓↓↓ : p<0.001 (Dunnettの多重検定)

高用量群雄では、総蛋白及びグロブリンの低下並びにグルコースの増加がみられた。中用量群雄のナトリウム及び低用量群雌のクレアチニンには、統計学的に有意な変化が認められたが、用量相関性のない変化であった。また、有意差はなかったが、被験物質投与群全群の雌に AST 及び ALT 活性の低下が認められた。これは対照群の値が高かったため、雄では同様な変化はみられないことから偶発的であり、被験物質投与に関連したものとは考えられなかった。

コリンエステラーゼ活性；血液検査用試料採取時に得られた血液を用いて、血漿及び赤血球のコリンエステラーゼ活性の測定を行った。また、投与終了時及び休薬期間終了時剖検動物（全身灌流固定しなかった動物）の脳を正中線で2等分し、左半分を用いてコリンエステラーゼ活性の測定を行った。なお、休薬期間終了時の血漿及び赤血球コリンエステラーゼ活性の測定は、実施しなかった。

対照群と比較して有意差の認められた項目及び対照群に対する変動率(%)を以下に示す。なお、統計学的解析結果に係わらず、脳及び赤血球について、対照群の平均値から20%

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

以上変動した場合を被験物質の影響と判断した。

検査時期	性別	雄			雌		
	投与量 (ppm)	3	10	50	3	10	50
投与終了時	血漿	◆ 86	◆ 72	◆ 66	◆ 69	◆ 34	◆ 24
	赤血球	↓ 87	◆ 70	◆ 48	◇ 85	◆ 71	◆ 58
	脳			◆ 55			◆ 57
休薬終了時	脳			↓ 82			↓ 85

↑↓ : p<0.05、◇◇ : p<0.01、◆◆ : p<0.001 (Dunnettの多重検定)

中用量群及び高用量群雄雌では、赤血球コリンエステラーゼ活性の低下(20%以上)が認められた。また、高用量群雄雌において、20%以上の脳アセチルコリンエステラーゼ活性の低下が認められた。

休薬試験群では、高用量群の脳コリンエステラーゼ活性には著しい回復がみられ、対照群との差は20%以内であったが、対照群より統計学的に有意に低かった。

眼科学的検査；被験物質投与開始前に全動物について、試験第12週及び休薬終了時には対照群及び高用量群の動物について実施した。検査前には、眼に散瞳薬を点眼した。被験物質投与と関連する異常は、認められなかった。

臓器重量；投与終了時剖検動物及び休薬期間終了時剖検動物のうち、全身灌流固定に供しなかった動物について、放血屠殺後、以下の臓器を摘出して重量を測定し、対体重比も算出した。

副腎、卵巣、脳、心臓、脾臓、腎臓、精巣及び精巣上体、胸腺、肝臓、子宮

対照群と比較して有意差の認められた臓器及び対照群に対する変動率(%)を以下に示す。

検査時期	性別	雄			雌		
	投与量 (ppm)	3	10	50	3	10	50
休薬終了時	副腎調整重量	/	/	↓ 77	/	/	
	副腎重量体重比	/	/	↓ 75	/	/	
	脳調整重量	/	/	◇ 105	/	/	

↑↓ : p<0.05、◇◇ : p<0.01、◆◆ : p<0.001 (Dunnettの多重検定)

投与期間終了時検査及び休薬試験終了時検査における臓器重量の変動は、ほとんどみられなかった。高用量群雄の休薬群において、副腎重量の低下及び脳重量の増加がみられたが、これらは投与終了時にはみられなかった変化であり、被験物質投与の影響ではないと考えられた。

肉眼的病理検査；投与終了時及び休薬期間終了時の全生存動物について、解剖時に肉眼的病理検査を行った。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

投与終了時及び休薬期間終了時剖検動物におけるほとんどの組織には、明らかな肉眼的病変はみられず、認められた所見は、この系統及び週齢の動物に通常みられる所見であった。被験物質投与の影響と考えられる肉眼的所見は、認められなかった。

病理組織学的検査；投与終了時剖検動物（全身灌流固定しなかった動物）について、以下の臓器組織のパラフィン切片を作成し、HE染色を行った後、対照群及び高用量群の全標本及び中間用量群において肉眼的に異常のみられた臓器組織の標本について観察した。休薬試験群では、肉眼的に異常のみられた臓器組織の標本のみを観察した。

副腎、食道、視神経、大動脈、卵巣、骨髓塗抹標本（大腿骨）、膵臓、脳、パイエル板、気管リンパ節、下垂体、盲腸、前立腺、結腸、直腸、十二指腸、唾液腺、眼球、坐骨神経、大腿骨及び骨髓、精囊、肉眼的病変部、皮膚、ハーダー腺、頸部脊髄、頭部、腰部脊髄、心臓、胸部脊髄、回腸、脾臓、空腸、胃、腎臓、胸骨及び骨髓、涙腺、精巣及び精巣上体、喉頭、胸腺、肝臓、甲状腺及び上皮小体、肺及び主要気管支、舌、乳腺、気管、下顎リンパ節、気管分岐部、腸管膜リンパ節、膀胱、骨格筋（大腿四頭筋）、子宮、鼻甲介、膈、鼻咽頭、ジンバル腺

観察された所見を別表 1 及び 2 に示す。

病理組織学的所見は僅かであり、この系統及び週齢の動物に通常みられる所見と同等であった。被験物質投与の影響と考えられる病理組織学的所見は、認められなかった。

神経病理学的検査；投与終了時には各群雄雌各 5 匹について、休薬期間終了時には対照群及び高用量群雄雌各 5 匹について、50%Karnovskys 液を用いて全身灌流固定を行った。以下の臓器組織について、パラフィン切片を作成して HE 染色（√）またはアクリル樹脂切片を作成してトルイジンブルー染色（†）を行い、神経病理学的検査を行った。

嗅球（√）、前脳（√）、尾状核（√）、視床下部／視床（√）、中脳（√）、小脳（√）、延髄（√）、全脊髄（頸部、胸部、腰部）（√）、頸部後根神経節（2 部位、†）、腰部後根神経節（2 部位、†）、三叉神経節（√）、眼球（2 部位、√）、視神経（2 部位、†）、坐骨神経（2 部位、†）、脛骨神経（2 部位、†）、腓腹神経（2 部位、†）、前脛骨筋（1 部位、左側、√）、腓腹筋（1 部位、左側、√）、肉眼的病変部（√）

いずれの投与群にも、被験物質投与の影響と考えられる神経病理学的変化は認められなかった。

以上の結果から、本剤のラットに対する 90 日間飼料混入投与による反復経口投与毒性試験の影響として、10 ppm 以上の投与群では赤血球コリンエステラーゼ活性の低下、50 ppm 投与群では脳コリンエステラーゼ活性の低下や自発運動量の低下傾向や軽微な貧血を示唆する所見が認められたので、無影響量は雄雌とも 3 ppm（雄雌とも 0.28 mg/kg/day）であると判断される。また、本剤の投与による神経病理組織学的影響は、いずれの投与群にも認められなかった。

（申請者注：本試験における無毒性量は無影響量と同じ 3 ppm と考えられる）

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

別表 1-1：病理組織学的所見－投与終了時剖検動物

臓器組織	性別	雄				雌			
	投与量 (ppm)	0	3	10	50	0	3	10	50
皮膚	検査動物数	10			10	10			10
	皮膚炎				1				
	付属器萎縮				1				
骨及び骨髄	検査動物数	10			10	10			10
	骨髄脂肪化				2				
肝臓	検査動物数	10	1	1	10	10			10
	死亡期うっ血/出血			1	2				
	限局性炎症細胞巣	10	1	1	10	10			10
	髓外造血				1				1
	皮膜線維化/癒着				1				
	肝細胞色素沈着					3			
	肝細胞空胞化				2				1
	尾状葉壊死				1				
	小葉中心部肝細胞壊死				2				
	限局性壊死	3		1	3	4			3
脾臓	検査動物数	10			10	10			10
	髓外造血	8			10	8			9
膵臓	検査動物数	10			10	10			10
	顆粒減少				1				
	小葉萎縮				2				
胃	検査動物数	10		1	10	10	1	1	10
	死亡期うっ血/出血	1		1	1				
回腸	検査動物数	10			10	10			10
	バルビツール酸溶解								1
盲腸	検査動物数	10			10	10			10
	バルビツール酸溶解			1	1	1			1
	リンパ組織過形成								1
結腸	検査動物数	10			10	10			10
	バルビツール酸溶解					1			
副腎	検査動物数	10			10	10			10
	皮質空胞化				1				
腎臓	検査動物数	10			10	10			10
	限局性炎症細胞巣				1				
	水腎症				1	3			
	色素沈着					3			3
	皮質石灰化								1
	皮髄境界部石灰化					5			3
	腎盂石灰化					2			1
	腎乳頭石灰化				1	1			1
	硝子滴変性	10			1	10			
	腎嚢胞				1	1			
	限局性腎症	1			2	3			1
	慢性腎症								1
腎盂炎								1	
精巣	検査動物数	10			10				
	精細管萎縮	1			2				
精巣上体	検査動物数	10			10				
	精子減少	1							
	精子癌	1							
	細胞残屑				1				

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

別表 1-2 : 病理組織学的所見 - 投与終了時剖検動物

臓器組織	性別	雄				雌			
	投与量 (ppm)	0	3	10	50	0	3	10	50
卵 巢	検査動物数					10	1	2	10
	囊 胞							1	1
前立腺	検査動物数	10			10				
	限局性炎症細胞巣	2			2				
膣	検査動物数					10	3	3	10
	発情前期					4	3	3	1
	発情期					5			5
	発情休止期					1			4
下 頸 リンパ節	検査動物数	10	1		10	10	2		10
	死亡期うっ血/出血		1		1		2		1
	リンパ組織過形成				1				
胸 腺	検査動物数	10			10	10			10
	死亡期うっ血/出血	1				1			
	囊 胞	1			1	5			8
肺	検査動物数	10		2	10	9	1		10
	死亡期うっ血/出血		1	1	2				
	泡沫細胞	2				4	1		5
	限局性炎症細胞巣	1			2	1			
	肺 炎	1			1				
心 臓	検査動物数	10			9	9			10
	心筋症	1							
気 管	検査動物数	10			10	9			10
	腺囊胞	1							
甲状腺	検査動物数	10			10	10			10
	囊 胞	1							
	異所性胸腺組織	1			1	1			1
	濾胞細胞過形成	1			3				
下垂体	検査動物数	9			10	10			10
	囊 胞	1							
バイカル板	検査動物数	10			9	10			10
	リンパ組織過形成	9			7	8			9
尾	検査動物数	1							
	脱 臼	1							

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

別表 2：病理組織学的所見－休薬終了時剖検動物

臓器組織	性別	雄				雌			
	投与量 (ppm)	0	3	10	50	0	3	10	50
皮膚	検査動物数				1	1			
	表皮肥厚					1			
肝臓	検査動物数	1							
	限局性炎症細胞巣	1							
腸間膜リンパ節	検査動物数					1			
	死亡期うっ血/出血					1			
胃	検査動物数				1				
	死亡期うっ血/出血				1				
盲腸	検査動物数	1							1
	バルビツール酸溶解	1							1
嚔	検査動物数					2			
	発情前期					1			
	発情期					1			
下顎腺	検査動物数	1				1			2
	死亡期うっ血/出血	1				1			1
	リンパ組織過形成								1
	リンパ管拡張症					1			
胸腺	検査動物数				2	1			
	死亡期うっ血/出血				2	1			
	囊胞				1	1			
尾	検査動物数								1
	脱臼								1

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

② ラットを用いた 90 日間反復経口投与毒性試験 (追加試験)

(資料 T11)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2004 年

被験物質: イミシアホス原体

供試動物: CrI:WI(Glx/BRL/Han)BR 系ラット、投与開始時 5 週齢、1 群雄雌各 20 匹 (各群雌雄各 10 例を投与終了時に剖検、残りは 4 週間の休薬期間期間終了後に剖検)
体重; 雄 107.3~140.5 g、雌 94.7~131.4 g

投与期間: 13 週間 (2001 年 8 月 9 日~2001 年 11 月 12 日)

投与方法: 被験物質をアセトンに溶解して、50 ppm の濃度で飼料に混入し、13 週間にわたって自由摂取させた。被験物質混入飼料は毎週調製し、7 つに分けて凍結保存したものを毎日解凍し、動物に与えた。休薬期間期間中は被験物質を含まない飼料を与えた。

試験目的及び用量設定根拠;

観察・検査項目及び結果:

死亡率; 動物の生死を毎日 2 回観察した。

いずれの投与群にも、投与期間中及び休薬試験期間中に死亡した動物はみられなかった。

一般状態; 一般状態を毎日観察するとともに、詳細な観察を行った。

いずれの投与群にも、被験物質投与に関連する所見は認められなかった。

体重変化; 被験物質投与開始直前、開始から剖検まで毎週 1 回全ての動物の体重を測定した。

いずれの投与群にも、被験物質投与の体重に対する影響はみられなかった。

摂餌量; 全動物の摂餌量を毎日測定し、週単位の摂餌量を算出した。

いずれの投与群にも、被験物質投与に関連する摂餌量の変化は認められなかった。

被験物質摂取量; 被験物質投与期間中の各動物の摂餌量・体重及び飼料中被験物質濃度から算出した被験物質摂取量は、以下の通りであった。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

	投与量 (ppm)
	50
雄	2.9~7.4 (4.4)
雌	3.7~6.6 (4.8)

単位：mg/kg/day、上段は摂取量の範囲、下段は平均摂取量

詳細な状態の観察；前回の試験（資料 T10）では、被験物質投与に起因する症状の変化がみられなかったため、本追加試験では、詳細な状態の観察を実施しなかった。

機能検査；前回の試験（資料 T10）では、被験物質投与に起因する機能検査項目に対する影響はみられなかったため、本追加試験では、機能検査は実施しなかった。

血液学的検査；第 13 週に全身還流固定用動物を除く全動物の尾静脈から採血し、以下の検査を行った。なお、採血前には一夜絶食させた。

ヘモグロビン濃度、赤血球数、赤血球容積（ヘマトクリット）、網状赤血球数、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)、ヘモグロビン分布幅、赤血球分布幅、血小板数、血小板容積、平均血小板容積、血小板分布幅、白血球数、白血球型別百分率、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)

対照群と比較して、有意差の認められた項目及び対照群に対する変動率(%) を以下に示す。

性 別	試験群		休薬群	
	雄	雌	雄	雌
投与量 (ppm)	50	50	50	50
ヘモグロビン		↓ 93		
ヘマトクリット	↓ 96	↓ 90		
赤血球数		↓ 90		
網状赤血球 (%)	↑ 126	↑ 123		↑ 119
MCHC	↑ 102	↑ 102		
P T	↑ 106			
リンパ球数	↑ 114	↑ 129		
リンパ球比率		↑ 111		
好中球比率		↓ 74		

↑↓ : p<0.05、↑↓ : p<0.01、↑↓ : p<0.001 (Dunnett の多重検定)

高用量群の雌において、ヘモグロビン濃度、赤血球数及びヘマトクリットの有意な低下がみられ、雄でもヘマトクリットの低下がみられ、これに対応する網状赤血球数の増加もみられた。

投与終了時にみられたその他の変化は軽微であり、他項目との関連性や雄雌間の変動による違い等から、被験物質投与と関連しない偶発的变化と考えられた。

休薬期間終了時の検査では、赤血球系の変動はみられず、僅かに雌の網状赤血球数が対照群より高かったが、被験物質投与からの回復性は示唆された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

血液生化学的検査；血液学的検査用血液採取時に同時に採血した血液から血漿を採取し、以下の検査を行った。

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)、アルカリフォスファターゼ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、無機リン、クロール、総蛋白、アルブミン、グロブリン、A/G 比、総コレステロール、グルコース、尿素、総ビリルビン、クレアチニン、尿素窒素

対照群と比較して、有意差の認められた項目及び対照群に対する変動率(%)を以下に示す。

性 別	試験群		休薬群	
	雄	雌	雄	雌
投与量 (ppm)	50	50	50	50
ナトリウム	◆ 99			
カルシウム	◆ 97			
総蛋白	↓ 97			
尿素窒素				↑ 115
総コレステロール			↓ 81	

↑↓ : p<0.05、◇↓ : p<0.01、◆↓ : p<0.001 (Dunnett の多重検定)

統計学的に有意な変動が一部の項目にみられたが、変動幅が小さく、いずれも偶発的変動と考えられた。また、休薬群でみられた変動は、投与終了時には認められなかった変動であった。

コリンエステラーゼ活性；血液検査用試料採取時に得られた血液を用いて、血漿及び赤血球のコリンエステラーゼ活性の測定を行った。また、投与終了時及び休薬期間終了時剖検動物（全身灌流固定しなかった動物）の脳を正中線で 2 等分し、左半分を用いてコリンエステラーゼ活性の測定を行った。

各項目の対照群に対する変動率 (%) を以下に示す。なお、統計学的解析結果に係わらず、脳及び赤血球について、対照群の平均値から 20%以上変動した場合を被験物質の影響と判断した。

性 別	試験群		休薬群	
	雄	雌	雄	雌
投与量 (ppm)	50	50	50	50
血漿 (B)	◆ 50	◆ 15	117	100
血漿 (A)	◆ 55	◆ 21	109	88
赤血球	NC	NC	96	106
脳	◆ 44	◆ 43	88	101

↑↓ : p<0.05、◇↓ : p<0.01、◆↓ : p<0.001 (Dunnett の多重検定)

B : Butylthiocholine, A : Acetylthiocholine

NC : 大部分が測定下限以下であったため評価に供しなかった。

投与終了時検査では、脳コリンエステラーゼ活性の低下が認められた。赤血球コリンエ

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

ステラーゼについては、測定下限以下であったため、測定感度を上げて測定したが、被験物質投与影響は明らかではなかった。

休薬群では、被験物質投与の影響がみられず、完全に被験物質投与の影響から回復したと考えられた。

眼科学的検査；前回の試験（資料 T10）では、被験物質投与に起因する眼所見の変化がみられなかったため、本追加試験では眼科学的検査を実施しなかった。

臓器重量；前回の試験（資料 T10）では、被験物質投与に起因する重量変化がみられなかったため、本追加試験では臓器重量測定を実施しなかった。

肉眼的病理検査；投与終了時及び休薬期間終了時の全生存動物について、解剖時に肉眼的病理検査を行った。

投与終了時及び休薬期間終了時剖検動物におけるほとんどの組織には、明らかな肉眼的病変はみられず、認められた所見は、この系統及び週齢の動物に通常みられる所見であった。被験物質投与の影響と考えられる肉眼的所見は、認められなかった。

病理組織学的検査；投与終了時剖検群及び休薬試験群の剖検で顕著な肉眼的病理所見がみられなかったため、病理組織学的検査は実施しなかった。

以上の結果から、本剤のラットに対する 90 日間飼料混入投与による反復経口投与毒性試験における影響として、50 ppm 投与群の雄雌で貧血及びコリンエステラーゼ活性の低下がみられたが、4 週間の休薬期間終了時には、これらの変化は消失することが確認された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

③ イヌを用いた 90 日間反復経口投与毒性試験

(資料 T12)

試験機関：

(GLP 対応)

報告書作成年：2002 年

被験物質：イミシアホス原体

供試動物：ビーグル犬、投与開始時5～6ヶ月齢、1群雄雌各4匹（休薬試験群；対照群及び高用量群雄雌各4匹）、体重；雄5.76～7.94 kg、雌4.69～7.07 kg

投与期間：90日間（2000年8月16日～2000年11月17日）

投与方法：被験物質を1% w/vメチルセルロース水溶液に懸濁し、毎日1回、0（対照群）、0.25、2.5及び25 mg/kgの用量を90日間強制経口投与した。

対照群及び25 mg/kg投与群については、90日間投与後に4週間の休薬期間を設け、回復試験を実施した。

用量設定根拠；

試験項目及び結果：

一般状態及び死亡率；一般状態及び生死を毎日観察すると共に、毎週1回詳細な触診を行った。

休薬試験を含めて、試験期間中に死亡はみられなかった。被験物質投与期間中の25 mg/kg投与群の雄3匹及び雌2匹に摂餌量低下に伴う痩身が観察され、これらの内、雄雌各1匹については体温低下や流涎等の症状がみられたため、第10週に屠殺した。

その他の投与群では、被験物質投与と関連する一般状態の変化は認められなかった。

体重変化；被験物質投与開始の2週間前及び1週間前、投与開始日の投与前、以降毎週1回測定し、剖検前にも測定した。

被験物質投与期間中及び休薬試験期間中の体重増加量（kg）を以下に示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

性別	雄				雌			
投与量 (mg/kg)	0	0.25	2.5	25	0	0.25	2.5	25
第 0～13週 (投与期間)	2.22	2.25	2.84	0.78♠	1.56	2.07	1.65	0.51♠
第13～17週 (休薬期間)	0.64	—	—	0.83	0.22	—	—	0.61

↑↓ : p<0.05, ♠♠ : p<0.01, ♠♠♠ : p<0.001 (Dunnnettの多重検定)

25 mg/kg 投与群では、被験物質投与期間中の体重増加量が対照群より著しく低く、雄で対照群の 65%、雌で 67%であった。2.5 mg/kg 投与群及び 0.25 mg/kg 投与群では、体重に対する被験物質投与の影響はみられなかった。

休薬期間試験期間中の 25 mg/kg 投与群雌の体重増加量は対照群より大きかったが、同群雄の体重増加量は、対照群と同等であった。

摂餌量；各動物に毎朝 400 g の固形飼料を与え、午後には残量を回収して重量を測定した。各群の平均摂餌量 (g/動物/週) を下表に示す。

性別	雄				雌			
投与量 (mg/kg)	0	0.25	2.5	25	0	0.25	2.5	25
第 0～13週 (投与期間)	2461	2399	2327	2016♠	1901	1899	1797	1630
第13～17週 (休薬期間)	2695	—	—	2405	2280	—	—	2279

↑↓ : p<0.05, ♠♠ : p<0.01, ♠♠♠ : p<0.001 (Dunnnettの多重検定)

被験物質投与期間中の 25 mg/kg 投与群における摂餌量は、対照群と比較して雄で 18%、雌で 14% 低下した。2.5 mg/kg 投与群でも、雄雌とも対照群より約 5% 低下した。0.25 mg/kg 投与群では、雄雌の摂餌量に軽微な変動はあったが、明らかな被験物質投与の影響はみられなかった。

休薬期間中、25 mg/kg 投与群雄では、対照群と比較して継続した低下がみられたが、同群雌の摂餌量は、対照群と同等であった。

血液学的検査；被験物質投与開始前、第 6 週、第 13 週及び第 18 週（回復期間）に一夜絶食させた全試験動物の頸静脈から、EDTA 処理容器及びクエン酸ナトリウム処理容器に血液を採取して以下の項目について検査を行った：

ヘモグロビン濃度、赤血球数、赤血球容積（ヘマトクリット）、網状赤血球数、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、ヘモグロビン分布幅、赤血球分布幅、血小板数、血小板容積、平均血小板容積、血小板分布幅、白血球数、白血球型別百分率、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

対照群と比較して、統計学的有意差の認められた項目及び対照群に対する変動率を下表に示す。

検査 時期	性 別	雄			雌		
	投与量(mg/kg)	0.25	2.5	25	0.25	2.5	25
第 6 週	ヘモグロビン濃度			↓ 88			↓ 86
	赤血球数			↓ 88			↓ 89
	ヘマトクリット			↓ 90			↓ 88
	MCV		↑ 104				
	MCH		↑ 105				
	血小板数			↑ 127			
	プロトロンビン時間						↑ 110
	APTT		↑ 112	↑ 170			↑ 168
第 13 週	ヘモグロビン濃度			↓ 80	↓ 85		↓ 78
	赤血球数		↓ 87	↓ 77	↓ 84		↓ 78
	ヘマトクリット			↓ 83	↓ 87		↓ 81
	網状赤血球率		↑ 192	↑ 158			
	網状赤血球数		↑ 175				
	MCV		↑ 106	↑ 107			↑ 104
	MCH		↑ 106				
	MCHC			↓ 96			↓ 96
	血小板数			↑ 135			↑ 132
	プロトロンビン時間			↑ 107			↑ 110
	APTT			↑ 177			↑ 161
休 薬 試 験	網状赤血球率	-	-	↑ 183	-	-	
	網状赤血球数	-	-	↑ 156	-	-	
	MCV	-	-	↑ 107	-	-	
	MCH	-	-	↑ 103	-	-	
	MCHC	-	-	↓ 97	-	-	

↑↓ : p<0.05、↑↓ : p<0.01、↑↓ : p<0.001 (Dunnett の多重検定)

25 mg/kg 投与群及び 2.5 mg/kg 投与群雄雌において、第 6 週の検査時に赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリットの低下並びに赤血球恒数の変動がみられ、第 13 週の検査時には、その変動はより鮮明に認められた。これらの変動と関連する網状赤血球数の増加が、25 mg/kg 及び 2.5 mg/kg 投与群雄に認められた。また、血小板数の増加及び PT、APTT の延長傾向が認められた。

休薬試験終了時の検査では、これらの変化は殆ど消失していたが、25 mg/kg 投与群雄において、網状赤血球数の増加及び赤血球恒数の軽微な変化がみられた。

血液生化学的検査；血液検査用試料採取時には、同時にヘパリン処理容器に採血し、血漿を採取して以下の検査を行った。

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)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、γグルタミルトランスフェラーゼ、ナトリウム、カルシウム、カリウム、塩素、無機リン、総タンパク、アルブミ

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

ン、グロブリン、A/G比、グルコース、尿素、総ビリルビン及びクレアチニン

対照群と比較して、統計学的有意差の認められた項目及び対照群に対する変動率 (%) を以下に示す。

検査 時期	性 別	雄			雌		
		投与量 (mg/kg)	0.25	2.5	25	0.25	2.5
第1週	AST	▲ 145	↑ 129				
	カリウム	↑ 114					
第6週	ALT			↓ 63			↓ 62
	ALP						↓ 74
	カルシウム			↓ 95			
	総タンパク			↓ 93			
	アルブミン			↓ 83			↓ 90
	A/G比			↓ 85			
	グルコース			↓ 87			
第13週	ALT			↓ 72			
	ALP				↓ 64		
	カリウム			↓ 95			↓ 93
	塩素			↑ 102			
	カルシウム			↓ 95			
	総タンパク			↓ 91			↓ 91
	アルブミン			↓ 84			↓ 88
	A/G比			↓ 87			
	総ビリルビン						
	グルコース						↓ 88
休業 試験	ALT			↑ 181			
	ナトリウム						↑ 101
	総ビリルビン						↑ 211

↑↓ : p<0.05, ↑↓ : p<0.01, ▲▼ : p<0.001 (Dunnett の多重検定)

第6週及び第13週では、25 mg/kg 投与群雄雌の ALT 活性が低下し、個体別測定値のほとんどが対照群の最小値より低く、この変化は被験物質投与に関連したと考えられた。この値は休業試験群では対照群より高く、回復が示唆された。第6週及び第13週では、25 mg/kg 投与群雄にカルシウムの低下、アルブミン、総タンパク、A/G比及びグルコースの低下がみられた。第13週には、25 mg/kg 投与群雄雌でカリウムの低下もみられた。

休業群では、雄の ALT、雌のナトリウム及びビリルビンに有意差がみられたが、その他の項目には有意差がみられず、被験物質投与の影響からの回復性が示唆された。

コリンエステラーゼ活性;血液生化学的検査と同時に血漿及び赤血球コリンエステラーゼ活性の測定を行った。また、剖検時に大脳の左半球を採取し、コリンエステラーゼ活性の測定に供した。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

対照群に対する各項目の変動率 (%) を以下に示す。なお、統計学的解析結果に係わらず、脳及び赤血球について、対照群の平均値から 20%以上変動した場合を被験物質の影響と判断した。

検査 時期	性別 投与量 (mg/kg)	雄			雌		
		0.25	2.5	25	0.25	2.5	25
第1週	血漿	115	101	114	111	108	107
	赤血球	95	127	87	78	75	96
第6週	血漿	119	♯ 56	♣ 40	126	↓ 63	♣ 40
	赤血球	109	↓ 69	♣ 23	91	♯ 49	♣ 20
第13週	血漿	103	♯ 50	♣ 47	96	♯ 51	♣ 42
	赤血球	115	↓ 66	♣ 20	85	↓ 49	♣ 25
投与終了時剖検	脳	138	100	77	97	86	↓ 60
第17週	血漿	—	—	145	—	—	114
	赤血球	—	—	92	—	—	80
休薬終了時剖検	脳	—	—	↑ 154	—	—	85

↑↓ : p<0.05, ♯♯ : p<0.01, ♣♣ : p<0.001 (Dunnett の多重検定)

第6週及び第13週には、2.5 mg/kg 投与群及び25 mg/kg 群投与雄雌において、赤血球コリンエステラーゼ活性の低下がみられた。25mg/kg 投与群雌では、投与終了時検査で脳コリンエステラーゼ活性の低下がみられ、同群雄でも統計学的有意差はみられなかったが、低下傾向がみられた。

休薬試験終了時検査では、25 mg/kg 投与群雌に脳コリンエステラーゼ活性の低下が認められ、赤血球コリンエステラーゼ活性も、統計学的有意差はみられなかったが、対照群より僅かに低い傾向があった。しかし、第13週の検査結果と比較した場合、明らかな回復傾向が認められた。

尿検査；第5週及び第12週に全動物から一夜尿を採取し、以下の項目について検査した。採取中は、飼料及び水を与えなかった。

沈査、混濁度、色調、尿量、比重、pH、タンパク、糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン、還元物質

いずれの項目にも被験物質投与の影響はみられなかった。

第5週の検査では、25 mg/kg 投与群雄に潜血が観察されたが、尿採取時の損傷によるものと考えられた。

眼科学的検査；全動物について、被験物質投与開始前及び第12週に実施した。検査前に散瞳剤を点眼した。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

いずれの検査時期においても、すべてのイヌに病変あるいは異常は観察されなかった。

臓器重量；剖検時に以下の臓器を摘出して重量を測定するとともに、剖検直前に測定した体重に基づき対体重比を算出した。

肝臓、心臓、脳、腎臓、脾臓、副腎、甲状腺及び上皮小体、胸腺、精巣及び精巣上体、卵巣、子宮

対照群と比較して、統計学的有意差の認められた臓器及び対照群に対する変動率（％）を以下に示す。

検査時期	性別		雄			雌		
	投与量 (mg/kg)		0.25	2.5	25	0.25	2.5	25
投与終了時 検査	副腎	対体重比						↑ 143
	肝臓	対体重比			↑ 124		↑ 123	↑ 127
	心臓	絶対重量			↓ 76			
	脳	対体重比						↑ 133
	胸腺	絶対重量						↓ 56
休薬終了時 検査	脾臓	対体重比			↑ 135			
	心臓	絶対重量			↓ 83			

↑↓ : p<0.05, ↑↓ : p<0.01, ◆◆ : p<0.001 (Dunnett の多重検定)

投与終了時検査では、25 mg/kg 投与群雄雌の肝臓重量対体重比の増加（24～27％）がみられたが、肝臓重量は対照群と同等で、この変化と関連する病理組織学的所見もみられなかった。休薬終了時には、同群雄雌の肝臓重量及び対体重比は対照群と同等であった。被験物質投与群全群雄雌では、心臓重量の低下傾向がみられた。しかし、対体重比は、すべての投与群で対照群と同等であり、体重が小さかったことによると考えられた。休薬終了時にも、25 mg/kg 投与群雄雌の心臓重量は低かったが、対体重比は対照群と同等であった。

25 mg/kg 投与群雌の脳重量対体重比は、対照群データより高かった。脳に病理組織学的所見はなく、この変化は被験物質投与による影響ではなく、体重の低下によると考えられた。

肉眼的病理検査；死亡動物を含めた全動物について剖検を行った。計画屠殺時まで生存した動物は、麻酔薬を静脈内注射後に放血し、肉眼的病理検査を行った。

投与終了時の検査において、ほとんどの組織に肉眼的な著しい変化はなく、被験物質投与に関連した肉眼的所見はみられなかった。

休薬終了時における剖検でも、特記すべき病変は観察されなかった。

病理組織学的検査；剖検に供した全動物から以下の組織を採取して、パラフィン切片を作製し、HE 染色標本を作製して検鏡した。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

肝臓、心臓、腎臓、脾臓、副腎、肺（気管支を含む）、大動脈、リンパ節（下顎、腸間膜）、胸骨及び骨髄、乳腺、脳、眼及び視神経、膵臓、大腿骨及び骨髄、胆嚢、下垂体、前立腺、食道、胃、唾液腺、骨格筋、筋肉（大腿四頭筋）、皮膚、十二指腸、空腸、回腸、虫垂、結腸、直腸、パイエル板、脊髓（頸部、胸部、腰部）、坐骨神経、精巣及び精巣上体、舌、甲状腺及び上皮小体、胸腺、涙腺、気管、膀胱、卵巣、子宮、陰、骨髄塗沫（胸骨）、肉眼的異常部位

認められた所見を別表 1~2 に示す。

投与終了時の検査において認められた病変は少なく、ほとんどは、この系統及び年齢の動物に通常観察される変化であった。被験物質投与との関連が考えられる唯一の所見は、胸骨及び大腿骨の骨髄における造血亢進であった。各群における造血亢進の発現頻度を下表に示す。

検査時期 (検査動物数)	性別		雄				雌			
	投与量 (mg/kg)		0	0.25	2.5	25	0	0.25	2.5	25
第 10 週 (途中屠殺) (雄 1、雌 1)	胸 骨	軽 度	—	—	—	1	—	—	—	—
		軽 微	—	—	—	1	—	—	—	—
	大 腿 骨	軽 度	—	—	—	—	—	—	—	1
投与終了時 (雄 4、雌 3)	胸 骨	軽 微	0	0	0	0	0	0	0	2
		軽 度	0	0	2	3	0	1	3	1
	大 腿 骨	軽 微	0	0	0	2	0	0	1	2
		軽 度	0	0	0	0	0	1	0	0
休業終了時 (雄 3、雌 4)	胸 骨	軽 微	0	—	—	0	0	—	—	1
		軽 度	0	—	—	0	0	—	—	1
	大 腿 骨	軽 度	0	—	—	0	0	—	—	2

25 mg/kg 投与群及び 2.5 mg/kg 投与群の雄雌においてこの影響が観察され、雄よりも雌における発現頻度が高く、グレードも重かった。0.25 mg/kg 投与群雌の 1 例にも、この病変が観察されたが、血液学的検査では関連する変化が認められていないので、毒性学的に意義の乏しい変化であると考えられた。

回復期間終了後の検査において、25 mg/kg 投与群雌の数例には、引き続き大腿骨及び胸骨の骨髄における造血亢進が観察されたが、雄の骨髄における造血は対照群と同等であった。

以上の結果から、イヌに 2.5 mg/kg/day あるいは 25 mg/kg/day の投与量で本剤を 13 週間強制経口投与した結果、血液学的検査における種々の項目に変化（ヘモグロビン濃度、赤血球数、ヘマトクリットの低下、網状赤血球数の増加、血小板数の増加等）が認められ、また、コリンエステラーゼ活性の阻害も認められた。25 mg/kg/day 投与群では、体重増加量及び摂餌量の低下、臨床観察における痩身、ALT 活性及び胸腺重量の低下が認められた。病理組織学的検査でも、2.5 mg/kg/day 以上の投与群に造血亢進が観察された。従って、本試験における無毒性量 (NOAEL) は、0.25 mg/kg/day 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および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

別表 1: 投与終了時剖検動物の病理組織所見

臓器	性別	雄				雌			
	投与量 (mg/kg)	0	0.25	2.5	25	0	0.25	2.5	25
	検査動物数	4	4	4	4	4	4	4	3(1)
皮膚	毛嚢炎	2		1	2	2	4	2	3(1)
大腿骨/骨髓	造血亢進				2		1	1	2(1)
胸骨/骨髓	造血亢進			2	3		1	3	3
肝臓	限局性炎症細胞巣	4	4	3	4	4	4	4	3(1)
	色素沈着			1					
脾臓	ヘモジデリン結節			1					
膵臓	限局性炎症細胞巣					1			
腎臓	乳頭石灰化	3	4	3	4	4	4	4	3(1)
	限局性腎症	3	1	1	2			1	
	移行上皮過形成		1						
胃	鬱血	1	1			3	2	1	
	石灰化			1					
	リンパ組織過形成							1	
十二指腸	鬱血		1	2				1	
	腺嚢胞化						1	1	
空腸	鬱血		1						
回腸	鬱血	3	1			1			
盲腸	接合部鬱血	3	2	1		2	1	1	2(1)
	鬱血							2	
結腸	鬱血	3	1			1	1	2	
直腸	直腸炎						1		
子宮	性周期							1	
前立腺	未熟				1				
精巣	未熟				1				
卵巣	性周期							2	
	未熟								(1)
胸腺	嚢胞				1				(1)
	退縮				2				(1)
	リンパ組織過形成							1	
甲状腺	C細胞複合体	1							(1)
	コロイド減少								(1)
上皮小体	嚢胞	1		1	1	1	1	1	
肺	限局性炎症細胞巣	2	3	2	3	4	4	3	3(1)
	泡沫細胞			1	1				
	肺炎		1		1				
	胸膜線維化/癒着							1	
舌	舌炎							1	
	肉芽				1				
下垂体	嚢胞		3	2	2	2		1	
陰門	性周期							2	

(): 第 10 週に屠殺した動物

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

別表 2：休薬終了時剖検動物の病理組織所見

臓器	性別	雄				雌			
	投与量 (mg/kg)	0	0.25	2.5	25	0	0.25	2.5	25
	検査動物数	4	0	0	3 (1)	4	0	0	4
眼球	角膜炎								1
皮膚	毛嚢炎	3			3				
大腿骨/骨髓	造血亢進				(1)				2
胸骨/骨髓	造血亢進				(1)				2
肝臓	限局性炎症細胞巣	4			3 (1)	4			4
脾臓	ヘモジリン結節	1			1				
副腎	皮質空胞化					1			2
腎臓	乳頭石灰化	4			3 (1)	4			4
	限局性腎症	2			2	2			3
	移行上皮過形成				1				
胃	鬱血	2							
	石灰化	1			1				
空腸	鬱血	1							
回腸	鬱血	1							
盲腸	接合部鬱血	3			2 (1)	2			1
直腸	直腸炎				(1)	1			
	鬱血	1							
子宮	性周期					3			2
膀胱	限局性炎症細胞巣					1			
前立腺	前立腺炎				1				
精巣	精細管萎縮	1							
精巣上体	精巣上体炎				1				
卵巣	性周期					3			2
胸腺	退縮					1			
	リンパ組織過形成				1				
甲状腺	C細胞複合体	1			1				
上皮小体	嚢胞	1			2 (1)				
心臓	弁膜血栓					1			
肺	限局性炎症細胞巣	3			2 (1)	3			4
	肺炎					1			
舌	舌炎	1			1				
下垂体	嚢胞	4							
陰門	性周期					2			1
脚	創傷					1			
バイエル板	リンパ組織萎縮								(1)

(): 第 10 週に屠殺した動物

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

(6) 28 日間反復経皮投与毒性

ラットを用いた 28 日間反復経皮投与毒性

(資料 T13)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2003 年

被験物質：イミシアホス原体

供試動物：CrI:WI(G1x/BRL/Han)BR系ラット、投与開始時約12週齢、1群雄雌各5匹（休薬試験群は対照群及び高用量群雄雌各5匹）、体重：雄 280.4～352.2 g、雌 172.3～237.0 g

投与期間：28日間（2002年7月16日～8月13日）

投与方法：被験物質を1%CMCに溶解して、2.5、25及び250 mg/kg/dayの用量を28日間毎日6時間、動物の背部約5×5 cm（体表面積の10%）の皮膚に経皮投与した。被験物質投与液は毎日調製した。2 週間の休薬期間中は被験物質を投与しなかった。

用量設定根拠：

観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡率；一般状態及び生死を毎日観察するとともに、詳細な状態の観察を毎週 1 回実施した。また、投与部位の皮膚の状態（紅斑及び浮腫）を毎日観察した。

投与期間中及び休薬期間中に死亡した動物はみられなかった。

被験物質投与に関連する症状は、いずれの投与群にも認められなかった。

投与部位の皮膚には、被験物質の刺激性を示唆する所見は認められなかった。

体重変化；投与開始から投与終了並びに休薬期間終了まで毎週 1 回、全ての動物の体重を測定した。また、剖検前にも体重を測定した。

体重推移には、被験物質投与の影響はみられなかった。

摂餌量；全動物の摂餌量を個体別に毎週測定した。

摂餌量には、被験物質投与の影響は認められなかった。

血液学的検査；投与第 4 週及び休薬第 2 週に各群の生存動物全例について、尾静脈より採血し、以下の検査を行った。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

ヘモグロビン濃度、赤血球数、ヘマトクリット（赤血球容積）、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、網状赤血球数、白血球数及び白血球百分率、血小板数

また、剖検時に採取した血液を用いて、プロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間の測定を行った。

対照群と比べて、統計学的有意差の認められた項目及び対照群に対する変動率（%）を下表に示す。

検査時期	検査項目	雄 (mg/kg/day)			雌 (mg/kg/day)		
		2.5	25	250	2.5	25	250
投与終了時検査	ヘモグロビン			♯ 95			
	ヘマトクリット			♯ 93			↓ 94
	好中球比率	↑ 147		↑ 143	↑ 167		
	リンパ球比率	↓ 86		↓ 87			
	リンパ球数	↓ 69		♯ 75			

↑↓ : p<0.05, ♯ : p<0.01, ♣♣ : p<0.001 (Dunnettの多重検定)

投与終了時検査では、対照群と比較して、高用量群の雄で有意なヘモグロビン及びヘマトクリットの低下、同群雌でヘマトクリットの低下が認められた。休薬群では、これらの変化は認められなかった。

また、低用量群及び高用量群の雄では、リンパ球比率の低下を伴う好中球比率の増加がみられ、低用量群雌でも好中球比率の増加がみられた。これらの変化は、片性のみの変化、あるいは用量相関性のない変化であったので、偶発的変化と考えられた。

血液生化学的検査；投与終了時及び休薬期間終了時の剖検の際に腹大動脈から血液を採取し、以下の検査を行った。

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）、アルカリフォスファターゼ（ALP）、血漿コリンエステラーゼ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、無機リン、塩素、総蛋白、アルブミン、グロブリン、A/G 比、総コレステロール、グルコース、尿素窒素、総ビリルビン、クレアチニン、赤血球コリンエステラーゼ

第 4 週の血液学的検査用試料採取時に得られた血液でも、コリンエステラーゼ活性の測定を行った。

また、剖検時に各動物の脳を半分使用して、脳中コリンエステラーゼ活性を測定した。コリンエステラーゼを除く検査項目では、投与終了時の検査において対照群と比べて有意な変化がみられた項目はなかった。休薬試験群の高用量群雄では、有意な総ビリルビ

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

ン量の増加が認められたが、投与終了時にはみられなかった変化なので、偶発的な変化であると考えられた。

コリンエステラーゼ活性の対照群に対する活性値 (%) を下表に示す。なお、統計学的解析結果に係わらず、脳及び赤血球について、対照群の平均値から 20%以上変動した場合を被験物質の影響と判断した。

検査時期	性別	雄			雌		
	投与量 (mg/kg)	2.5	25	250	2.5	25	250
第 4 週	赤血球	138	109	85	133	106	102
	血漿	101	↓ 71	↓ 39	↓ 74	↓ 35	↓ 11
投与終了時 (解剖時)	血漿*	↓ 74	↓ 40	↓ 15	92	↓ 35	↓ 2
	赤血球	108	107	82	72	↓ 57	88
	血漿	88	↓ 62	↓ 37	91	↓ 42	↓ 10
	脳	97	85	↓ 47	95	87	↓ 46
第 7 週	血漿*	-	-	104	-	-	↓ 73
	赤血球	-	-	130	-	-	92
	血漿	-	-	106	-	-	↓ 77
休薬終了時 (解剖時)	脳	-	-	↓ 77	-	-	↓ 85

* : 基質にブチルチオコリンを使用

↓ : p<0.05、↓↓ : p<0.01、↓↓↓ : p<0.001 (Dunnett の多重検定)

被験物質を 4 週間投与した後の赤血球コリンエステラーゼ活性には、被験物質投与の影響は認められなかった。対照群との間に幾つの変動がみられたが、それらに一貫性がなく、高用量群には毒性学的に有意と考えられる変動は認められなかった。休薬期間終了時、高用量群の赤血球コリンエステラーゼ活性は、対照群の活性と同等か、もしくは高かった。

被験物質を 4 週間投与した中用量群及び高用量群の雄雌では、血漿コリンエステラーゼ活性の低下が認められた。これらは、被験物質投与に関連したものと考えられた。同様に、これらの群では、血漿ブチルコリンエステラーゼ活性の低下も剖検時に認められた。

休薬期間終了後の剖検では、対照群と比較して高用量群の雌における血漿アセチルコリンエステラーゼ活性及びブチルコリンエステラーゼ活性の僅かな低下が認められ、十分に回復していないことが示唆された。同群雄の活性には回復性がみられ、対照群と同等であった。

投与終了時の剖検の際に採取した脳では、コリンエステラーゼ活性の低下が高用量群の雄雌に認められた。中用量及び低用量群雄雌における脳コリンエステラーゼ活性は、対照群よりも僅かに低下していたが、有意な変化ではなかった。休薬期間終了時の脳コリンエステラーゼ活性には明らかな回復が認められたが、高用量群雄では対照群と比べて 20%以上の低下が認められた。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

眼科学的検査；被験物質投与開始前には全例について、また、投与第 4 週には対照群及び高用量群について、散瞳剤を点眼後、眼科学的検査を実施した。

投与期間終了時、高用量群の動物に眼科学的病変あるいは異常は認められなかった。従って、休薬期間終了時の眼科学的検査は実施しなかった。

臓器重量；投与終了時及び休薬期間終了時の全生存動物を対象に以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣及び精巣上体、卵巣、子宮

対照群と比べて、いずれの投与群にも被験物質の影響と思われる有意な臓器重量の変動は認められなかった。但し、投与終了時剖検例では、中間用量群雌の脾臓の対体重比重量が対照群より僅かに低かったが、高用量群では同様な変化が認められていないので偶発的な変化であると考えられた。

肉眼的病理検査；投与終了時及び休薬期間終了時に全生存動物について、詳細な剖検を行った。

いずれの動物にも、明らかな肉眼的病変はみられず、僅かに観察された所見も、試験に使用した系統及び週齢の動物に通常みられる所見であった。

病理組織学的検査；肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、以下の組織について病理標本作製し、対照群及び高用量群全例について検鏡するとともに、剖検で観察された全ての異常部位、並びに低用量及び中間用量群の肝臓及び腎臓について検鏡した。

副腎、視神経、卵巣、大動脈、膵臓、骨髓塗抹標本（大腿骨）、パリエル板、脳、下垂体、前立腺、盲腸、直腸、結腸、唾液腺、投与部位、坐骨神経、十二指腸、精囊、眼球、皮膚、大腿骨及び骨髄、頸部脊髄、肉眼的病変部、腰部脊髄、ハーダー腺、胸部脊髄、頭部、脾臓、心臓、胸骨及び骨髄、回腸、胃、空腸、精巣及び精巣上体、腎臓、胸腺、涙腺、甲状腺及び上皮小体、喉頭、舌、肝臓、気管、肺及び主要気管支、乳腺、膀胱、下顎リンパ節、子宮、腸管膜リンパ節、膈、骨格筋（四頭筋）、ジンバル腺、鼻甲介、鼻咽頭、食道

観察された所見を別表に示す。

病理組織学的所見は、試験に使用した系統及び週齢の動物に通常みられる所見と同等であった。高用量群の投与部位で認められた病理組織学的所見は、概ね対照群と同等であった。

以上の結果から、本剤のラットに対する 28 日間経皮投与による反復経皮投与毒性試験における影響として、25 mg/kg/day 以上の投与群雄雌では、赤血球コリンエステラーゼ活性の低下がみられ、250 mg/kg/day 投与群では、脳のコリンエステラーゼ活性にも低下がみられた。2.5

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

mg/kg/day 投与群では、血漿コリンエステラーゼ活性の軽度な低下がみられたが、通常、血漿コリンエステラーゼは、コリンエステラーゼ活性阻害の評価の指標とはならないので、本試験における無毒性量 (NOAEL) は、雄雌とも 2.5 mg/kg/day であると判断された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

別表：病理組織学的検査

検査時期	臓器	所見	雄 (mg/kg/day)				雌 (mg/kg/day)			
			0	2.5	25	250	0	2.5	25	250
投 与 終 了 時 剖 検 群	肝 臓	検査動物数	5			5	5			5
		限局性細胞浸潤	5			5	5			5
		限局性壊死	1							
	腎 臓	検査動物数	5			5	5			5
		硝子滴変性	2			2				
		腎乳頭部石灰化	1			1				
			水腎症				1			1
	皮膚処理部位	検査動物数	5			5	5			5
		表皮肥厚/角化症	5			5	2			3
		表皮症								1
	盲 腸	検査動物数	1	1	2	0	1	1	1	3
		バルビツール酸塩溶解	1	1	2		1	1	1	3
		寄生虫			1					
	腸間膜リンパ節	検査動物数	1							
		バルビツール酸塩溶解	1							
	下顎リンパ節	検査動物数		2	1	1	1	2	1	1
		終末期うっ血/出血		2			1	2	1	1
		色素沈着		1						
			リンパ組織過形成		1	1		1		1
	皮 膚	検査動物数		1			1			
		皮膚炎/毛嚢炎		1			1			
	卵 巣	検査動物数					1	1		1
		性周期					1	1		1
	子 宮	検査動物数					2	1		
性周期						2	1			
胸 腺	検査動物数		2							
	終末期うっ血/出血		1							
	萎 縮		1							
膀 胱	検査動物数		1	1						
	拡 張		1	1						
精 巢	検査動物数		1							
	精細管石灰化		1							
	精細管萎縮		1							
前立腺	検査動物数		1							
	バルビツール酸塩溶解			1						
休 薬 群	肝 臓	検査動物数	5			5	5			5
		終末期うっ血/出血				1				
		限局性細胞浸潤	5			5	5			5
	腎 臓	検査動物数	5			5	5			5
		硝子滴変性	4			2				
		腎乳頭部石灰化					1			
		水腎症	1							1
		尿細管好塩基性変性				1				
			腎盂炎	1						
	皮膚処理部位	検査動物数	5			5	5			5
		表皮症	1							
	盲 腸	検査動物数	1			1	2			
		バルビツール酸塩溶解	1			1	2			
	子 宮	検査動物数					1			1
		性周期					1			1
	胸 腺	検査動物数								1
		終末期うっ血/出血								1
	膀 胱	検査動物数	1							
		バルビツール酸塩溶解	1							
	精 囊	検査動物数	1							
		萎 縮	1							

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

(7) 1年間反復経口投与毒性及び発がん性

① ラットを用いた飼料混入投与による1年間反復経口投与毒性/発がん性併合試験 (資料 T14)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2005 年

被験物質: イミシアホス原体

供試動物: Crj: WI (Glx/BRL/Han) IGS[SPF]系ラット、投与開始時約5週齢、

投与開始時体重範囲: 雄 112~159 g、雌 96~129 g

試験動物数						
投与量 (ppm)	慢性毒性群				発癌性試験群	
	26週間投与		52週間投与		104週間投与	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
0	10	10	10	10	50	50
3	10	10	10	10	50	50
10	10	10	10	10	50	50
50	20	20	20	20	50	50

投与期間: 104週間 (2001年8月16日~2003年8月14~19日)

投与方法: 被験物質を0、3、10及び50 ppmの濃度で飼料に混入し、104週間にわたって随時摂取させた。被験物質混入飼料は毎週1回調製し、給餌器は週2回取り替えた。

用量設定根拠:

観察・検査項目及び結果:

一般状態の観察及び死亡率: 一般状態及び生死を毎日2回観察した。

投与終了時の死亡率 (%) を以下に示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

投与期間	投与量 (ppm)	0	3	10	50
52 週間	雄	1.4	1.7	3.3	5.1
	雌	1.7	3.1	0.0	2.9
104 週間	雄	31.6	29.8	27.5	32.8
	雌	27.8	20.9	10.0	34.6

死亡率には、被験物質投与の影響は認められなかった。

投与期間中、削瘦、立毛、皮下部の腫瘍、眼分泌物、自発運動低下、耳介等の蒼白、鼻端の汚れ、被毛の汚れ、足根部趾面の硬結などの症状が対照群を含む各投与群にみられたが、いずれも加齢とともによく観察される自然発生的な変化であり、被験物質投与の影響は認められなかった。

体重変化；投与開始から投与 16 週までは毎週 1 回測定し、以降、投与終了までは 4 週に 1 回測定した。

各投与群雄雌には、被験物質投与の体重推移に対する影響はみられなかった。

摂餌量及び食餌効率；全動物の摂餌量を毎週 2 回測定し、摂餌量 (g/week) 及び投与開始から 13 週間の食餌効率 (%) を算出した。

各群の摂餌量の推移を下表に示す。

性 別	雄				雌			
	0	3	10	50	0	3	10	50
投与量 (ppm)	0	3	10	50	0	3	10	50
第 1 週	118	↑ 122	122	♯ 126	98	♯ 102	100	100
第 13 週	135	137	135	140	99	102	100	102
第 26 週	134	139	135	137	103	105	103	103
第 1~26 週の総 摂餌量 (g/rat)	3481	3562	3511	↑ 3609	2637	2680	2651	2691
第 52 週	146	150	147	151	112	112	110	116
第 78 週	154	154	159	159	129	131	124	132
第 104 週	142	157	153	↑ 167	122	131	134	136
第 1~104 週の 総摂餌量 (g/rat)	14766	14667	14945	15408	11787	11827	11500	12013

↑↓ : p<0.05、♯♯ : p<0.01 (Dunnnett の多重検定または Steel の検定)

対照群と比較して、50 ppm 投与群雄で投与 26 週までの総摂餌量が対照群より高かった。その後も高い値を示す週が散見されたが、投与期間の総摂餌量は対照群と同等であった。その他の投与群の摂餌量は、対照群と同等であった。

投与開始から 13 週間の各群の食餌効率 (%) を下表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

性別	雄				雌			
	0	3	10	50	0	3	10	50
投与量 (ppm)	0	3	10	50	0	3	10	50
第1週	31.8	32.3	30.9	↓30.3	21.8	22.7	22.1	22.0
第4週	20.8	20.6	20.3	↓19.4	12.2	12.3	11.6	↓10.6
第8週	9.9	9.4	9.5	↓8.7	4.5	5.2	5.1	5.7
第13週	6.2	6.4	6.6	5.8	1.9	1.9	2.6	2.4
1~13週	15.6	15.4	15.2	↓14.9	9.0	8.9	↓8.6	↓8.7

↑↓ : p<0.05, ↓↑ : p<0.01 (Dunnnettの多重検定またはSteelの検定)

対照群と比較して、50 ppm 投与群の雄で投与1から4週及び投与8週、雌で投与2から4週、また、10 ppm 投与群の雌で投与2から3週に食餌効率の低下がみられ、13週間の平均食餌効率も低かった。

被験物質摂取量；摂餌量、体重及び飼料中被験物質濃度から算出した104週間の平均被験物質摂取量は、以下の通りであった。

投与量 (ppm)	被験物質摂取量 (mg/kg/day)	
	雄	雌
3	0.15	0.19
10	0.51	0.64
50	2.71	3.31

血液学的検査；投与後26、52及び104週にそれぞれの計画解剖動物を対象として、腹大動脈から血液を採取して、以下の項目の測定を行った。

ヘマトクリット、ヘモグロビン、赤血球数、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、血小板数、白血球数、白血球百分率、網赤血球率

対照群と比較して、有意差の認められた項目及び対照群に対する変動率 (%) を以下に示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

検査 時期	性別	雄			雌		
		投与量 (ppm)	3	10	50	3	10
第 26 週	ヘモグロビン				↑ 103		
	MCHC					↑ 104	
	血小板数		↑ 111				
	網状赤血球率			↑ 158			↑ 127
	単球比率						↑ 150
第 52 週	MCV					↓ 96	
	網状赤血球率			↑ 122			
	白血球数					↑ 139	
	好中球比率				↓ 74		↓ 71
	リンパ球比率				↑ 117		↑ 118
第 104 週	MCV				↓ 98	↓ 98	
	MCHC				↑ 102	↑ 102	
	好中球数						↑ 160
	網状赤血球率						↑ 124

↑↓ : p<0.05、↑↑ : p<0.01 (Dunnnett の多重検定)

50 ppm 投与群雄雌で投与 26 週、雄で投与 52 週及び雌では投与 104 週にそれぞれ網赤血球率の増加がみられ、被験物質投与の影響と考えられた。

血液凝固検査；投与後 26 及び 52 週は、それぞれの計画解剖動物を対象として、腹大動脈から採血して得られた血漿について、以下の項目を測定した。

プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、フィブリノーゲン量

対照群と比較して、有意差の認められた項目及び対照群に対する変動率 (%) を下表に示す。

検査 時期	性別	雄			雌		
		投与量 (ppm)	3	10	50	3	10
第 26 週	P T	↓ 96			↓ 95		↑ 107
	APTT					↓ 59	↓ 75
第 52 週	P T					↓ 95	
	フィブリノーゲン量		↓ 89				

↑↓ : p<0.05、↑↑ : p<0.01 (Dunnnett の多重検定)

各項目には、軽度な変動が認められたが、いずれも用量相関性及び一貫性における変動であり、被験物質投与とは関連しないと考えられた。26 週には、中間屠殺した雌で APTT

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

の短縮が認められたが、用量相関性及び一貫性のない変化であった。

血液生化学的検査；投与後 26 及び 52 週に、それぞれの計画解剖動物を対象として、腹大動脈から採血して得られた血清を用いて以下の項目を測定した。

総蛋白、アルブミン、A/G 比、グルコース、中性脂肪、リン脂質、総コレステロール、尿素窒素、クレアチニン、総ビリルビン、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)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ、カルシウム、無機リン、ナトリウム、カリウム、塩素

対照群と比較して、有意差の認められた項目及び対照群に対する変動率 (%) を下表に示す。

検査 時期	性別 投与量 (ppm)	雄			雌		
		3	10	50	3	10	50
第 26 週	ALT					↑ 133	
	総ビリルビン		↑ 167	↑ 167			
	アルブミン		↑ 107				
	グルコース			↓ 91			
	総コレステロール			↑ 126			
	クレアチニン			↓ 87			
	無機リン			↑ 120			
	ナトリウム				↑ 101		
第 52 週	グルコース		↓ 85	↓ 83			
	ALP			↓ 83			
	塩素	↑ 101					
	カリウム			↑ 106			
	無機リン		↑ 122	↑ 124			
	尿素窒素						↓ 85

↑↓ : p<0.05、↑↑ : p<0.01 (Dunnnett の多重検定)

投与 26 週には、10 及び 50 ppm 投与群雄で総ビリルビンの増加がみられた。50 ppm 投与群雄では、総コレステロール及び無機リンの増加及びグルコースの低下がみられた。

投与 52 週には、10 及び 50 ppm 投与群雄で無機リンの増加及びグルコースの低下、50 ppm 投与群雄でカリウムの増加がみられた。

以上の変化は、機序は不明であったが、被験物質投与の影響と考えられた。

ALP、クレアチニン及び尿素窒素に認められた統計学的に有意な変化については、用量相関性がみられない、あるいは減少方向への変化であり、毒性学的意義は低いと考えられた。

コリンエステラーゼ活性検査；26 及び 52 週の計画解剖動物、並びに発がん性試験群の 1 群 12 匹について、血漿、赤血球及び脳のコリンエステラーゼ活性を DTNB 法で測定した。

対照群と比較して、有意差の認められた項目及び対照群に対する変動率 (%) を下表に

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

示す。なお、統計学的解析結果に係わらず、脳及び赤血球について、対照群の平均値から20%以上変動した場合を被験物質の影響と判断した。

検査 時期	性別 投与量 (ppm)	雄			雌		
		3	10	50	3	10	50
第26週	血漿	0 83	0 74	0 66	0 72	0 43	0 32
	赤血球	0 80	0 49	0 20	0 86	0 47	0 24
	脳	101	104	0 83	100	0 88	0 66
第52週	血漿	0 81	0 72	0 58	0 60	0 33	0 25
	赤血球	↓ 86	0 54	0 19	↓ 86	0 48	0 23
	脳	↑ 110	↑ 111	100	93	↓ 91	0 66
第104週	血漿	66	↓ 55	0 37	0 60	0 38	0 31
	赤血球	↓ 86	0 62	0 21	↓ 84	0 47	0 24
	脳	0 118	0 128	87	99	0 82	0 55

↑↓ : p<0.05, 0 : p<0.01 (Dunnnett の多重検定)

50 ppm 投与群雄雌では、赤血球及び脳コリンエステラーゼ活性の著しい低下がみられ、10 ppm 投与群でも、試験期間を通じて赤血球コリンエステラーゼの有意な低下が認められた。同群雌では、脳コリンエステラーゼについても統計学的に有意な低下が認められたが、低下率は20%以内であった。また、同群雄では、脳コリンエステラーゼ活性の有意な低下はみられなかった。3 ppm 投与群雄雌でも、赤血球コリンエステラーゼ活性の有意な低下がみられたが、赤血球コリンエステラーゼ活性の低下率は、概ね20%以下であった。また、同群では、脳コリンエステラーゼ活性の低下は認められなかった。

尿検査；投与26及び52週の計画解剖動物を対象として、採尿ケージを用いて3時間尿及び24時間尿を採取し、以下の項目について測定した。

尿量、色調、pH、潜血、ケトン体、糖、蛋白、ビリルビン、ウロビリノーゲン、尿沈渣、尿浸透圧

各群における変化のみられた項目及び半定量結果を下表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

検査時期	性別	雄				雌				
	投与量 (ppm)	0	3	10	50	0	3	10	50	
第 26 週	検査動物数	10	10	10	20	10	10	10	20	
	蛋白	-			1		2	1	2	1
		±	1	1	1			3	3	5
		30	7	1	1	3	4	1	2	10
		100	2	4	4	10	3	2	1	2
		>300		4	3	7	1	3	2	2
	ビリルビン	-	2	1	3	1	3	5	6	5
		+1	7	6		11	5	3	3	12
		+2	1	3	7	8	2	2	1	3
		+3								
	ウロビリノーゲン	0.1	7	3	3	1	2	3	3	5
		1.0	3	7	7	19	8	7	7	15
		2.0~>12								
	ケトン体	-	2		2		2	3	1	3
		±	3	1	1	1	3	4	8	10
		1+	5	9	7	19	5	3	1	7
		2+~4+								

第 26 週の検査では、3、10 および 50 ppm 群雄で蛋白 300 mg/dL 以上を示す動物の増加、10 および 50 ppm 群雄でビリルビン 2+、50 ppm 群雄でケトン体 1+、ウロビリノーゲン 1.0E.U./dL を示した動物の増加が認められた。尿中ビリルビンおよびウロビリノーゲンの上昇については、血清中ビリルビンが増加したことに関連した変化と考えられるが、増加の程度は軽度であり、病理組織学検査においても関連する明らかな所見は認められていないことから、毒性学的意義は不明であった。

投与 52 週の検査においては、いずれの投与群にも、被験物質投与と関連する変化は認められなかった。

眼科学検査；衛星群の動物については、投与開始前に全動物及び投与終了時に対照群と全投与群の全動物の両眼について、スリットランプ及び検眼鏡を用いた検査を行った。

被験物質投与の影響と考えられる変化は、いずれの投与群にも認められなかった。

臓器重量；投与後 26 及び 52 週の全生存動物と投与終了時の全生存動物を対象として、以下の臓器重量を測定し、対体重比を算出した。

脳、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、卵巣、副腎

対照群と比較して、有意差の認められた項目及び対照群に対する変動率 (%) を下表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

検査 時期	性別		雄			雌		
	投与量 (ppm)		3	10	50	3	10	50
第 26 週	脾臓	絶対重量			↑ 114			
		対体重比			↑ 114			
	副腎	対体重比						↓ 88
	卵巣	対体重比						↓ 86
第 52 週	肝臓	対体重比		↓ 92				
	卵巣	対体重比						↓ 78
第 104 週	脾臓	絶対重量						↑ 114
		対体重比						↑ 112

↑↓ : p<0.05、↑↓ : p<0.01 (Dunnnett の多重検定)

50 ppm 群では、投与 26 週の雄及び 104 週の雌で、脾臓重量及び対体重比の増加がみられ、脾臓における髓外造血亢進との関連性が示唆された。

副腎、卵巣及び肝臓にみられた重量の変化は、変化の程度、剖検時期及び病理組織所見等から偶発的な変化であると考えられた。

肉眼的病理検査；途中死亡動物、切迫屠殺動物、26、52 及び 104 週の計画屠殺動物について剖検を行った。対照群と比べて、統計学的に有意差の認められた所見を別表 1 に示す。

死亡・切迫屠殺動物において、50 ppm 群雌で胸腺の萎縮が多くみられた。しかし、病理組織学的検査においては、対照群と比較して程度や発生数に差は認められなかった。

その他の所見は、いずれも通常観察される所見で、被験物質投与とは関連しないと考えられた。

病理組織学的検査；対照群及び高用量群の全計画屠殺動物、死亡切迫屠殺動物、並びに肉眼的異常のみられた低用量群及び中用量群の動物については、以下の組織について病理組織標本を作製し、鏡検した。(病理組織標本は組織科学研究所で作製した。)

皮膚、乳腺(雌)、リンパ節(腸間膜、下顎)、下顎腺、胸骨、大腿骨、骨髓(胸骨及び大腿骨)、胸腺、気管、肺(気管支を含む)、心臓、甲状腺、上皮小体、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精囊、凝固腺、前立腺、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、陰、脳、眼球(視神経を含む)、下垂体、脊髄、ハーダー腺、鼻腔、骨格筋、坐骨神経、大動脈、咽頭及び喉頭(第 104 週のみ)、肉眼的異常部位

眼球、ハーダー腺及び脾臓については 50 ppm 群で変化が認められたため、3 及び 10 ppm 群についても行った。

[非腫瘍性病変]

認められた主要な非腫瘍性病変を別表 2 に示す。

脾臓の髓外造血亢進が第 26、52 及び 104 週の全ての計画屠殺動物で観察され、被験物質

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

投与の影響と考えられた。被験物質投与群で増加を示した雌の網膜萎縮と雄のハーダー腺のリンパ球浸潤は、投与群間に程度に差異はなく、第 26 及び 52 週試験では発生数に差異が認められなかった。さらに、何れの所見も別の性では発生数の増加は認められておらず、偶発的变化と考えられ、毒性学的に意義の低い変化と考えられた。その他の観察された所見はいずれも自然発生的な病変と考えられた。

〔腫瘍性病変〕

認められた全ての腫瘍性病変を別表 3 に示す。

被験物質投与に関連した特異的腫瘍の発現は認められず、腫瘍発現数の上昇及び早期化も認められなかった。

以上の結果から、本剤の Crj: WI (Glx/BRL/Han) IGS 系ラットに対する 104 週間飼料混入投与による 1 年間反復投与毒性/発がん性併合試験における影響として、50 ppm 群の雄雌で網赤血球比率の増加、10 ppm 以上の群の雄で総ビリルビン濃度及び無機リン濃度の増加及び血糖値の低下が認められた。従って、無毒性量は雄で 3 ppm (0.15 mg/kg/day)、雌で 10 ppm (0.64 mg/kg/day) であった。なお、コリンエステラーゼ活性阻害を指標とすると、無毒性量は雄で 3 ppm 以下 (0.15 mg/kg/day 以下)、雌では 3 ppm (0.19 mg/kg/day) であると判断される。また、本剤の催腫瘍性はないものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネシヨウ株式会社にある。

〔別表 1〕肉眼的病理所見

検査時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	3	10	50	0	3	10	50
死亡・ 切迫屠殺	臓器	所見/検査動物数	16	15	14	18	14	11	5	18
	脾臓	脾腫	3	3	2		6	2	2	2↓
	胸腺	萎縮	9	10	11	8	2	1	3	11↑
	肺	結節	4	2		0↓	3		1	3
		白色斑点	3	2	2	1		1		5↑
	胃(腺胃)	黒色斑点	4	1	3	0↓	3			1
	肝臓	赤色斑点	4	2		2		3	1	5↑
	精囊	萎縮	11	7	6	5↓	-	-	-	-
	皮下組織	塊	4	2	2	0↓	6	4	1	8
全身	瘦削	3	7	6	5	4	1	4	4	
第 104 週	臓器	所見/検査動物数	34	35	36	34	36	40	45	33
	胸腺	萎縮	8	5	6	1↓	1			1
	肺	白色斑点	14	20	11	13	27	24	24↓	16↓
	脾臓	結節	7	9	9	15↑	5	6	4	3
	肝臓	赤色斑点	18	14	19	18	5	13↑	9	12↑
	総胆管	内腔拡張	15	16	22	18	9	20↑	20	18↑
	子宮	結節	-	-	-	-	4	3	0↓	3

↑↓ : p<0.05、↑↓ : p<0.01 (Fisher の直接検定法)

〔別表 2〕非腫瘍性病変

検査時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	3	10	50	0	3	10	50
第 26 週	臓器	所見/検査動物数	10	10	10	20	10	10	10	20
	脾臓	髓外造血亢進				5		1		10↑
第 52 週	臓器	所見/検査動物数	10	10	10	18	10	9	10	19
	脾臓	髓外造血亢進		1	1	5		1	1	9↑
	眼球	角膜軟質沈着					4	1	1	0↓
	腎臓	硝子門柱	5	-	-	1↓	1	-	-	2
死亡・ 切迫屠殺	臓器	所見/検査動物数	16	15	14	18	14	11	5	18
	脾臓	髓外造血亢進	5	6	4	4	9	4	2	9
	胸腺	胸腺上皮過形成	2	8↑	1	2	3	5	1	9
	腺胃	潰瘍	4	5	5	0↓	3	2		5
	前胃	潰瘍		1	4↑	1	4		1	4
	腺外分泌部	腺房細胞空胞化	4			0↓	1			
		肝臓	肝細胞脂肪化	9	8	5	4↓	6	6	0
		髓外造血	4	3		0↓	5	2	1	5
		変異肝細胞巣	3	9↑	3	5	3	2	3	5
	腎臓	慢性腎症	11	15↑	13	14	2	1	0	6
	乳腺	腺房過形成	-	-	-	-	13	10	5	11↓
	前立腺	萎縮	8	6	0↓	7	-	-	-	-
		管内細胞残屑	12	7	4↓	8	-	-	-	-
	脳	延髄軸索膨化	5	3	0↓	2	5	1	1	4
ハダゲ腺	過形成	2	7↑	4	2	1	1	2	1	
皮膚	毛嚢萎縮	5	3	0↓	3				1	
第 104 週	臓器	所見/検査動物数	34	35	36	34	36	40	45	33
	胸腺	胸腺上皮過形成	6	-	-	2	23	-	-	13↓
	下垂体	嚢胞	8	-	-	2↓	6	-	-	2
	臓器	所見/検査動物数	34	35	36	34	36	40	45	33
	眼	網膜萎縮	7	8	7	8	7	17↑	20↑	13
	脾臓	髓外造血亢進	22	21	26	29↑	14	20	26	25↑
ハダゲ腺	リンパ球浸潤	5	6	11	12↑	14	12	12	12	
	過形成	13	17	15	4↓	3	5	7	8	

↑↓ : p<0.05、↑↓ : p<0.01 (Fisher の直接検定法)、発現数 0 は省略、- : 検査実施例なし

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

(別表3) 腫瘍性病変発現数

検査時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	3	10	50	0	3	10	50
第 52 週	臓器	所見/検査動物数	10	0	0	18	10	0	0	19
	腺外分泌部	腺腫 (B)		-	-	1		-	-	
	子宮	子宮内膜間質ポリープ (B)		-	-			-	-	2
	下垂体	前葉腺腫 (B)	1	-	-	1		-	-	1
	脳	顆粒細胞腫 (B)		-	-	1		-	-	
第 104 週	臓器	所見/検査動物数	34	0	0	34	36	0	0	33
	リンパ節	血管腫 (B)		-	-		1	-	-	
		血管肉腫 (M)		-	-	1	1	-	-	
	胸腺	胸腺腫 (B)	1	-	-	2	3	-	-	5
		悪性リンパ腫 (M)		-	-		2	-	-	
		悪性胸腺腫 (M)	1	-	-			-	-	1
	肺	肺胞/細気管支上皮腺腫 (B)	3	-	-			-	-	1
	舌	扁平上皮乳頭腫 (B)		-	-	1		-	-	
	空腸	平滑骨格筋腫 (M)		-	-	1		-	-	
	直腸	線維肉腫 (M)		-	-		1	-	-	
		胆管細胞腺腫 (B)		-	-		1	-	-	
		肝細胞腺腫 (B)		-	-			-	-	1
	肝臓	肝細胞癌 (M)	1	-	-			-	-	
		下顎腺	腺癌 (M)	1	-	-			-	-
		腎臓	移行上皮乳頭腫 (B)	1	-	-			-	-
	腎臓	腎細胞癌 (M)	1	-	-			-	-	
		乳腺	線維腺腫 (B)	-	-	-	-	12	-	-
	腺癌 (M)		-	-	-	-	2	-	-	2
	精巣	間細胞腫 (B)	1	-	-	1	-	-	-	-
	前立腺	腺腫 (B)		-	-	1	-	-	-	-
	卵巣	顆粒膜-莢膜細胞腫 (B)	-	-	-	-		-	-	1
		悪性顆粒膜-莢膜細胞腫 (M)	-	-	-	-		-	-	1
	子宮	子宮内膜間質ポリープ (B)	-	-	-	-	6	-	-	5
		腺癌 (M)	-	-	-	-		-	-	2
		平滑骨格筋腫 (M)	-	-	-	-	1	-	-	
	膣	間質ポリープ (B)	-	-	-	-	1	-	-	
	松果体	悪性顆粒細胞腫 (M)	-	-	-	-		-	-	1
	下垂体	前葉腺腫 (B)	11	-	-	12	20	-	-	14
		前葉腺癌 (M)		-	-		2	-	-	4
	甲状腺	C-細胞腺腫 (B)	1	-	-	2	3	-	-	1
		濾胞細胞腺腫 (B)	2	-	-	2	1	-	-	
		濾胞細胞癌 (M)	1	-	-		1	-	-	
	副腎	皮質腺腫 (B)	1	-	-			-	-	1
		褐色細胞腫 (B)	1	-	-	1		-	-	2
	膵島	腺腫 (B)	4	-	-	11	2	-	-	2
		癌 (M)		-	-	1		-	-	
	脳	顆粒細胞腫 (B)		-	-		1	-	-	
	皮膚	角化棘細胞腫 (B)	1	-	-	1		-	-	1
		扁平上皮乳頭腫 (B)		-	-	1		-	-	
		皮脂腺腫 (B)	1	-	-			-	-	
	皮下組織	石灰化上皮腫 (B)		-	-	1		-	-	
		線維腫 (B)		-	-	1		-	-	
		脂肪腫 (B)		-	-		1	-	-	
		線維肉腫 (M)	1	-	-	1		-	-	
		悪性線維性組織球腫 (M)	1	-	-			-	-	
	尾	扁平上皮乳頭腫 (B)		-	-	1		-	-	
	骨格筋	顆粒細胞腫 (B)		-	-	1		-	-	
	臓器	所見/検査動物数	34	35	36	34	36	40	45	33
	ハーダー腺	腺腫 (B)						1		
	脾臓	血管腫 (B)			1					
血管肉腫 (M)		1			1					

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

(別表3) 腫瘍性病変発現数 (続き)

検査時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)	検査動物数	0	3	10	50	0	3	10	50
死亡・切迫 屠殺動物	臓器	所見	16	15	14	18	14	11	5	18
	心臓	悪性神経鞘腫 (M)				1				
	骨髄	組織球性肉腫 (M)	1							
	脾臓	血管腫 (B)	1							
		血管肉腫 (M)		1						
	リンパ節	悪性リンパ腫 (M)			1					
	胸腺	胸腺腫 (B)				1	3	1	1	
	腎	扁平上皮乳頭腫 (B)								1
		腺癌 (M)	1							
	膝外分泌部	血管腫 (B)		1						
	十二指腸	腺癌 (M)	1							
	結腸	悪性神経鞘腫 (M)				1				
		胆管細胞腺腫 (B)						1		
	肝臓	血管腫 (B)		1						
		悪性混合腫瘍 (M)	-	-	1	-	-	-	-	-
	唾液腺	腺癌 (M)						1		
	下顎腺	腺癌 (M)								
	歯肉	扁平上皮癌 (M)	-	-	-	-	1	-	-	-
	腹膜	悪性神経鞘腫 (M)		1	-					
		腎細胞腺腫 (B)				1				
	腎臓	腎芽細胞腫 (M)				1				
		悪性神経鞘腫 (M)		1						
		線維腺腫 (B)	-	-	-	-	1	2		2
	乳腺	腺癌 (M)	-	-	-	-		1		3
		間細胞腫 (B)		1						
	精巣	腺腫 (B)		1						
	子宮	子宮内膜間質ポリープ (B)	-	-	-	-	2	1	1	4
		腺癌 (M)	-	-	-	-	2			1
		未分化癌 (M)	-	-	-	-				1
		子宮内膜肉腫 (M)	-	-	-	-	1			
		悪性神経鞘腫 (M)	-	-	-	-	2	1	1	
	膈	悪性神経鞘腫 (M)	-	-	-	-	1			
	包皮腺	腺癌 (M)	1	-	-	-	-	-	-	-
	固有精嚢膜	中皮腫 (M)	-	1	-	-	-	-	-	-
	下垂体	前葉腺腫 (B)	9	8	6	12	9	8	3	8
		中間葉腺腫 (B)	1		1					1
		前葉腺癌 (M)		1		1	1	1		3
	甲状腺	C-細胞腺腫 (B)	1	1	1		1			1
		濾胞細胞腺腫 (B)	1	1		1				
		濾胞細胞癌 (M)	1		1	1				
副腎	皮質腺腫 (B)					2				
	褐色細胞腫 (B)						1			
膵島	腺腫 (B)	1	2		1			1		
	顆粒細胞腫 (B)		1		1					
脳	星状膠細胞腫 (M)		1				1			
	悪性顆粒細胞腫 (M)			1						
	神経線腫瘍 (B)	-	1	-	-	-	-	-	-	
眼	扁平上皮乳頭腫 (B)	-	-	-	1	-	-	-	-	
	腺腫 (B)	1								
ジンバル腺	癌 (M)	1	2	-	-	-	-	-	-	
	癌 (M)	1	2	-	-	-	-	-	-	
皮膚	石灰化上皮腫 (B)	1								
	扁平上皮乳頭腫 (B)	1			1				1	
皮下組織	毛嚢上皮腫 (B)	1	-							
	線維腫 (B)		-	1						
	線維肉腫 (M)		-	1						
	骨肉腫 (M)		-						1	
	横紋骨格筋腫 (M)		-			1				
	組織球性肉腫 (M)		-						1	
下顎骨	悪性歯源性腫瘍 (M)	-	1	-	-	-	-	-	-	
腰椎	脊索腫 (M)	-	-	1	-	-	-	-	-	

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

〔別表3〕腫瘍性病変発現数（続き）

検査時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)	所見/検査動物数	0	3	10	50	0	3	10	50
全動物	臓器		50	15	14	52	50	11	5	51
	心臓	悪性神経鞘腫 (M)				1				
	骨髄	組織球性肉腫 (M)	1							
	リンパ節	血管腫 (B)					1			
		血管肉腫 (M)				1	1			
		悪性リンパ腫 (M)			1					
	胸腺	胸腺腫 (B)	1			3	6	1	1	5
		悪性胸腺腫 (M)	1							1
		悪性リンパ腫 (M)					2			
	肺	肺胞/細気管支上皮腺腫 (B)	3							1
	舌	扁平上皮乳頭腫 (B)			-	1	-	-	-	
	前胃	扁平上皮乳頭腫 (B)							1	
	腺胃	腺癌 (M)	1							
	腺外分泌部	血管腫 (B)		1						
	十二指腸	腺癌 (M)	1							
	空腸	平滑骨格筋腫 (M)				1				
	結腸	悪性神経鞘腫 (M)				1				
	直腸	線維肉腫 (M)					1			
	肝臓	胆管細胞腺腫 (B)					1	1		
		肝細胞腺腫 (B)								1
		血管腫 (B)		1						
		肝細胞癌 (M)	1							
	腹膜	悪性神経鞘腫 (M)		1	-		-			
	唾液腺	悪性混合腫瘍 (M)	-	-	1	-	-	-	-	-
	下顎腺	腺癌 (M)	1					1		
	歯肉	扁平上皮癌 (M)	-	-	-	-	1	-	-	-
	腎臓	腎細胞腺腫 (B)				1				
		移行上皮乳頭腫 (B)	1							
		腎芽細胞腫 (M)				1				
		腎細胞癌 (M)	1							
		悪性神経鞘腫 (M)		1						
	乳腺	線維腺腫 (B)	-	-	-	-	13	2		6
		腺癌 (M)	-	-	-	-	2	1		5
	精巣	間細胞腫 (B)	1	1		1	-	-	-	-
	前立腺	腺腫 (B)				1	-	-	-	-
	精嚢	腺腫 (B)		1			-	-	-	-
	卵巣	顆粒膜-莢膜細胞腫 (B)	-	-	-	-				1
		悪性顆粒膜-莢膜細胞腫 (M)	-	-	-	-				1
	子宮	子宮内膜間質ポリープ (B)	-	-	-	-	8	1	1	9
		腺癌 (M)	-	-	-	-	2			3
未分化癌 (M)		-	-	-	-				1	
子宮内筋肉腫 (M)		-	-	-	-	1				
平滑骨格筋腫 (M)		-	-	-	-	1				
悪性神経鞘腫 (M)		-	-	-	-	2	1	1		
膣	間質ポリープ (B)	-	-	-	-	1				
	悪性神経鞘腫 (M)	-	-	-	-	1				
包皮腺	腺癌 (M)	1	-	-	-	-	-	-	-	
固有精嚢膜	中皮腫 (M)	-	1	-	-	-	-	-	-	
松果体	悪性顆粒細胞腫 (M)	-	-	-	-	-	-	-	1	
下垂体	前葉腺腫 (B)	20	8	6	24	29	7	3	22	
	中間葉腺腫 (B)	1		1					1	
	前葉腺癌 (M)		1		1	3	1		7	
甲状腺	C-細胞腺腫 (B)	2	1	1	2	4			2	
	濾胞細胞腺腫 (B)	3	1		3	1				
	濾胞細胞癌 (M)	2		1	1	1				

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はアグロ カネショウ株式会社にある。

〔別表 3〕 腫瘍性病変発現数 (続き)

検査時期	性別		雄				雌			
	投与量 (ppm)		0	3	10	50	0	3	10	50
全動物	臓器	所見/検査動物数	50	15	14	52	50	11	5	51
	副腎	皮質腺腫 (B)	1				2			1
		褐色細胞腫 (B)	1			1		1		2
	膵島	腺腫 (B)	5	2		12	2		1	2
		癌 (M)				1				
	脳	顆粒細胞腫 (B)		1		1	1			
		星状膠細胞腫 (M)		1				1		
		悪性顆粒細胞腫 (M)			1					
	眼瞼	神経線腫瘍 (B)	-	1	-	-	-	-	-	-
	耳	扁平上皮乳頭腫 (B)	-	-	-	1	-	-	-	-
	ジンバル腺	腺腫 (B)	1		-	-	-	-	-	-
		癌 (M)	1	2	-	-	-	-	-	-
	皮膚	石灰化上皮腫 (B)	1							
		扁平上皮乳頭腫 (B)	1			1				1
		皮脂腺腫 (B)	1							
		扁平上皮乳頭腫 (B)	1			1				
	皮下組織	石灰化上皮腫 (B)		-		1			-	
		毛嚢上皮腫 (B)	1	-					-	
		線維腫 (B)		-	1	1			-	
		脂肪腫 (B)		-			1		-	
		線維肉腫 (M)	1	-	1	1			-	
		組織球性肉腫 (M)		-					-	1
		悪性線維性組織球腫 (M)	1	-					-	
		骨肉腫 (M)		-					-	1
	尾	横紋骨格筋腫 (M)		-			1		-	
		扁平上皮乳頭腫 (B)		-		1	-	-	-	-
	骨格筋	顆粒細胞腫 (B)				1				
	下顎骨	悪性歯原性腫瘍 (M)	-	1	-	-	-	-	-	-
	腰椎	脊索腫 (M)	-	-	1		-	-	-	-
	臓器	所見/検査動物数	50	50	50	52	50	51	50	51
脾臓	血管腫 (B)	1		1						
	血管肉腫 (M)	1	1		1					
ハーダー腺	腺腫 (B)						1			
合計	検査動物数		50	15	14	50	50	10	5	50
	腫瘍数	良性	46	17	10	57	70	11	7	54
		悪性	14	9	6	10	19	5	1	21
	腫瘍総数		60	26	16	67	89	16	8	75
	担腫瘍動物数	良性	32	10	10	39	42	8	5	35
		悪性	13	9	5	9	18	5	1	17
担腫瘍動物数		36	19	11	42	45	11	5	44	

M: 悪性、B: 良性、↑↓: p<0.05、↑↑: p<0.01 (Fisherの直接検定法)、発現数0は省略、-: 検査実施例なし
イタリックは申請者の集計値 (但し、脾臓及びハーダー腺の検査数はいずれも50匹)