

農薬抄録

一般名：ペンフルフェン

「殺菌剤」

(作成年月日) 平成 23 年4 月12 日

(改訂年月日) 平成 23 年9 月26 日

(作成会社名) バイエルクロップサイエンス株式会社



目次

I. 開発の経緯	1
II. 物理的・化学的性状	2
III. 生物活性	16
IV. 適用及び使用上の注意	17
V. 残留性及び環境中予測濃度算定関係	19
VI. 有用動植物等に及ぼす影響	28
VII. 使用時安全上の注意、解毒法等	40
VIII. 毒性	毒-1
A. 原体を用いた試験成績	
1. 急性毒性	毒-8
2. 皮膚および眼に対する刺激性	毒-12
3. 皮膚感作性	毒-15
4. 急性神経毒性	毒-18
5. 反復経口投与毒性	毒-25
6. 反復経口投与神経毒性	毒-50
7. 慢性毒性および発がん性	毒-61
8. 繁殖毒性および催奇形性	毒-130
9. 変異原性	毒-155
10. 生体機能への影響	毒-167
11. その他試験	毒-171
B. 原体混在物および代謝物を用いた試験成績	毒-191
C. 製剤を用いた試験成績	毒-211
IX. 動植物及び土壌等における代謝分解	代-1
1. 動物体内運命試験	代-25
2. 植物体内運命試験	代-89
3. 土壌中運命試験	代-143
4. 水中運命試験	代-176
5. 土壌吸着性試験	代-188
まとめと概要	代-194
[附] ペンフルフェンの開発年表	附-1

I. 開発の経緯

ペンフルフェン(penflufen)は、ドイツ バイエルクロップサイエンス社 (Bayer CropScience AG) により開発中の、アルキルアミド(alkylamide)系新規殺菌有効成分である。本化合物は、初期のスクリーニング試験において、担子菌類に属するRhizoctonia、Tilletia、Ustilago及び子のう菌類に属するHelminthosporium属菌等に対して高い殺菌活性を有することが見出された。

日本においては、BCF-081粒剤(ペンフルフェン2.0%)、及びBCF-082フロアブル(ペンフルフェン22.7%)について、平成20年から社団法人日本植物防疫協会における公的委託試験を開始した。その結果、BCF-081粒剤では育苗箱施用(播種前、播種時覆土前、移植当日)による、稲紋枯病に対する実用性が、BCF-082フロアブルでは種いも浸漬または種いも散布による、ばれいしょ黒あざ病に対する実用性が確認されている。

海外では、ばれいしょの種いも塗付処理、及び植溝への植付時散布処理、だいず、穀類、なたね、棉等の種子処理用殺菌剤としての開発をめざし、2009年12月にはEU、2010年3月に経済協力開発機構(OECD)のジョイントレビューにおける評価のため、米国、カナダ及びオーストラリアによりデータが提出された。これらの国においては、単剤(240フロアブル、050フロアブル)の他、プロチオコナゾール、トリフロキシストロビンなどの他の殺菌剤との混合剤の開発も進められ、幅広い作物病害に対する登録を予定している。その他、中南米諸国などの諸外国においても登録申請に向けて準備中である。

2011年1月、英国においてACP (Advisory Committee on Pesticides) のペンフルフェンに対する最初の毒性評価が実施された。その審議において、雌ラットでみられた肝腫瘍の頻度の増加(資料No.原体-17)について、ヒトに対する関連性が懸念された。そのため雌ラットに認められた肝腫瘍が、ヒトに対して関連性がないことを示す試験成績(資料No.原体-29, 30)を提出し、同年7月にACPによりこの試験成績結果が了承された。この了承に基づき、2011年8月、英国においてペンフルフェン製剤の最初の登録がなされた(050フロアブル、ばれいしょ種いも処理)。また、米国での登録取得は2012年第1四半期の予定となっている。

II. 物理的・化学的性状

1. 有効成分の名称及び化学構造

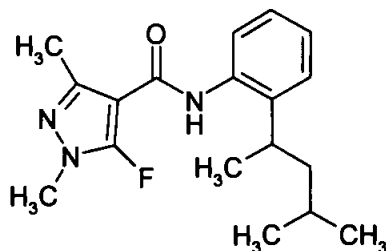
1) 一般名 ペンフルフェン (penflufen) (ISO申請中)

2) 別名 商品名：
試験名：BYF14182 ①BCF-081 ②BCF-082

3) 化学名 IUPAC：
2'-[(RS)-1,3-ジメチルブチル]-5-フルオロ-1,3-ジメチルピラゾール-4-カルボキサリド
2'-[(RS)-1,3-dimethylbutyl]-5-fluoro-1,3-dimethylpyrazole-4-carboxanilide

CAS：
N-[2-(1,3-ジメチルブチル)フェニル]-5-フルオロ-1,3-ジメチル-1H-ピラゾール-4-カルボキサミド
N-[2-(1,3-dimethylbutyl)phenyl]-5-fluoro-1,3-dimethyl-1H-pyrazole-4-carboxamide

4) 構造式



5) 分子式 $C_{18}H_{24}FN_3O$

6) 分子量 317.41

7) CAS No. 494793-67-8

2. 有効成分の物理的・化学的性状

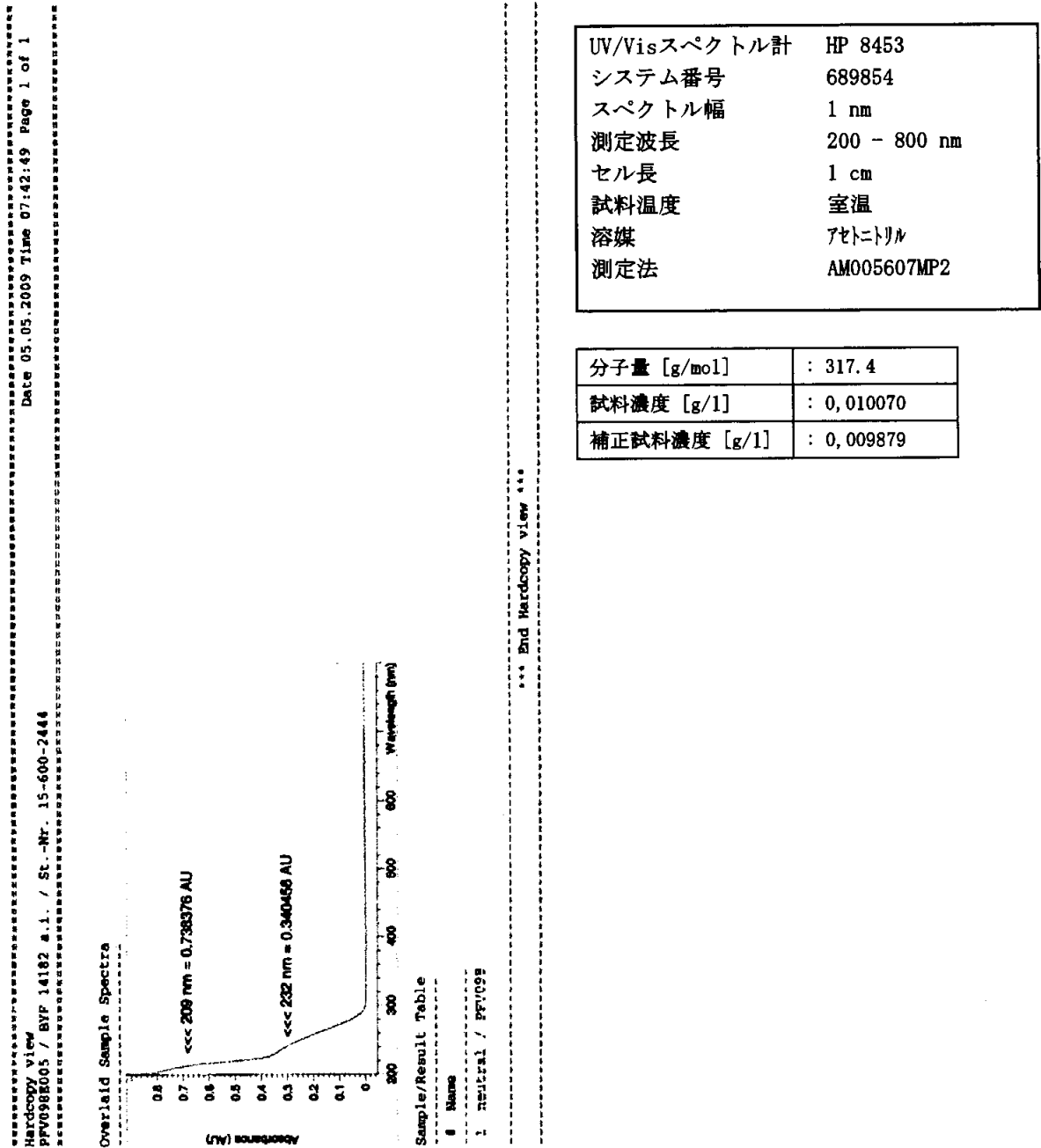
1) 外観・臭気 類白色粉末、特徴の無い弱い臭気
[Bayer CropScience AG (ドイツ)、2007年、GLP]

2) 密度 1.21 g/cm^3 (20 °C)
OECDガイドライン No.109 空気比較比重計法
[Bayer CropScience AG (ドイツ)、2008年、GLP]

- 3) 融点 111 °C
OECDガイドライン No.102 示差走査熱量測定法
[Siemens AG (ドイツ)、2007年、GLP]
- 4) 沸点 大気圧下で沸点を有せず、約320°Cから分解
OECDガイドライン No.103 示差走査熱量測定法
[Siemens AG (ドイツ)、2007年、GLP]
- 5) 蒸気圧 4.1×10^{-7} Pa (20 °C) , 1.2×10^{-6} Pa (25 °C) , 1.7×10^{-4} Pa (50 °C)
OECDテストガイドライン No.104 蒸気圧天秤法
[Siemens AG (ドイツ)、2007年、GLP]
- 6) 溶解度 (水及び有機溶媒)
- 水 (20°C) 12.4 mg/L (蒸留水)
11.0 mg/L (pH 4緩衝液)、10.9 mg/L (pH 7緩衝液)、11.2 mg/L (pH 9緩衝液)
OECDテストガイドライン No.105 フラスコ法
[Bayer CropScience AG (ドイツ)、2009年、GLP]
- 有機溶媒 (20°C)
- | | |
|------------|----------|
| n-ヘプタン | 1.6 g/L |
| トルエン | 62 g/L |
| ジクロロメタン | >250 g/L |
| メタノール | 126 g/L |
| アセトン | 139 g/L |
| 酢酸エチル | 96 g/L |
| ジメチルスルホキシド | 162 g/L |
- OECDテストガイドライン No.105 フラスコ法
[Bayer CropScience AG (ドイツ)、2009年、GLP]
- 7) 解離定数 pKa 1-12の範囲のpKaを認めない。
OECDテストガイドライン No.112 分光光度法
[Bayer CropScience AG (ドイツ)、2009年、GLP]
- 8) 分配係数 (n-オクタノール/水) $\log P_{ow} = 3.3$ (25°C, pH 4.0, pH7.0, pH9.0)
OECDテストガイドライン No.117 HPLC法
[Bayer CropScience AG (ドイツ)、2009年、GLP]
- 9) 生物濃縮性 省略理由書

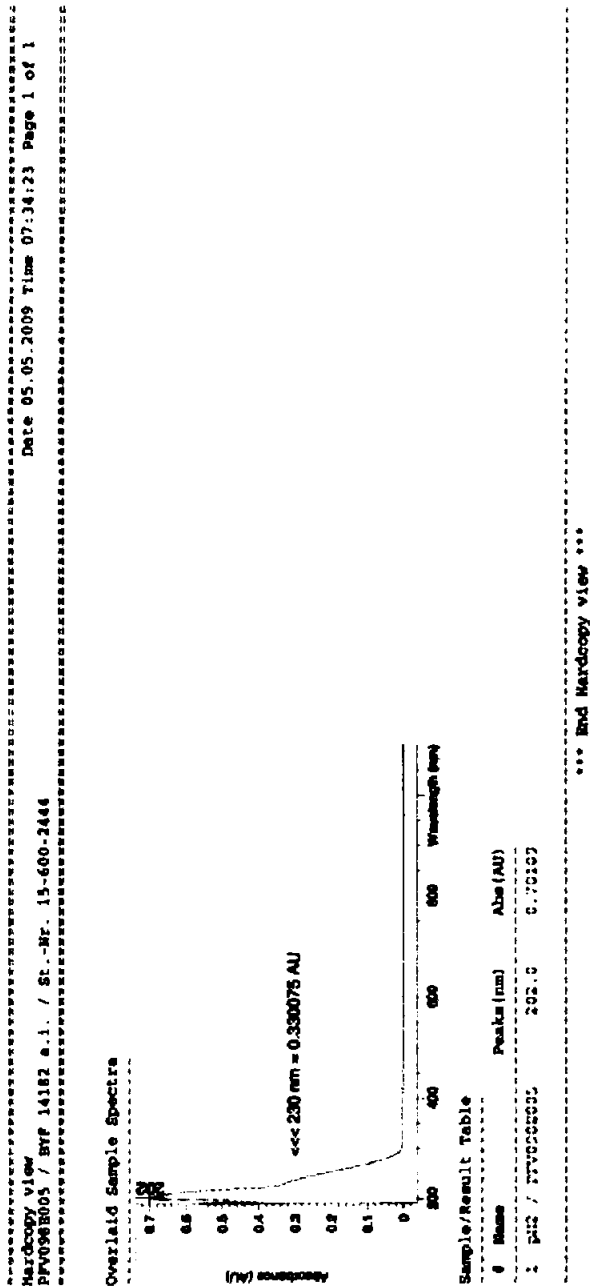
- 1 0) 土壌吸着性 $K_F^{ads}_{oc} = 209.6-409.5$ (20°C、非火山灰5土壌)
 $K_F^{ads} = 2.705-6.099$ (20°C、非火山灰5土壌)
OECDテストガイドライン No.106
[Bayer CropScience AG (ドイツ)、2006年、GLP]
- $K_F^{ads}_{oc} = 334$ mL/g (25°C、火山灰黒ボク土)
 $K_F^{ads} = 15.1$ mL/g (25°C、火山灰黒ボク土)
12農産第8147号 土壌吸着性に関する試験
OECDテストガイドライン No.106
[(株)日曹分析センター、2010年、GLP]
- 1 1) 加水分解性 安定 (pH 4、7及び9、50°C、7日間)
OECDテストガイドライン No.111
[Bayer CropScience AG (ドイツ)、2008年、GLP]
- 1 2) 水中光分解性
緩衝液 (pH 7) $t_{1/2} = 17.3$ 日 (25°C、キノンランプ° 1085-1090W/m²(300-800nm))
163.6日 (太陽光換算(東京、5月))
12農産第8147号 水中光分解試験
[Bayer CropScience AG (ドイツ)、2009年、GLP]
- 自然水 $t_{1/2} = 3.50-4.46$ 日 (25°C、キノンランプ° 1064-1078W/m²(300-800nm))
32.7-41.4日 (太陽光換算(東京、5月))
12農産第8147号 水中光分解試験
[Bayer CropScience AG (ドイツ)、2009年、GLP]
- 1 3) 安定性
熱安定性 320°C以上で分解
OECDテストガイドライン No.113 示差走査熱量測定法
[Siemens AG (ドイツ)、2007年、GLP]
- 1 4) UV、IR、MS、¹H-NMR、¹³C-NMR、¹⁹F-NMRスペクトル 図1-8
[Bayer CropScience AG (ドイツ)、2009年、GLP]

図1 UVスペクトル1



第一吸収波長 [nm]	: 209 (肩)	第二吸収波長 [nm]	: 232 (肩)
吸光度[AU]	: 0,73838	吸光度[AU]	: 0,34046
単位体積あたり吸収率 [1000cm ² /g]	: 74,742	単位体積あたり吸収率 [1000cm ² /g]	: 34,463
モル吸光係数 [1000cm ² /mol]	: 23723,86	モル吸光係数 [1000cm ² /mol]	: 10938,90

図2 UVスペクトル2

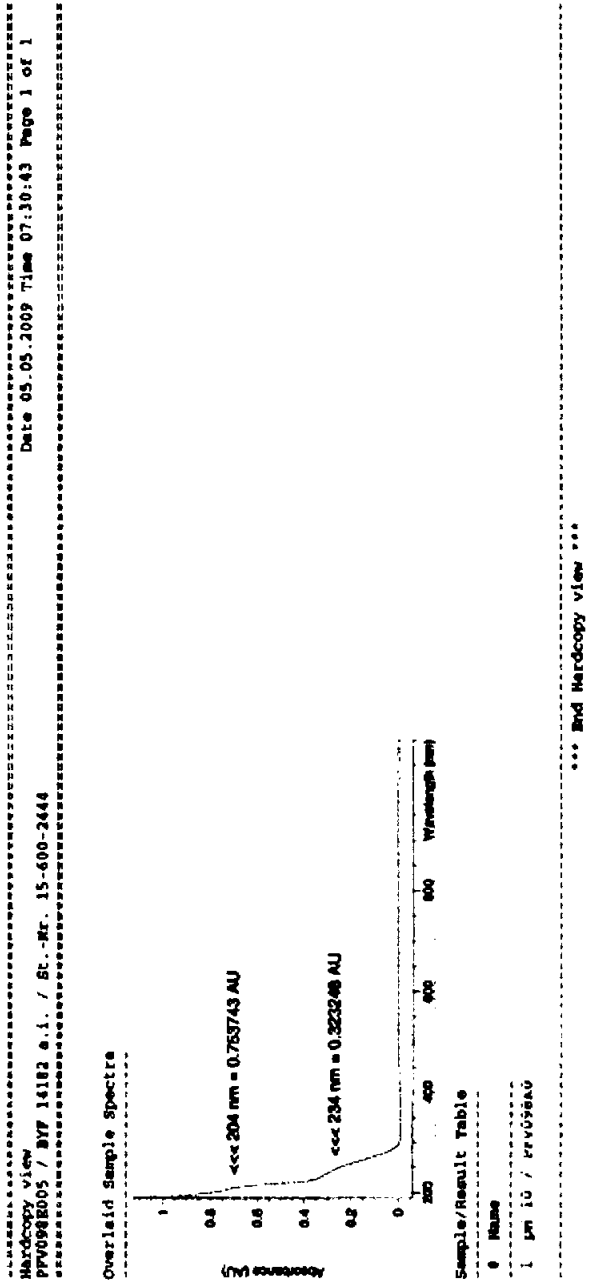


UV/Visスペクトル計	HP 8453
システム番号	689854
スペクトル幅	1 nm
測定波長	200 - 800 nm
セル長	1 cm
試料温度	室温
溶媒	アセトニトリル/pH2緩衝液
測定法	AM005607MP2

分子量 [g/mol]	: 317.4
試料濃度 [g/l]	: 0,0090630
補正試料濃度 [g/l]	: 0,0088908

第一吸収波長 [nm]	: 202	第二吸収波長 [nm]	: 230 (肩)
吸光度 [AU]	: 0,70109	吸光度 [AU]	: 0,33008
単位体積あたり吸収率 [1000cm ² /g]	: 78,856	単位体積あたり吸収率 [1000cm ² /g]	: 37,126
モル吸光係数 [1000cm ² /mol]	: 25029,68	モル吸光係数 [1000cm ² /mol]	: 11784,16

図3 UVスペクトル3

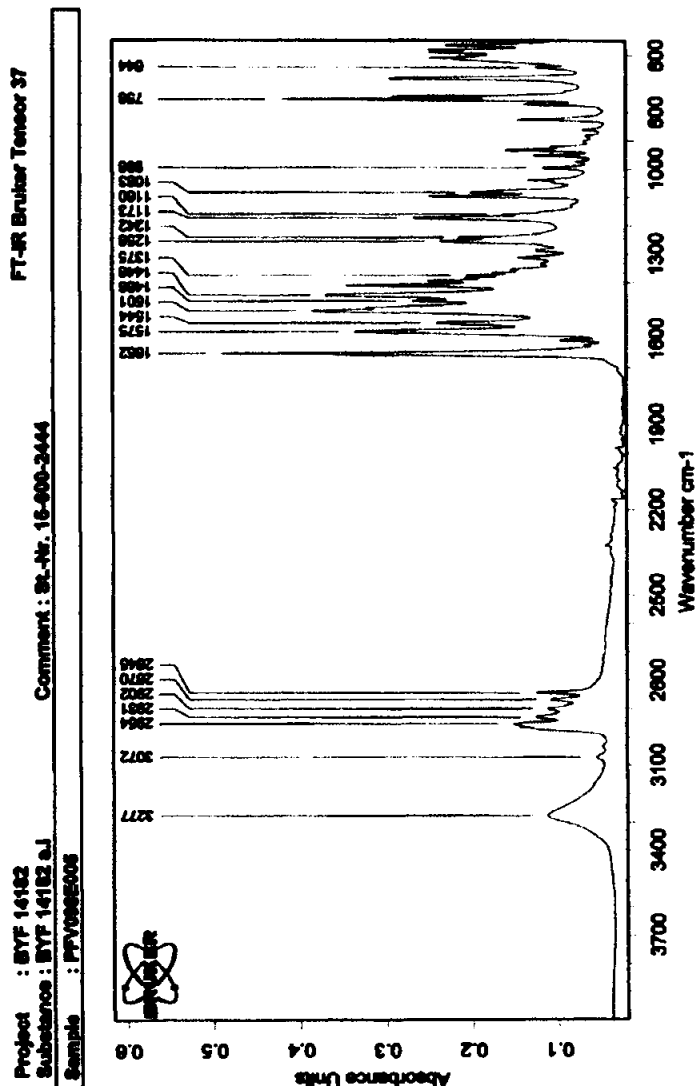


UV/Visスペクトル計	HP 8453
システム番号	689854
スペクトル幅	1 nm
測定波長	200 - 800 nm
セル長	1 cm
試料温度	室温
溶媒	アセトニトリル/pH10緩衝液
測定法	AM005607MP2

分子量 [g/mol]	: 317.4
試料濃度 [g/l]	: 0,0105990
補正試料濃度 [g/l]	: 0,0103976

第一吸収波長 [nm]	: 204 (肩)	第二吸収波長 [nm]	: 234 (肩)
吸光度 [AU]	: 0,75374	吸光度 [AU]	: 0,32325
単位体積あたり吸収率 [1000cm ² /g]	: 72,492	単位体積あたり吸収率 [1000cm ² /g]	: 31,089
モル吸光係数 [1000cm ² /mol]	: 23009,69	モル吸光係数 [1000cm ² /mol]	: 9867,96

図4 IRスペクトル



FT-IR Bruker Tensor 37

Comment: St. Nr. 16-900-2444

Project : BYF 14182

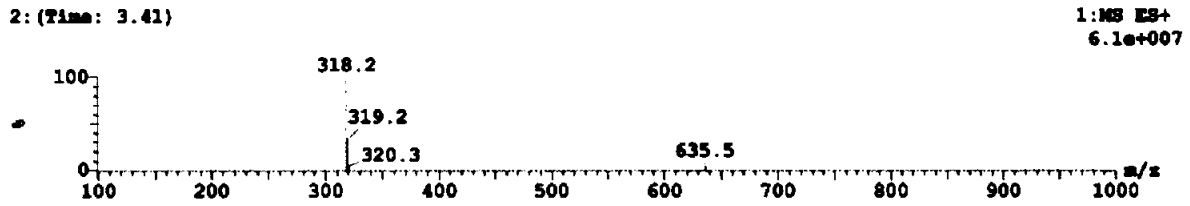
Substance : BYF 14182 aJ

Sample : PTV005006

FT-IR-スペクトル計	Bruker Tensor 37
Diamond ATR Unit	Fa. Specac
測定波数幅	550 - 4000 cm^{-1}
分解能	2 cm^{-1}
スキャン数	64
試料調製	被験物質固体を 前処理無しで、 ATRユニットにて 測定。
測定法	STDIRA01

波長	帰属
3277	NH
3072	CH
2954	CH ₃
2931	CH ₂
2902	CH
2870	CH
2845	CH
1652	C=O
1575	CO-NH
1544	C-NH
1501	Ring
1466	CH ₂
1446	CH ₃
1375	CH ₃
1256	C-NH
1242	CH
1173	CF
1160	CH
1083	CH
996	CH
756	CH
644	Ring

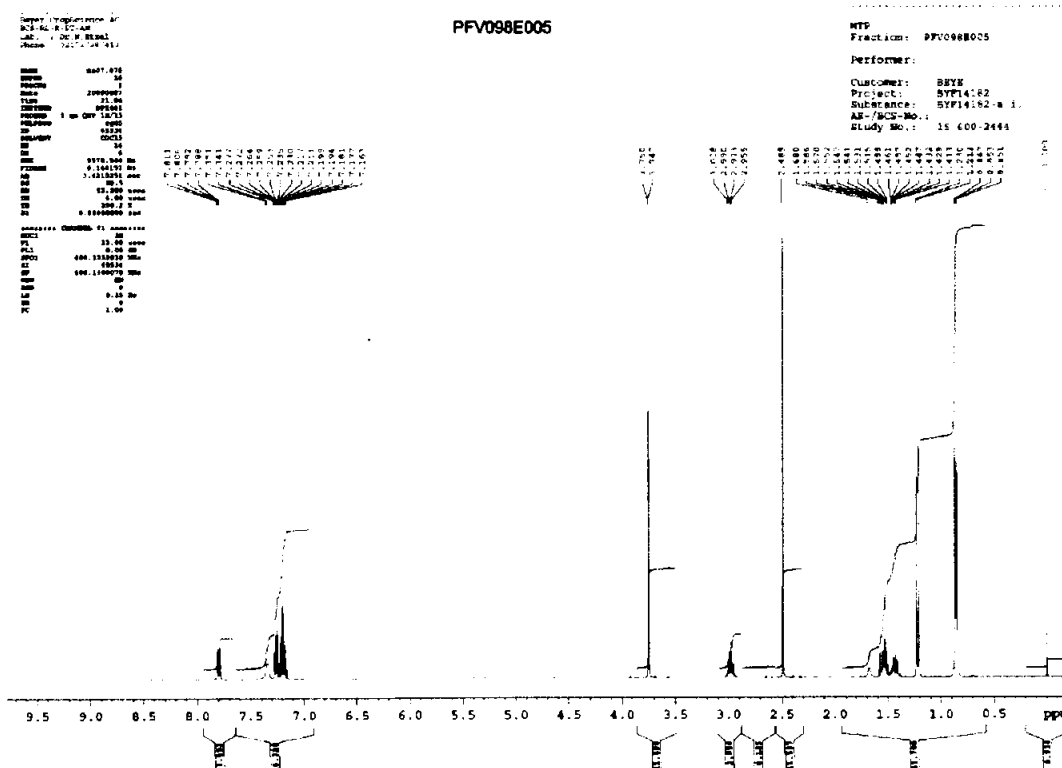
図5 LC-MSスペクトル



機器: Waters Acquity UPLCシステム: PDA検出器、Sample Manager (ソフトウェア)、Waters SQD 検出器、ESI Z-スプレーイオン源
カラム: Agilent Zorbax Eclipse+, 1.8 μ m, 長さ100mm, 内径: 2.1mm
カラム温度: 60 $^{\circ}$ C
溶離液: 0.085% ギ酸 (p. a. グレード) 含有水 (純水)
 0.1% ギ酸 (p. a. グレード) 含有アセトニトリル (p. a. グレード)
流速: 0.6 ml/分; MS部へポストカラムスプリット無し
グラジエント: 0-4.5分: アセトニトリル10%から95%
 4.5-7.0分: アセトニトリル95%
 7.0-7.1分: アセトニトリル10%
 7.1-8.0分: アセトニトリル10% (平衡化)
試料調製: 約1-2 mgの被験物質試料を0.5 mlのアセトニトリル (p. a. グレード) に溶解し、アセトニトリルで約1 mlに希釈。
注入量: 0.5 μ l
検出波長: 210-400 nm
キャピラリー電圧: 3kV
マスレンジ: 100-1000 Da
スキャン速度: 5スキャン/秒
測定法: STDMSC01

m/z値	帰属
318.2	[M+H] ⁺
635.5	[2M+H] ⁺

図6 ¹H-NMRスペクトル



NMRスペクトル計 Bruker Avance 400 パルス幅 45°, 取り込み時間 3.42秒
 操作周波数 400.13MHz 緩和時間0.5秒
 溶媒 CDCl₃ ウィンドウ 指数関数型
 標準 TMS (LB ラインローディング = 0.15)
 試料濃度 25 mg / ml スキャン数 16,
 測定管径 5 mm 測定法 AM 003706MP2
 試料温度 約25℃
 測定法 パルスフーリエ変換
 スペクトル幅 9578.5 Hz
 分解能 0.15 Hz/pt

H/C	δ H/ppm	多重度	H参照番号
1a 1b	0.86	D	6
2	1.53	M	1
3a 3b	1.43 1.55	M	2
4	2.98	M	1
5	1.22	D	3
6	-	-	-
7	7.26	M	1
8	7.19	M	1
9	7.21	M	1
10	7.80	M	1
11	-	-	-
12	7.35	S, br.	1
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	3.75	D	3
17	-	-	-
18	2.49	S	3

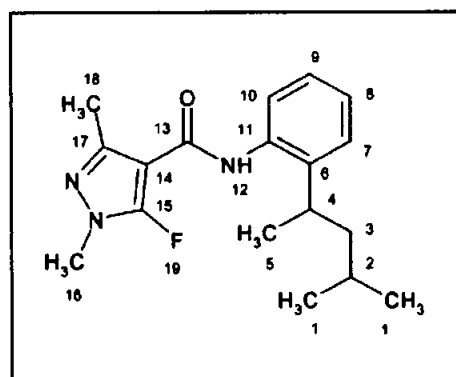
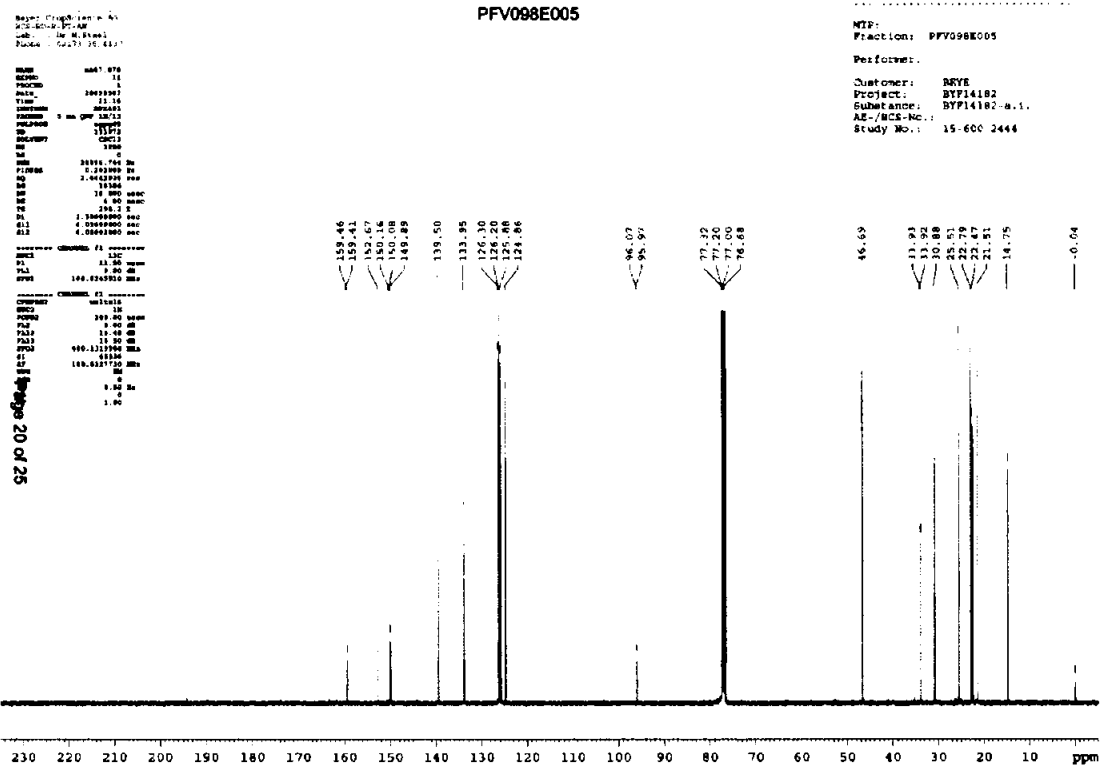


図7 ¹³C-NMRスペクトル



NMRスペクトル計	Bruker Avance 400	パルス幅 45°, 取り込み時間 2.46秒
操作周波数	100.61 MHz	緩和時間 7.5秒
溶媒	CDCl ₃ (77.0 ppm)	スキャン数 3200
試料濃度	25 mg / ml	ウィンドウ 指数関数型
測定管径	5 mm	(LB ラインプロテイング = 0.4)
試料温度	約25°C	測定法 AM 003706MP2
測定法	パルスフーリエ変換	
スペクトル幅	26595.7 Hz	
分解能	0.20 Hz/pt	

H/C	δ C/ppm	多重度	C参照番号
1a 1b	22.5 22.8	Q	1 1
2	25.5	D	1
3a 3b	46.7	T	1
4	30.9	D	1
5	21.5	Q	1
6	139.5	S	1
7	126.3	D	1
8	125.9	D	1
9	126.2	D	1
10	124.9	D	1
11	134.0	S	1
12	-	-	-
13	159.4	D	1
14	96.0	D	1
15	151.3	D	1
16	33.9	Q, D	1
17	150.1	D	1
18	14.8	Q	1

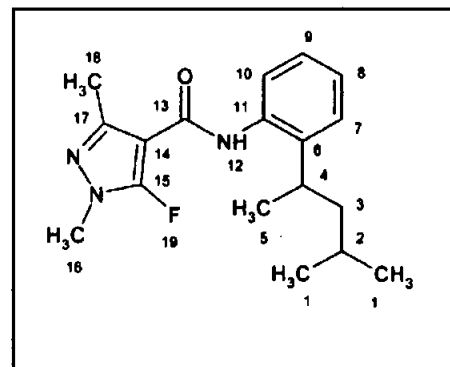
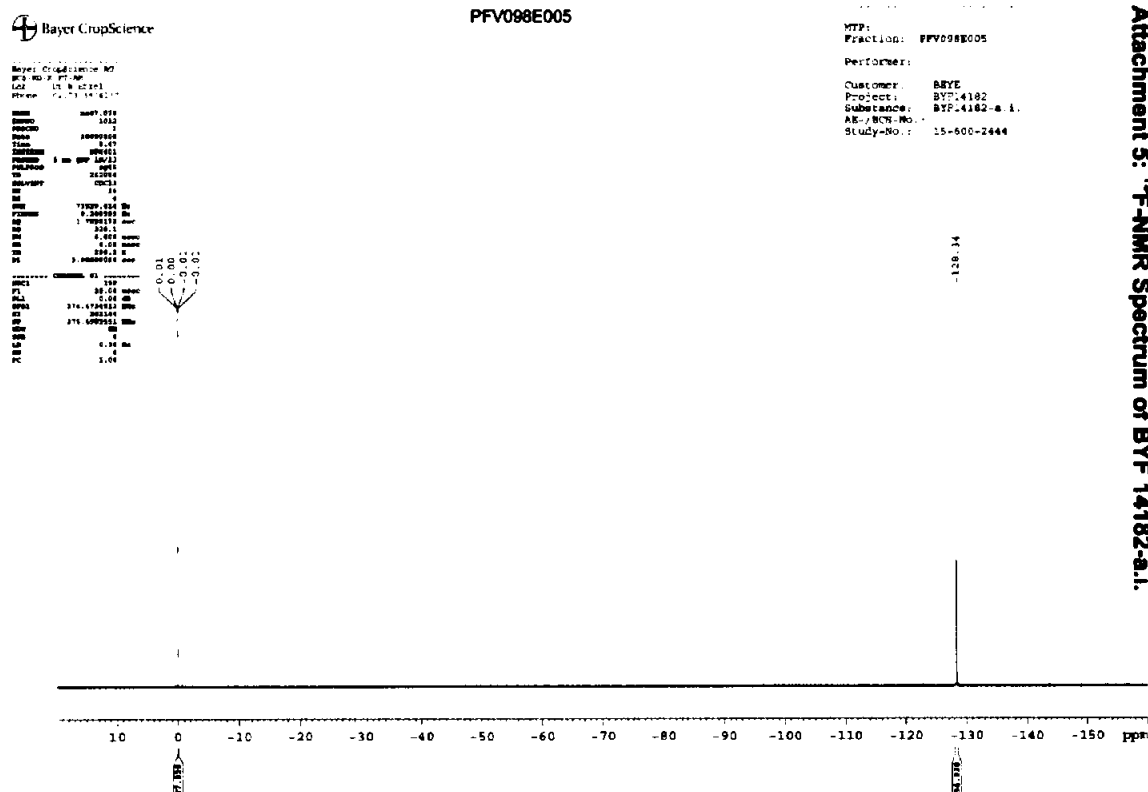
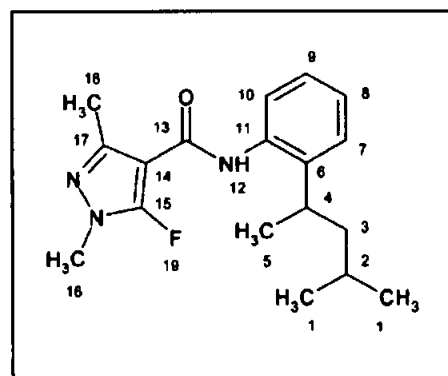


図8 ¹⁹F-NMRスペクトル



Attachment 5: ¹⁹F-NMR Spectrum of BYF 14182-a.I.

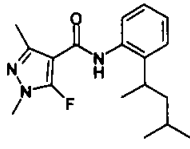
NMRスペクトル計 Bruker Avance 400
 操作周波数 376.499 MHz
 溶媒 CDCl₃
 標準 CCl₃F
 試料濃度 25 mg / ml
 測定管径 5 mm
 試料温度 約25°C
 測定法 パルスフーリエ変換
 スペクトル幅 73529.4 Hz
 分解能 0.28 Hz/pt
 パルス幅 45°
 取り込み時間 1.78秒
 緩和時間 3.0秒
 スキャン数 16
 ウィンドウ 指数関数型 (LB ラインブロードニング = 0.30)
 測定法 AM 003706MP2



F	δ F/ppm	多重度
19	-128.3	S

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

3. 原体の成分組成

区分	名称		構造式	分子式	分子量	原体中の含有量 (%)	
	一般名、略称、コード番号等	化学名				規格値	通常値またはレンジ
有効成分	ペンフルフェン BYF14182	2'-[(RS)-1,3-ジメチルピラゾール-5-フルオロ-1,3-ジメチルピラゾール-4-カルボキシニル]		C ₁₈ H ₂₄ FN ₃ O	317.41	95.0%以上	96.5-99.6%
原体混在物							

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

区分	名称		構造式	分子式	分子量	原体中の含有量 (%)	
	一般名、略称、 コード番号等	化学名				規格値	通常値 または レンジ
原体混在物							

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

4. 製剤の組成

2) 22.7%フロアブル

ペンフルフェン	22.7 %
水、界面活性剤等	77.3 %

Ⅲ. 生物活性

1. 活性の範囲

ペンフルフェンは植物病原性糸状菌に抗菌活性を有する。すなわち担子菌類、子のう菌類に属する病原菌に殺菌スペクトラムを示す。以下の担子菌類、子のう菌類起因の植物病害に優れた効果を示すことが確認されているが、特に担子菌類のうちのリゾクトニア菌に対しては、AG グループに依存することなく、効果を発揮する。なお、植物病原性ウイルスおよび細菌、また卵菌類、接合菌類に属する病原菌に対し、現在のところ抗ウイルス、抗菌活性は認められていない：

リゾクトニアによる植物病害 (*Rhizoctonia solani* : ばれいしょ 黒あざ病、稲 紋枯れ病、種々の植物体の苗立枯病、だいず リゾクトニア根腐病、芝 ラージパッチ)、ばれいしょ 銀か病 (*Helminthosporium solani*)、オオムギ斑葉病 (*Pyrenophora graminea*)、麦類 なまぐさ黒穂病 (*Tilletia controversa*, *T. caries*, *T. foetida*) とうもろこし黒穂病 (*Ustilago maydis*)

2. 作用機構

ペンフルフェンの作用点は、病原菌のミトコンドリア呼吸鎖におけるコハク酸脱水素酵素(複合体Ⅱ)の阻害であると推定される。その結果、病原菌の生活環における主たる生育段階、すなわち菌糸成長、胞子発芽、発芽管伸長、胞子形成などが強く阻害されることが認められている。以上によりペンフルフェンは、各種病原菌の成育の重要な段階に対して防除効果を発揮する。

3. 作用特性と防除上の利点

土壌伝染性のリゾクトニア菌に起因する種々の植物の苗立枯病、ばれいしょ黒あざ病、稲紋枯病等は、ひとたび発生すると作物生産が不可能となる重要な病害である。ペンフルフェンはこれらの病原菌に対して優れた予防効果を発揮する。

- 1) 高い抗菌活性、浸達性および移行性(導管を通じた上方移行)により、優れた予防的防除効果を示す。
- 2) 1)の特性と、低薬量で効果を発揮することから、種子処理、苗箱処理が可能である。
- 3) 植物毒性が極めて低いため、植物の種子、苗ステージからの使用が可能である。

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

3) オブテインフロアブル (ペンフルフェン22.7%)

作物名	適用病害虫名	希釈倍数	使用時期	本剤の使用回数	使用方法	ペンフルフェンを含む農薬の総使用回数
日本芝	葉腐病 (ラージパッチ)	666倍～ 1,000倍	発生前～ 発生初期	2回以内	1㎡当たり 0.2L散布	2回以内

2. 使用上の注意事項

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

3) オブテインフロアブル

- (1) 使用量に合わせ薬液を調製し使いきること。
- (2) 本剤は貯蔵中に分離することがあるので、使用に際しては容器をよく振ること。
- (3) 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。
- (4) 本剤の使用に当っては、使用量、使用時期、使用方法を誤らないように注意し、とくに初めて使用する場合は、病害虫防除所等関係機関の指導を受けることが望ましい。

3. 水産動植物に有毒な農薬については、その旨

3) オブテインフロアブル

- (1) 水産動植物（魚類）に影響を及ぼす恐れがあるので、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。
- (2) 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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

V.残留性及び環境中予測濃度算定関係

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

3. 土壌残留性試験

1) 分析法の原理と操作概要

アセトニトリル-水抽出。C18ミニカラムによる精製。液体クロマトグラフ・質量分析計(LC/MS)で定量。

2) 分析対象の化合物

①ペンフルフェン（有効成分、親化合物；記号[P]）

化学名：2'-[(RS)-1,3-ジメチルブチル]-5-フルオロ-1,3-ジメチルピラゾール-4-カルボキシニリド

2'-[(RS)-1,3-dimethylbutyl]-5-fluoro-1,3-dimethylpyrazole-4-carboxanilide

分子式：C₁₈H₂₄FN₃O

分子量：317.4

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

3) 残留試験結果

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

ほ場試験（畑地状態）

推定半減期；

ペンフルフェン

火山灰土 約124日

沖積土 約27日

分析機関：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

試料調製 及び 採取場所	被験物質の 処理方法		経過 日 数	分 析 結 果 (mg/kg)			
				ペンフルフェン			
	濃度・量	回数		最高値	平均値		
日本植物防疫 協会研究所 (火山灰土、 壤土) 畑地 平成20年度	フロアブル (24.0%) 2000倍希釈 300L/10a	0	-	<0.01	<0.01		
		4	0	1.42	1.42		
		4	3	1.97	1.94		
		4	7	1.51	1.48		
		4	14	1.38	1.36		
		4	30	1.12	1.12		
		4	60	0.99	0.96		
		4	90	1.06	1.06		
		4	120	0.87	0.86		
		4	150	0.80	0.79		
4	180	0.69	0.69				
4	270	0.66	0.66				
4	360	0.49	0.48				
日本植物防疫 協会研究所 高知試験農場 (沖積土、 壤土) 畑地 平成20年度	フロアブル (24.0%) 2000倍希釈 300L/10a	0	-	<0.01	<0.01		
		4	0	0.88	0.84		
		4	3	0.75	0.74		
		4	7	0.56	0.55		
		4	14	0.57	0.56		
		4	30	0.48	0.46		
		4	60	0.26	0.26		
		4	90	0.25	0.24		
		4	120	0.17	0.17		
		4	150	0.16	0.16		
4	180	0.18	0.18				
4	270	0.13	0.12				
4	360	0.16	0.15				

5. 環境中予測濃度算定関係

5-1. 水質汚濁性

1) 分析法の原理と操作概要

アセトニトリル-水抽出。C18ミニカラムによる精製。液体クロマトグラフ・質量分析計(LC-MS/MS)で定量。

2) 分析対象の化合物

①ペンフルフェン（有効成分、親化合物；記号[P]）

化学名：2'-[(RS)-1,3-ジメチルブチル]-5-フルオロ-1,3-ジメチルピラゾール-4-カルボキシリド

2'-[(RS)-1,3-dimethylbutyl]-5-fluoro-1,3-dimethylpyrazole-4-carboxanilide

分子式：C₁₈H₂₄FN₃O

分子量：317.4

3) 試験結果

(i) 田面水

推定半減期；

ペンフルフェン

火山灰土 4.0日

沖積土 3.0日

分析機関：財団法人 残留農薬研究所

試料調製 及び 採取場所	被験物質の 処理方法		経過 日数	分析結果 (mg/kg)			
				ペンフルフェン			
	濃度・量	回数		最高値	平均値		
残留農薬 研究所 試験区 1 (沖積土、 軽埴土) 水田 平成22年度	50g/育苗箱 1g/m ² (20 mg a.i./m ²)	0	-	<0.001	<0.001		
		1	0	0.040	0.038		
		1	1	0.033	0.032		
		1	2	0.027	0.026		
		1	3	0.019	0.018		
		1	5	0.014	0.014		
		1	7	0.010	0.010		
		1	10	0.007	0.007		
1	14	<0.001	<0.001				
残留農薬 研究所 試験区 2 (火山灰土、 埴壤土) 水田 平成22年度	50g/育苗箱 1g/m ² (20 mg a.i./m ²)	0	-	<0.001	<0.001		
		1	0	0.018	0.018		
		1	1	0.017	0.016		
		1	2	0.013	0.013		
		1	3	0.009	0.009		
		1	5	0.006	0.006		
		1	7	0.003	0.003		
		1	10	0.002	0.002		
1	14	<0.001	<0.001				

(ii) 浸透水

分析機関：財団法人 残留農薬研究所

試料調製 及び 採取場所	被験物質の 処理方法		経過 日数	分析結果 (mg/kg)			
				ペンフルフェン			
	濃度・量	回数		最高値	平均値		
残留農薬 研究所 試験区 1 (沖積土、 軽埴土) 水田 平成22年度	50g/育苗箱 1g/m ² (20 mg a.i./m ²)	0	-	<0.001	<0.001		
		1	7	<0.001	<0.001		
		1	14	<0.001	<0.001		
残留農薬 研究所 試験区 2 (火山灰土、 埴壤土) 水田 平成22年度	50g/育苗箱 1g/m ² (20 mg a.i./m ²)	0	-	<0.001	<0.001		
		1	7	<0.001	<0.001		
		1	14	<0.001	<0.001		

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 たりの 供試数	試験 方法	試験 水温 (°C)	LC ₅₀ 又はEC ₅₀ 値 (mg/L)				試験機関 (報告年)	備考 ・ 頁
						24h	48h	72h	96h		
1 GLP	魚類急性毒 性試験 原体()	コイ	10	止水式	20.2 ～ 21.9	0.238*	0.149*	0.110*	0.103*	(2009年)	29
2 GLP	ミジンコ類 急性遊泳阻 害試験 原体()	材シッコ	20	止水式	19.6 ～ 20.8	>4.66*	>4.66*	—	—	(2008年)	31
3 GLP	藻類生長阻 害試験 原体()	緑藻 <i>Pseudokir chneriell a subcapita</i>	初期濃 度 10 ⁴ 細 胞/mL	振とう 培養法	22.8 ～ 23.9	ErC ₅₀ (0-72hr) >5.1* NOECr (0-72hr) 0.52*				(2007年)	32
SC1 GLP	魚類急性毒 性試験 フロアブル (22.7%)	コイ	10	止水式	21.2 ～ 22.8	0.868	0.525	0.389	0.389	(2009年)	36
SC2 GLP	ミジンコ類 急性遊泳阻 害試験 フロアブル (22.7%)	材シッコ	30	止水式	20.8 ～ 21.4	25.9	12.4	—	—		37
SC3 GLP	藻類生長阻 害試験 フロアブル (22.7%)	緑藻 <i>Pseudokir chneriell a subcapita</i>	初期濃 度 10 ⁴ 細 胞/mL	振とう 培養法	21.8 ～ 22.0	ErC ₅₀ (0-72hr) >100 NOECr (0-72hr) 16.0					38

* : 平均実測濃度に基づく値 (申請者により算出)

水産動植物への影響に関する試験

1) ペンフルフェン原体を用いた魚類急性毒性試験

(資料No. 水産-1)

試験実施機関：

[GLP]

報告書作成年：2009年

被験物質： ペンフルフェン原体（純度 ）

供試生物： コイ（学名 *Cyprinus carpio*）

1群各10匹、体長 4.5 ± 0.4 cm、体重 1.3 ± 0.4 g（平均±標準偏差）

方法：予備試験の結果から、本試験の設定濃度は0.0478、0.0956、0.191、0.382および0.765mg/Lとした。試験には脱塩水に塩を加えてISOに準拠したイオン濃度に調製した再構成水を試験水として使用した。試験液の調製はまず、所定量の検体をジメチルホルムアミド（DMF）に溶解して各濃度の調製用原液を調製した。所定量の原液を試験水槽に入れた試験水40Lに入れて攪拌し、各試験濃度に調製した。対照は試験水のみとし、溶媒のみを加えた溶媒対照も設けた。試験液調製後30分以内に各水槽に10匹の試験魚を入れて止水式条件で16時間点灯/8時間消灯の明暗周期、水温20～24℃の条件で96時間暴露した。暴露日は4時間後、その後は毎日1回、死亡および中毒の徴候を観察した。試験液の溶存酸素濃度、水温およびpHを毎日測定した。試験開始時、48時間後および試験終了時に試験液中の検体濃度を分析した。観察時に全例が死亡した水槽については追加の分析も行った。

試験水温：20.2～21.9℃

結果：

試験濃度 (mg/L)	設定濃度	0.0478、0.0956、0.191、0.382、0.765	
	実測濃度	0.0610、0.117、0.196、0.475、0.751	
LC ₅₀ (mg/L) ¹⁾ [95%信頼限界]	24h	0.238 [0.177～0.322]	
	48h	0.149 [0.100～0.224]	
	72h	0.110 [---]	
	96h	0.103 [0.083～0.128]	
NOEC (mg/L) ¹⁾	0.0610		

¹⁾：実測濃度に基づく値

[---]数学的理由により求められなかった

暴露開始後4時間より実測濃度0.117mg/L以上の濃度区で症状および死亡が認められた。主な症状は、低層に留まる、呼吸困難、横転または仰向け、不活発または活動性低下であった。また、実測濃度0.117mg/L区では暴露後48～72時間に9例、実測濃度0.196mg/L以上の濃度区では4時間～72時間に全例が死亡した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

試験期間を通じて溶存酸素濃度は飽和度の96～101%、pHは7.1～7.4であった。

試験液中の分析濃度は設定値に対して全ての測定で98～160%、平均98～128%の範囲にあった。

暴露期間を通して試験液に沈殿などは認められず、透明であった。

水産動植物への影響に関する試験

2) ペンフルフェン原体を用いたミジンコ類急性遊泳阻害試験

(資料No. 水産-2)

試験実施機関：

[GLP]

報告書作成年：2008年

被験物質： ペンフルフェン原体（純度 ）

供試生物： オオミジンコ (*Daphnia magna*) 1群各20頭（生後24時間以内の個体）

方 法： 予備試験の結果から、本試験の設定濃度は0.31, 0.63, 1.25, 2.5および5.0mg/Lとした。試験には湧水および逆浸透水を混合した硬水を試験水として使用した。試験液の調製はまず、所定量の検体をジメチルホルムアミド (DMF) に溶解・超音波処理して調製用原液を調製した。所定量の原液を試験水で希釈し、各試験濃度の試験液を調製した。対照は試験水のみとし、溶媒のみを加えた溶媒対照も設けた。試験容器に各濃度4連で200mLずつ試験液を分注して1容器5頭のみジンコを入れて止水式条件で16時間点灯/8時間消灯の明暗周期、水温20±1℃の条件で48時間暴露した。暴露後4、24および48時間後に遊泳阻害および行動への影響を観察した。試験液の溶存酸素濃度、伝導度、硬度、アルカリ度およびpHを0および48時間に測定した。温度は自記記録計で連続的に測定した。試験開始時および48時間後に試験液中の検体濃度を分析した。

試験水温： 19.6～20.8℃

結 果：

試験濃度 (mg/L)	設定濃度	0.31、0.63、1.25、2.5、5.0	
	平均実測濃度	0.30、0.61、1.26、2.33、4.66	
EC ₅₀ (mg/L) ¹⁾	24h	> 4.66	
	48h	> 4.66	
NOEC (mg/L) ¹⁾	2.33		

¹⁾ 実測濃度に基づく値

最高濃度 4.66 mg/L において 20%の遊泳阻害が認められた。また、20 頭中 15 頭で活動低下、蒼白などが認められた。2.33 mg/L 以下の濃度区および対照区においては遊泳阻害およびその他の影響を認めなかった。

試験期間中の平均温度は19.9℃、溶存酸素濃度は8.3～8.6mg/L(91～96 % 飽和率)、pHは8.0～8.4の範囲にあった。

試験液中の分析濃度は設定濃度に対し暴露開始時で95～106%、暴露48時間後で88～98%の範囲にあった。

暴露期間を通して試験液に沈殿などは認められなかった。

水産動植物への影響に関する試験

3) ペンフルフェン原体を用いた藻類生長阻害試験

(資料No. 水産-3)

試験実施機関：

[GLP]

報告書作成年：2007年

被験物質：ペンフルフェン原体（純度 ）

供試生物：緑藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)

初期生物量 1.0×10^4 細胞/mL

方 法：試験施設での溶解度確認試験から希釈水への溶解限界が5.0 mg/Lと考えられた。予備試験の結果から、本試験の設定濃度は0.16、0.31、0.63、1.25、2.50および5.0mg/Lとした。培地には1xAPP培地を使用した。試験液の調製はまず、所定量の検体をジメチルホルムアミド (DMF) に溶解・超音波処理して調製用原液を調製した。所定量の原液を培地で希釈し、最高濃度の試験液を調製した。以下、順次培地を加えて希釈・混合して各濃度の試験液を調製した。対照は培地のみとし、溶媒のみを加えた溶媒対照も設けた。予め培養した藻類を加えて初期生物量とした試験液 (100mL) を各濃度3連、止水条件で連続照明、温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ の条件で96時間振とう培養した。24時間毎に光学顕微鏡を用いて細胞を観察して細胞密度を計数した。試験液の伝導度およびpHを試験開始時および試験終了時に測定した。温度は自記記録計で連続的に、また、校正済み温度計で毎日測定した。試験開始時および試験終了時に試験液中の検体濃度を分析した。

培養温度：22.8～23.9℃

結 果：

試験濃度 (mg/L)	設定濃度	0.16、0.31、0.63、1.25、2.5、5.0
	平均実測濃度 (0-96時間)	0.14、0.28、0.52、0.99、2.3、5.1
ErC ₅₀ (mg/L) ¹⁾		(0～72h) > 5.1
NOECr (mg/L) ¹⁾		(0～72h) 0.52

¹⁾：実測濃度に基づく値（申請者により算出）

試験期間中、対照およびいずれの試験区においても形態学的な変化は認められなかった。また、試験期間を通して試験液に沈殿などは認められなかった。試験液の伝導度は87～95µmhos/cm、pHは開始時7.4～7.5、終了時9.3～9.6の範囲であった。試験液中の被験物質濃度は、設定濃度に対し暴露開始時で73～105%、暴露96時間後で77～104%の範囲にあった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はパイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

水産動植物への影響に関する試験

7) ペンフルフェン22.7%フロアブルを用いた魚類急性毒性試験

(資料No. 水産-SC1)

試験実施機関：

[GLP]

報告書作成年：2009年

被験物質： ペンフルフェン22.7%フロアブル

供試生物： コイ (学名 *Cyprinus carpio*)

1群各10匹、体長4.5±0.4cm、体重1.3±0.3 g (平均±標準偏差)

方 法：所定量の検体を直接または515mg/Lのストック溶液を調製後、飼育水40Lに入れて攪拌し、濃度0.0530、0.117、0.258、0.563、1.24、2.73および6.00mg/Lの試験液を調製した。対照区は飼育水のみとした。試験水槽にコイ10匹を投入し、止水条件下で96時間暴露した。4、24、48、72および96時間後に死亡および一般状態を観察し記録した。水温、pHおよび溶存酸素濃度を暴露開始時および毎日1回測定した。

試験水温：21.2～22.8℃

結 果：

試験濃度 (mg/L)	設定濃度	0.0530、0.117、0.258、0.563、1.24、2.73、6.00	
LC ₅₀ (mg/L) [95%信頼限界]	24h	0.868 [0.668～1.128]	
	48h	0.525 [---]	
	72h	0.389 [---]	
	96h	0.389 [---]	
NOEC (mg/L)	0.258		

[---] 数学的理由により求められなかった

暴露開始後4時間以降0.563mg/L以上の濃度で行動の変化が認められ、いずれも暴露72時間目には全個体が死亡した。0.258mg/L以下の濃度では影響は認められなかった。

水産動植物への影響に関する試験

8) ペンフルフェン22.7%フロアブルを用いたミジンコ類急性遊泳阻害試験

(資料No. 水産-SC2)

試験実施機関：

[GLP]

報告書作成年：2009年

被験物質： ペンフルフェン22.7%フロアブル

供試生物： オオミジンコ (*Daphnia magna*) 1群各30匹 (生後24時間以内の個体)

方 法：試験直前に所定量の検体を飼育水で希釈し200mg/Lのストック溶液を調製後、ストック溶液を飼育液でさらに希釈して所定濃度の試験液を調製した。
1濃度当り50mlの試験液を入れた100ml容のビーカーを6個使用し、各ビーカーにミジンコを5個体入れ、止水条件で48時間暴露させた。暴露開始後24および48時間目にミジンコの行動を観察した。暴露期間中、給餌は行わなかった。

試験水温： 20.8～21.4℃

結 果：

設定濃度 (mg/L)	2.50、5.00、10.0、20.0、40.0	
EC ₅₀ (mg/L) [95%信頼限界]	24h	25.9 [18.4～36.8]
	48h	12.4 [6.8～22.4]
NOEC (mg/L)	<2.50	

水産動植物への影響に関する試験

9) ペンフルフェン22.7%フロアブルを用いた藻類生長阻害試験

(資料No. 水産-SC3)

試験実施機関：

[GLP]

報告書作成年：2009年

被験物質： ペンフルフェン22.7%フロアブル

供試生物：緑藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)

初期生物量 1.0×10^4 細胞/mL

方 法：試験直前に検体100.5mgを培地で希釈しストック溶液を調製後、ストック溶液を培地でさらに希釈して所定濃度の試験液を調製した。

1濃度当り150mlの試験液を入れた300ml容の三角フラスコを3個（対照区は6個）使用した。連続照明（4440～8880lux）72時間振とう培養した。暴露期間中毎日培地を採取し、顕微鏡下、細胞数を計数した。

培養温度：21.8～22.0℃

結 果：

設定濃度 (mg/L)	2.56、6.40、16.0、40.0、100
ErC ₅₀ (0～72h) (mg/L)	>100
NOErC (mg/L)	16.0

2-1 蚕、ミツバチおよび天敵昆虫に対する影響

No.	試験名称 および検体	供試生物	一区当り 供試数	試験方法（投与方法、 投与量、試験条件等）	試験結果	試験機関 (報告年)
1	蚕に対する 影響試験 原体 ()	蚕 <i>Bombyx mori</i> 品種： 錦秋×鐘和 4 齢起蚕	60匹 (20/容器、3 反復)	360 mg a.i./Lの試験液に桑葉を浸漬処理し風乾したものを4齢期間中毎日与えた。	繭重、繭層重の減少、摂餌量の減少、4,5齢期間の延長傾向が認められた。	(2010年)
2 GLP	ミツバチに対する急性 毒性試験 原体 ()	西洋ミツバチ <i>Apis mellifera</i>	50頭 (10匹/容器 ×5反復)	接触投与： 100 µg a.i./頭 経口投与： 108.2 µg a.i./頭	LD50(48h) > 100 µg a.i./頭 LD50(48h) > 108.2 µg a.i./頭	(2007年)
3	天敵昆虫に対する急性 接触毒性 原体 ()	コレマンアブラハチ成虫 <i>Aphidius colemani</i>	30頭 (10頭 ×3反復)	濾紙接触法 68.1 mg a.i./200ml 薬剤処理後乾燥時間： 24時間又は30分	補正死亡率 ：0.0%(乾燥24時間) ：3.54%(乾燥30分間) (試験期間72時間)	(2010年)
4		タイリクヒメハチ成虫 <i>Orius strigicollis</i>	30頭 (5頭 ×6反復)	ドライフィルム法 68.1 mg a.i./200ml	死亡率：3.3% (試験期間72時間)	
5		ナシトウ幼虫 <i>harmonia axyridis</i>	30頭 (15頭 ×2反復)	ドライフィルム法 68.1 mg a.i./m ²	死亡率：3.3% (試験期間7日間) 羽化率：93.3% (試験期間21日間)	

2-2 鳥類

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 (mg/kg)	LD ₅₀ 及び 無影響量	観察された影響等	試験機関 (報告年)
1 GLP	急性経口 毒性試験 原体 ()	コリン ウスラ	雌雄 各5羽	単回強制 経口投与 14日間 観察	1000、 2000、 4000	LD ₅₀ ♂♀ >4000 mg/kg 無影響量 ♂4000 ♀2000 mg/kg	中毒症状 なし 死亡例 なし 剖検 所見なし。 体重 ♀ 4000 mg/kgで 低下	(2009年)

Ⅶ. 使用時安全上の注意、解毒法等

<オブテインフロアブル> ペンフルフェン 22.7%

1. 使用時安全上の注意事項

- (1) 誤飲などのないよう注意すること。
- (2) 公園等で使用する場合は、散布中及び散布後（少なくとも散布当日）に小児や散布に関係のない者が散布区域に立ち入らないよう縄囲いや立て札を立てるなど配慮し、人畜等に被害を及ぼさないよう注意を払うこと。

2. 解毒法および治療法

特になし

3. 製造時、使用時等における事故例

特になし

Ⅷ 毒 性

A. 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 動物数	投 与 方 法	投 与 量 (mg/kg)	LD ₅₀ 値又は 無毒性量 (mg/kg)	試験機関 (報告年)	記 載 頁
原体 -1 (GLP)	急性毒性 14日間観察	ラット	♀ 3	経 口	♀ 2000	♀ >2000	(2007)	毒- 8
原体 -2 (GLP)	急性毒性 14日間観察	ラット	♂♀ 5	経 皮	♂♀ 2000	♂♀ >2000	(2007)	毒- 9
原体 -3 (GLP)	急性毒性 14日間観察	ラット	♂♀ 5	エアゾル 吸入 (鼻部 曝露)	♂♀ 0, 2022.5 mg/m ³ (実際濃度)	♂♀ >2022.5 mg/m ³	(2008)	毒- 10
原体 -4 (GLP)	皮膚刺激性 72時間観察	ウサギ	♀ 3	皮膚 貼付	0.5g/パッチ	刺激性なし	(2007)	毒- 12
原体 -5 (GLP)	眼刺激性 72時間観察	ウサギ	♀ 3	点 眼	0.1g/眼	刺激性あり	(2007)	毒- 13
原体 -6 (GLP)	皮膚感作性 48時間観察 (Maximization法)	モルモ ット	♀ 20 対照10	検体 感作：皮内・2.5%液 0.1mL 経皮・50%液 0.5mL 惹起：経皮・50%液 0.5mL		感作性なし	(2007)	毒- 15
原体 -7 (GLP)	急性 神経毒性 14日間観察	ラット	♂♀ 12	経 口	♂♀ 0, 100, 500, 2000 ♀ 0, 25, 50(追加) mg/kg	♂100 ♀ 50 mg/kg 神経組織へ の影響なし	(2009)	毒- 18
原体 -8 除外	急性遅発性神 経毒性	提出除外理由書： 遅発性神経毒性を有する既知の化学物質との化学構造上の相関などからみ て、遅発性神経毒性を有するおそれがないと認められる。						毒- 24
原体 -9 (GLP)	反復経口 投与毒性 90日間	ラット	♂♀ 10	混 餌	♂♀ 0, 150, 7000, 14000 ppm ♂ 9.5, 457, 947 ♀ 11.4, 492, 1009 mg/kg/日	♂♀ 150ppm ♂ 9.5 ♀ 11.4	(2006)	毒- 25
原体 -10 (GLP)		ラット (補足 試験)	♂♀ 10	混 餌	♂♀ 0, 50, 150, 3500 ppm ♂ 3.2, 9.3, 228 ♀ 3.7, 11.4, 260 mg/kg/日	♂♀ 3500ppm ♂ 228 ♀ 260	(2006)	毒- 34
原体 -11 (GLP)		イヌ	♂♀ 4	混 餌	♂♀ 0, 180, 1800, 18000 ppm ♂ 5.6, 55.7, 532 ♀ 6.1, 63.1, 568 mg/kg/日	♂♀ 180ppm ♂ 5.6 ♀ 6.1	(2008)	毒- 40

資料 No.	試験の種類 期間	供試動物	1群当り 動物数	投与方法	投与量 (mg/kg)	LD50値又は 無毒性量 (mg/kg)	試験機関 (報告年)	記載頁
原体 -12 除外	21日間反復経皮毒性	提出除外理由書： 急性経皮毒性試験の結果から、強い経皮毒性等を有するおそれがないと認められる。						毒-48
原体 -13 除外	90日間反復吸入毒性	提出除外理由書： 急性吸入毒性試験の結果から、強い吸入毒性等を有するおそれがないと認められる。						毒-49
原体 -14 (GLP)	反復経口投与 神経毒性 90日間	ラット	♂♀ 12	混餌	♂♀ 0, 250, 2000, 8000 ppm ♂16.02, 126.1, 516.0 ♀19.88, 155.9, 608.8 mg/kg/日	神経毒性なし ♂♀ 2000ppm ♂ 126.1 ♀ 155.9	(2009)	毒-50
原体 -15 除外	28日間反復遅発性神経毒性	提出除外理由書： 急性遅発性神経毒性試験成績を提出する必要がないと認められる場合であるため。						毒-60
原体 -16 (GLP)	慢性毒性 52週間	イヌ	♂♀ 4	混餌	♂♀ 0, 200, 1000, 10000ppm ♂6.8, 32.0, 357 ♀7.7, 37.9, 425 mg/kg/日	♂♀ 1000ppm ♂ 32.0 ♀ 37.9	(2009)	毒-61
原体 -17 (GLP)	1年間反復経口投与/発がん性併合 24ヶ月	ラット	♂♀ 80	混餌	♂♀ 0, 100, 2000, 7000 ppm ♂4.0, 79, 288 ♀5.6, 113, 399 mg/kg/日	♂♀ 100ppm ♂ 4.0 ♀ 5.6 発がん性なし	(2009)	毒-69
原体 -18 (GLP)	発がん性 18ヶ月	マウス	♂♀ 60	混餌	♂♀ 0, 100, 1000, 6000ppm ♂14.3, 146, 880 ♀18.4, 182, 1101 mg/kg/日	♂♀ 1000ppm ♂ 146 ♀ 182 発がん性なし	(2009)	毒-110
原体 -19 (GLP)	繁殖性 (2世代)	ラット	♂♀ 30	混餌	♂♀ 0, 200, 1000, 4000 ppm P: ♂12.8, 64.1, 252.2 ♀15.0, 75.9, 294.5 F ₁ : ♂12.2, 58.4, 256.5 ♀14.9, 71.2, 293.4 mg/kg/日	無毒性量 親および児 1000ppm P: ♂64.1, ♀75.9 F ₁ : ♂58.4, ♀71.2 繁殖性 ♂:影響なし ♀:1000ppm	(2009)	毒-130
原体 -20 (GLP)	催奇形性	ラット	♀ 23	経口	♀ 0, 30, 100, 300 mg/kg/日	親30, 児300 mg/kg/日 催奇形性なし	(2008)	毒-140
原体 -21 (GLP)		ウサギ	♀ 23	経口	♀ 0, 30, 100, 600 mg/kg/日	親および児 100 mg/kg/日 催奇形性なし		毒-147

資料 No.	試験の種類 期間	供試 動物	1群当り 動物数	投与 方法	投与量 (mg/kg)	LD50値又は 無毒性量 (mg/kg)	試験機関 (報告年)	記載 頁
原体 -22 (GLP)	変異原性 (復帰変異)	サルモネラ菌	TA98 TA100 TA1535 TA1537 TA102	<u>in</u> <u>vitro</u>	0, (3), 10, 33, 100, 333, 1000, 2500, 5000 μg/プレート ()は1回目試験のみ	陰性	(2009)	毒- 155
原体 -23 (GLP)	変異原性 (染色体異常)	チャイニーズハムスター V79細胞		<u>in</u> <u>vitro</u>	1回目 : [4/18hr] (-S9および+S9) 0, 4.7, 9.4, 18.8, 37.5, 75.0, 150, 300, 600, 1200 2回目 : [(-S9)18/18 および(+S9)4/18hr] 0, 2.3, 4.7, 9.4, 18.8, 37.5, 50.0, 75.0, 100, 150, 300 (μg/ml) []内は 処理時間/回収時間	陰性	(2009)	毒- 158
原体 -24 (GLP)	変異原性 (小核)	マウス	♂ 5	腹腔	0, 250, 500, 1000 24時間間隔で2回	陰性	(2007)	毒- 161
原体 -25 (GLP)	変異原性 (HPRT)	チャイニーズハムスター V79細胞		<u>in</u> <u>vitro</u>	1回目 : (-S9) 0, 2.3, 4.5, 9.0, 18, 27, 36, 54 (+S9) 0, 4.7, 9.4, 18.8, 37.5, 75, 150 2回目 : (-S9) 0, 4.5, 9, 18, 27, 36, 45 (+S9) 0, 9.4, 18.8, 37.5, 75, 100, 125 (μg/ml)	陰性	(2009)	毒- 163

資料 No.	試験の種類 期間	供試動物	1群当り 動物数	投与 方法	投与量 (mg/kg)	LD ₅₀ 値又は 無毒性量 (mg/kg)	試験機関 (報告年)	記載 頁		
原体 -26 (GLP)	生体の機能に及ぼす影響	中枢神経系	一般症状・行動	マウス	♂♀4	経口	♂♀ 0, 51.2, 128, 320, 800, 2000	♂♀ 2000 影響なし	(2009)	毒- 167
			抗痙攣作用	マウス	♂6	経口	0, 500, 1000, 2000	♂ 2000 影響なし		
		呼吸循環器系	ウサギ	♂3	十二指腸内	0, 1000, 2000	♂ 2000 影響なし			
		尿および電解質排泄	ラット	♂6	経口	0, 500, 1000, 2000	♂ 2000 影響なし			
原体 -27	反復経口 投与毒性 () 28日間	ラット	♂♀ 5	混餌	♂♀ 0, 150, 2000, 7000 ppm ♂12, 154, 560 ♀13, 169, 648 mg/kg/日	♂♀150ppm ♂ 12 ♀ 13	(2004)	毒- 171		
原体 -28	反復経口 免疫毒性 29-30日間	ラット	♂♀ 8	混餌	♂♀ 0, 200, 1000, 7000 ppm ♂17.9, 82.6, 755.6 ♀20.4, 104.5, 960.5 mg/kg/日	♂♀1000ppm ♂ 82.6 ♀ 104.5 7000ppmでも 免疫毒性 なし	(2008)	毒- 178		
原体 -29							(2011)	毒- 182		
原体 -30								毒- 186		

B. 代謝物、混在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 動物数	投与 方法	投与量 (mg/kg)	LD ₅₀ 値又は 無毒性量 (mg/kg)	試験機関 (報告年)	記載 頁
代混 -1 (GLP)	変異原性 (復帰変異)	サルモネラ菌	TA98 TA100 TA1535 TA1537 TA102	<u>in</u> <u>vitro</u>	0, 16, 50, 158, 500, 1581, 5000 (μ g/プレート)	陰性	(2008)	毒- 191
代混 -2 (GLP)	変異原性 (染色体異常)	チャイニーズハムスター V79細胞		<u>in</u> <u>vitro</u>	[4/18hr] : (-S9) 0, 150, 300, 600, 900, 1200 (+S9) 0, 75, 150, 300, 600, 900 [4/30hr] : (-S9) 0, 600, 900 (+S9) 0, 300, 600, 900, 1200 [18/18hr] : (-S9) 0, 75, 150, 300, 450, 600 (μ g/ml) []内は 処理時間/回収時間	陰性	(2008)	毒- 194
代混 -3 (GLP)	変異原性 (HPRT)	チャイニーズハムスター V79細胞		<u>in</u> <u>vitro</u>	1および2回目 : (-S9および+S9) 0, 75, 150, 300, 600, 900, 1200 (μ g/ml)	陰性	(2008)	毒- 197
代混 -4 (GLP)	変異原性 (復帰変異)	サルモネラ菌	TA98 TA100 TA1535 TA1537 TA102	<u>in</u> <u>vitro</u>	0, 16, 50, 158, 500, 1581, 5000 (μ g/プレート)	陰性	(2009)	毒- 201
代混 -5 (GLP)	変異原性 (染色体異常)	チャイニーズハムスター V79細胞		<u>in</u> <u>vitro</u>	[4/18hr] : (-S9および+S9) 0, 15, 30, 60 [18/18hr] : (-S9) 0, 15, 30, 60 [4/30hr] : (-S9および+S9) 0, 60 (μ g/ml) []内は 処理時間/回収時間	陰性	(2009)	毒- 204

資料 No.	試験の種類 期間	供試動物	1群当り動物数	投与方法	投与量 (mg/kg)	LD ₅₀ 値又は無毒性量 (mg/kg)	試験機関 (報告年)	記載頁
代混-6 (GLP)	変異原性 (HPRT)	チャイニーズハムスター V79細胞		in vitro	1および2回目： (-S9および+S9) 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 (μ g/ml)	陰性	(2009)	毒-207

C. 製剤を用いた試験成績

資料 No.	試験の種類 期間	供試動物	1群当り動物数	投与方法	投与量 (mg/kg)	LD ₅₀ 値又は無毒性量 (mg/kg)	試験機関 (報告年)	記載頁
								毒-211
								毒-212
								毒-213
								毒-214
								毒-216
								毒-218
製剤-7 (GLP)	急性毒性 22.7%アブソリュート 14日間観察	ラット	♀ 3	経口	♀ 2000	♀ >2000	(2009)	毒-220
製剤-8 (GLP)	急性毒性 22.7%アブソリュート 14日間観察	ラット	♂♀ 5	経皮	♂♀ 2000	♂♀ >2000		毒-221
製剤-9 除外	急性吸入 22.7%アブソリュート	提出除外理由書： 本剤は気化させて使用する農薬でないため。						毒-222

資料 No.	試験の種類 期 間	供 試 動 物	1群当り 動物数	投与 方法	投 与 量 (mg/kg)	LD50値又は 無毒性量 (mg/kg)	試験機関 (報告年)	記 載 頁
製剤 -10 (GLP)	皮膚刺激性 22.7%7077 ^μ N 72時間観察	ウサギ	♀ 3	経 皮	0.5ml/部位	刺激性なし	(2009)	毒- 223
製剤 -11 (GLP)	眼刺激性 22.7%7077 ^μ N 72時間観察	ウサギ	非洗眼 ♀ 3	点 眼	0.1ml/点眼	刺激性なし		毒- 225
製剤 -12 (GLP)	感作性 22.7%7077 ^μ N 5日間 (LLNA法)	マウス	♀ 5	耳 介	濃度 0, 25, 50, 100% 溶液 25 μ Lを3回 (1 日1回) 耳介表面に処 理 陽性対照 30%HCA	感作性なし	(2009)	毒- 227

A. 原体を用いた試験成績

1. 急性毒性

(1) ラットにおける急性経口毒性試験

(資料No. 原体-1)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：2007年

検体の純度： %

試験動物：ウイスター (HsdCpb:Wu) 系ラット、9~12週齢、体重雌:182~211g
1群雌各3匹

試験期間：14日間観察 (毒性等級法)

試験方法：検体を2% Cremophor EL水溶液に懸濁させ、絶食させたラットに単回強制経口投与した。投与用量は初回および2回目の各投与段階とも2000mg/kgの1用量とし、投与容量は10mL/kgとした。投与2~4時間後に再給餌した。

観察項目：中毒症状および死亡を投与日は頻繁に、その後は毎日1回以上、14日間観察した。体重を投与直前、その後は毎週1回測定した。
観察期間終了時、全生存動物について剖検して肉眼的に検査した。

試験結果：

投 与 方 法	経 口
投 与 量 (mg/kg)	♀ 2000
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	♀ >2000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現時間及び消失時間	発症例なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	♀ 2000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	♀ 2000

中毒症状及び死亡はいずれの投与においても全く認められなかった。
体重推移において何ら影響は認めなかった。
剖検において、肉眼的異常所見は認められなかった。

(2)ラットにおける急性経皮毒性試験

(資料No. 原体-2)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：2007年

検体の純度： %

試験動物：ウイスター (HsdCpb:Wu) 系ラット、9～13週齢、
体重 雄:223～251g 雌:205～230g、1群雌雄各5匹

試験期間：14日間観察

試験方法：所定量秤量した検体をウェットガーゼパッド (Cutiplast® steril 6×5cm) に塗布し、投与前日に毛刈りした動物の背部に貼付し、粘着性伸縮テープで固定してさらにラット用ジャケット (Lomir biomedical Inc) で被覆した。
24時間後に被覆物を取り除き、貼付部位を石鹼と微温湯で洗い乾燥させた。

観察項目：中毒症状および死亡を投与日は頻繁に、その後は毎日1回以上、14日間観察した。体重を投与直前、その後は毎週1回測定した。
観察期間終了時、全生存動物について剖検して肉眼的に検査した。

試験結果：

投 与 方 法	経 皮
投 与 量 (mg/kg)	♂♀ 2000
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	♂♀ >2000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現時間及び消失時間	発症例なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	♂♀ 2000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	♂♀ 2000

雌雄共に中毒症状及び死亡は全く認められず、平均体重の推移においても検体投与の影響は認めなかった。

剖検において、肉眼的異常所見は雌雄共に認められなかった。

(3) ラットにおける急性吸入毒性試験

(資料No. 原体-3)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：2008年

検体の純度： %

供試動物：ウイスター (HsdCpb:Wu) 系ラット、8~12週齢 1群雌雄各5匹
 体重、雄:184~205g 雌:176~189g

観察期間：14日間観察

方法：微粒化した検体をダスト発生器で発生可能な最高濃度2000mg/m³でエアロゾルを発生させ、4時間鼻部暴露した。
 暴露空気をガラスファイバーフィルターで捕集し、重量測定法により暴露空気の濃度を求めた。

暴露条件：

設定濃度 (mg/m ³)	2000
実際濃度 (mg/m ³)	2022.5
粒子径分布 (%) *	
>9.0 μm	5.50
5.8~9.0	14.78
4.7~5.8	22.58
3.3~4.7	30.96
2.1~3.3	18.92
1.1~2.1	6.08
1.1<	1.19
空気力学的質量中位径 (μm)	4.11
吸入可能な粒子 (<4.7 μm) の割合 (%)	57.15
チャンバー容積 (ℓ)	3.8
チャンバー内通気量 (ℓ/分)	28
暴露条件	エアロゾル4時間鼻部暴露

* ANDERSEN cascade impactorにより2測定した平均

観察・検査項目：外観及び行動を暴露日は頻繁に、その後は毎日1回以上暴露後14日間注意深く観察して記録した。暴露終了時はIrwin法に準じて反射についても検査した。また、暴露終了後30分以内にデジタル温度計で直腸温を測定した。体重は暴露前、暴露後1、3、7及び14日に測定した。観察期間終了後は全ての動物について剖検し、肉眼的病理検査を実施した。

結果：

投与方法	吸入
暴露濃度 (mg/m ³)	雌雄 2022.5
LC ₅₀ (mg/m ³)	雌雄 >2022.5
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び消失時間	暴露終了後に発現 暴露終了4日後に消失
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/m ³)	雌雄 2022.5

死亡例は雌雄共に認めなかった。

暴露中、特別に変化は認めなかったが、暴露終了後の観察で立毛、運動性低下、緩和呼吸、呼吸困難、鼻部赤色付着物、跛行を雌雄で各1～4例に認めた。さらに雄では呼吸困難と呼吸音が各1例、雌では高足歩行が3例、よろめき歩行1例も認められた。雌雄共に鼻部赤色付着物を除いて暴露翌日には消失し、鼻部赤色付着物も暴露2～4日後には消失した。

暴露終了後の反射についての検査では、雌雄共に何ら変化を認めなかった。

暴露終了後に実施した直腸温測定で、対照群および検体暴露群の平均直腸温は雄で38.0および35.0℃、雌では38.0および34.4℃と、雌雄共に対照群に比して直腸温の有意 (ANOVA検定 P<0.05) な低下が認められた。

雄では暴露1日後の平均体重が対照群および検体暴露群で減少したが、有意な変化でなく、その後は順調に体重増加した。雌では検体暴露群に変化は認めなかった。

肉眼的病理検査では投与に関連する変化は認められなかった。

2. 皮膚およ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. 原体-4)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：2007年

検体の純度： %

供試動物：ニュージーランド白色系 (Cr1:KBL(NZW)BR) ウサギ 2.6~3.3kg 1群雌3匹

観察期間：72時間

投与方法：投与前日にウサギの胴体部分の左右背側部を毛刈りした。

皮膚の約2.5×2.5cmの広さを検体適用部位とし、微粉化した検体0.5gを少量の水で湿らせてガーゼパッチに広げ、貼付した。非刺激性テープで固定し、適用時間終了後、ガーゼパッチを取り除き、水で注意深く適用部位を洗浄した。非適用部位を対照とした。

なお、刺激性を確認するため、最初に1匹について3枚のパッチを上記の手順で貼付し、1枚目を3分後、2枚目を1時間後に取り除き皮膚反応を認めなかったため3枚目は4時間貼付した。さらに他の2匹についても検体を貼付し4時間適用した。

観察項目：検体除去1、24、48及び72時間後に、検体適用部位の刺激性変化（紅斑及び痂皮、浮腫）の有無を観察し、Draizeの基準に従って採点した。

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 (hrs)			
			1	24	48	72
1	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
2	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
3	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
合計	紅斑・痂皮	12	0	0	0	0
	浮腫	12	0	0	0	0
平均	紅斑・痂皮	4	0.0	0.0	0.0	0.0
	浮腫	4	0	0	0	0

いずれの観察時間においても紅斑や浮腫などの皮膚刺激性変化は全く認められなかった。

試験の結果、本検体はウサギの皮膚に対して刺激性を示さなかった。

(2) ウサギを用いた眼刺激性試験

(資料No. 原体-5)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：2007年

検体の純度： %

供試動物：ニュージーランド白色系 (Cr1:KBL(NZW)BR) ウサギ 2.4~3.2kg 1群雌3匹

観察期間：72時間

投与方法：試験前日に眼の検査を行い、異常を認めない動物を試験に使用した。

微粉化した検体0.1gを片側の結膜嚢に投与して直ちに眼瞼を軽く1秒間合わせた。もう片側の眼は無処置対照眼とした。なお、投与はまず1匹について行い、投与1時間後に強い刺激性変化を示さなかったため、さらに2匹について同様に投与した。投与24時間後、生理食塩水で洗眼した。

観察項目：投与後1、24、48及び72時間後に角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察しDraizeの基準に従って採点し、directive 67/548/EECに準じて刺激性を評価した。試験開始時に体重を測定した。また、眼以外の所見についても記録した。

表. 刺激性の評価基準

	平均スコア (24-72時間)	評価
角膜混濁	<2 =-, ≥ 2<3 =+, ≥ 3 =++	- : 刺激性なし
虹彩	<1 =-, ≥ 1<2 =+, = 2 =++	+ : 刺激性
結膜発赤	<2.5 =-, ≥ 2.5 =+	++ : 重大な刺激性
結膜浮腫	<2 =-, ≥ 2 =+	

結果：観察結果を表に示した。

投与眼では投与1時間後に全例で評点2の結膜の発赤、評点1の結膜浮腫がみられ、1例に評点1の虹彩変化が認められた。24時間後では虹彩変化と2例での結膜浮腫は消失し、48時間後には結膜浮腫を認めなくなった。結膜の発赤は24時間後より回復傾向がみられ、48~72時間には消失した。各動物の24~72時間平均スコアはいずれの観察項目も0.7以下であった。

以上の結果から、本検体はウサギの眼に対して「刺激性なし」と評価された。

申請者注：本試験ではdirective 67/548/EECの基準に準じて評価され、眼に対し刺激性でないと結論している。しかしながら24時間後で3例全例に、48時間後では1例にわずかながら刺激性変化が観察されていることから、検体は軽度の眼刺激性を有しているものと考えられた。

表 - 眼の観察結果

項 目			最高 評点 ※	適用後時間 (時間)				平均 スコア (24-72hr)	評価 #
				1	24	48	72		
動物 番号 1	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0	0.0	-
		面積	4	0	0	0	0		
	虹 彩		2	0	0	0	0	0.0	-
	結膜	発赤	3	2	2	0	0	0.7	-
		浮腫	4	1	1	0	0	0.3	-
動物 番号 2	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0	0.0	-
		面積	4	0	0	0	0		
	虹 彩		2	0	0	0	0	0.0	-
	結膜	発赤	3	2	2	0	0	0.7	-
		浮腫	4	1	0	0	0	0.0	-
動物 番号 3	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0	0.0	-
		面積	4	0	0	0	0		
	虹 彩		2	1	0	0	0	0.0	-
	結膜	発赤	3	2	1	1	0	0.7	-
		浮腫	4	1	0	0	0	0.0	-
合計*			330	23	12	2	0		
平均			110	7.7	4	0.7	0		

※ 判定基準の最高評点

* Draize法による評価点 (最高110点/匹) : 申請者により算出

- : 刺激性なし

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. 原体-6)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 2007年

検体の純度: %

供試動物: Hartley系 (Cr1:HA) モルモット、5~6週齢、体重350~398g
1群雌各20匹 (対照群は10匹 + 惹起濃度設定用動物2匹)

観察期間: 約32日間

試験操作: [Maximization法]により実施した。

試験濃度設定根拠;

感作; <皮内感作> 投与前日に毛刈りした動物の頸背部から脊柱の左右各3部位に1列に以下の試料を各0.1mL皮内注射した。

1. Freund's 完全アジュバント 1:1滅菌生理食塩水希釈液
2. 2.5%検体PEG懸濁液
3. 2.5%検体 (PEG懸濁液とFreund's 完全アジュバント等量混合液)

対照群 (惹起濃度設定用動物2例を含む) には検体を含まない試料を同様に処理した。

<貼付感作> 皮内感作後1週間に貼付感作を行った。感作前日に毛刈りした感作部位に、50%検体を0.5mL処理した低刺激性パッチ (2×4cm) を置き、アルミニウムホイルで覆い、粘着テープで固定して48時間適用した。適用時間終了後はパッチをはずして滅菌生理食塩水で検体を除去した。対照群 (惹起濃度設定用動物2例を含む) には溶媒のみを同様に処理した。

惹起; 皮内感作3週間後に惹起投与を行った。惹起投与前日に動物の右腹側部を刈毛した。右腹側部の尾側には50%検体を0.5mL処理した低刺激性パッチを、頭部側には溶媒のみを0.5mL処理したパッチを置き、アルミニウムホイルで

覆い、粘着テープで固定して24時間適用した。適用時間終了後、パッチをはずして滅菌生理食塩水で検体を除去した。

惹起1週間後に再惹起を動物の左腹側部を用いて初回惹起と同様の手順で実施した。

観察項目：動物は毎日1回以上観察し、体重を試験開始時、25および32日に測定した。惹起および再惹起検体の除去24および48時間後に適用部位の皮膚反応を観察し、Magnusson & Kligmanの評点基準に従い評点した。皮膚反応とその程度を比較し、試験群で対照群よりも30%以上陽性反応を認めた場合、感作性ありとした。(Commission Directive 96/54/EC of 30 July 1996)

- 評点基準
- 0：反応なし
 - 1：わずかな部分的発赤
 - 2：中程度の全体的発赤
 - 3：強度の発赤と浮腫

結果：皮膚反応の観察結果を表に示した。

試験群で認めた皮膚反応はいずれも評点1で、初回惹起24時間後に5例(25%)、48時間後に4例(20%)認められた。また、再惹起では24時間後にのみ2例(10%)認められた。

対照群において皮膚反応は全く認められなかった。

以上の結果より、本検体はモルモットに対して皮膚感作性を有しないと判断される。^{注)}

^{注)}申請者注：本試験においては試験群で最大25%の陽性率がみられているが、対照群よりも30%以上陽性であった場合を感作性ありとする判断基準に基づき、検体は感作性を有しないと判断している。また、化学品の分類および表示に関する世界調和システム（GHS）においても、アジュバントを用いる試験方法では動物の30%以上で反応があった場合を感作性陽性としている。これらのことより、申請者も本試験における検体の皮膚感作性は陰性であると判断した。

表. 皮膚反応の観察結果

	群	適用濃度		惹起 (%)	供試動物数	感作反応動物数										陽性率 (%)	
		感作 (%)				24時間					48時間					24時間	48時間
		皮内	局所			皮膚反応評点					皮膚反応評点						
		0	1			2	3	計	0	1	2	3	計				
初回惹起	検体	2.5	50	50	20	0	5	0	0	5/20	0	4	0	0	4/20	25	20
		溶媒	溶媒	50	10	0	0	0	0	0/10	0	0	0	0	0/10	0	0
再惹起	検体	2.5	50	50	20	0	2	0	0	2/20	0	0	0	0	0/20	10	0
		溶媒	溶媒	50	10	0	0	0	0	0/10	0	0	0	0	0/10	0	0

陽性対照試験結果(定期的な陽性対照試験として2006年7月4日～8月4日に試験実施)

	群	適用濃度		惹起 (%)	供試動物数	感作反応動物数										陽性率 (%)	
		感作 (%)				24時間					48時間					24時間	48時間
		皮内	局所			皮膚反応評点					皮膚反応評点						
		0	1			2	3	計	0	1	2	3	計				
初回惹起	陽性対照	5	25	12	10	0	2	8	0	10/10	0	5	5	0	10/10	100	100
		溶媒	溶媒	12	5	1	4	0	0	4/5	5	0	0	0	0/5	80	0
再惹起	陽性対照	5	25	6	10	1	3	6	0	9/10	2	5	3	0	8/10	90	80
		溶媒	溶媒	6	5	5	0	0	0	0/5	5	0	0	0	0/5	0	0

*陽性対照物質はOECDガイドラインで推奨されるalpha hexyl cinnamic aldehydeをPEG400で調製

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. 原体-7)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2009年

検体純度： %

供試動物：Wistar HAN CRL:WI (HAN)系ラット、1群雌雄各12匹

投与開始時 約9週齢、体重；雄238.8～285.1g、雌166.2～204.7g

(追加試験) 体重；雌178.6～224.8g

観察期間：14日間

投与方法：検体を0.5% (w/v) メチルセルロース/0.4% (w/v) Tween80水溶液で調製し、100、500および2000mg/kg (雌についてはさらに25および50mg/kg) の用量で、投与容量を10ml/kgとし、単回強制経口投与した。投与前に動物の絶食は行わなかった。

最低用量100mg/kgで、雌に投与に関連した自発運動量および移動運動量の変化が認められたため、雌のみ0、25および50mg/kgの用量で追加試験を行った。

用量設定根拠：

最大影響発現時間の推定；機能観察総合検査 (FOB) および運動量の測定時期は標識化合物を用いた ADME 試験の予備的結果より推定した最大影響発現時間を参考に決定した。これらの試験では標識した検体 2mg/kg を Wistar ラット雌雄に、また雄に 200mg/kg 投与した結果、血漿における Tmax は 2mg/kg 投与の雌雄で 40～60 分、200mg/kg 投与した雄では 1.5 時間後であった。この結果より、FOB は投与後およそ 1 時間経過後、運動量の測定は投与 3.5 時間後までに行った。

観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡率；初回試験については投与後 14 日間、追加試験については投与後 1 または 2 日間、全動物について毎日一般状態及び生死を観察した。また、詳細な身体検査も毎日実施し記録した。

雌雄いずれにも死亡は認められなかった。

500 および 2000mg/kg 群において、雌雄で尿の着色が認められた。雌

では、硬直性歩行、運動失調、運動性の低下、ならびに透明な流涙を認めた。一般状態の変化は尿の着色を除き 0 日目のみに認められ、尿の着色も投与から 1~3 日後に消失した。

100mg/kg では雌雄共に投与に関連した所見は認められなかった。その他認めた一般状態の変化は対照群でも認められるか発生率が低く、用量の関連が見られないなど、投与と関係しない偶発的なものと考えられた。

雌の追加試験では、いずれの群においても投与に関連した影響は認めなかった。

表. 初回試験において認められた一般状態

性	雄				雌				
	用量 (mg/kg)	0	100	500	2000	0	100	500	2000
検査動物数	12	12	12	12	12	12	12	12	12
尿着色	1	0	4	9	1	1	10	11	
眼球突出、左眼	1	0	0	0	0	0	0	0	
硬直性歩行、後肢、両側	0	0	0	0	0	0	4	5	
運動失調	0	0	0	0	0	0	4	5	
運動低下	0	0	0	0	0	0	4	5	
鼻部の着色	0	0	0	0	0	0	2	0	
口の着色	0	0	0	0	0	0	1	0	
涙液分泌、透明	0	0	0	0	0	0	1	5	
脱毛—腹部、右側	0	0	0	0	0	1	0	0	
—前肢、左側	0	0	0	0	0	1	0	0	
—前肢、両側	0	0	0	0	0	1	1	1	

(統計解析は実施されていない)

体重；全動物の体重は FOB の一部として毎週測定した。初回試験については最終屠殺前にも測定した。追加試験については投与 0 日目のみ体重測定を実施した。

投与の影響は認められなかった。

FOB；全ての動物について、初回試験については投与 1 週間前、投与日（投与 1 時間後）、投与後 7 および 14 日目の 4 回、追加試験については投与 1 週間前および投与日（投与 1 時間後）の 2 回、以下の項目を検査した。

ホームケージでの観察

姿勢、立毛、不随意運動（口および顎の反復咀嚼動作、振戦、けいれん等）、歩行異常、発声、活動性低下、反復的頭部上下動、反応亢進

ハンドリング間の観察

ケージからの取り出しやすさ、ハンドリングに対する反応、筋緊張、眼瞼閉鎖、流涙、流涎、鼻汁、着色（涙、鼻、肛門周囲、尿、口）、脱毛、痩せ、咬み跡、眼球突出、歯の破折／不正咬合、爪欠損、脱水、触れたときの体温（冷感）

オープンフィールド観察（2分間）

立ち上がり回数、立毛、呼吸異常、姿勢、不随意運動、常同行動（過剰または反復的な行動）、異常行動、歩行異常、発声、覚醒レベル、排泄量

反射／生理的観察／測定

接近反応、接触反応、聴覚反応、テイルピンチ、通常照明下での瞳孔サイズ、瞳孔反射、正向反射、握力、体重、体温、着地開脚幅

0 日目の 500 および 2000mg/kg 群の雌で、体温が統計学的に有意 ($p < 0.05$) に低かった。また、2000mg/kg 群の雄 2 例で尿の着色が認められた。

その他にも所見が認められ、有意差のあるものもあったが、いずれも投与日に発生したものではないか、おおむね用量との関係が認められず、散発的に発生したもので、所見に異常な点がなかったことから投与によるものとは考えなかった。

追加試験では投与の影響は認められなかった。

表. FOB 観察結果

		雄			
用量 (mg/kg)		対照	100	500	2000
検査動物数		12	12	12	12
投与前週	(H) ケージから 取り出す際の難易:		*		
	極わずかな抵抗	5(42)	0(0)	2(17)	3(25)
	極わずかな抵抗と発声	7(58)	12(100)	10(83)	9(75)
(H) 着色:					
	黄色尿 [1]	0(0)	0(0)	1(8)	0(0)

<続く>

<続き>

雄					
	用量 (mg/kg)	対照	100	500	2000
	検査動物数	12	12	12	12
0日目	(H)着色： 赤色涙液分泌[1]	0(0)	0(0)	1(8)	0(0)
	(H)着色： 黄色尿[1]	0(0)	0(0)	0(0)	1(8)
	黄色尿[2]	0(0)	0(0)	0(0)	1(8)
	(H)その他： 眼球突出[1]	1(8)	0(0)	0(0)	0(0)
7日目	(H)ケージから 取り出す際の難易： 極わずかな抵抗	6(50)	1(8)	7(58)	6(50)
	極わずかな抵抗と発声	6(50)	11(92)	5(42)	6(50)
	(H)その他： 眼球突出[1]	1(8)	0(0)	0(0)	0(0)
14日目	(H)その他： 眼球突出[1]	1(8)	0(0)	0(0)	0(0)
雌					
	用量 (mg/kg)	対照	100	500	2000
	検査動物数	12	12	12	12
投与前週	(H)着色：鼻部赤色[1]	0(0)	1(8)	0(0)	0(0)
	(H)その他：脱毛[1]	0(0)	0(0)	0(0)	1(8)
0日目	(H)その他：脱毛[1]	0(0)	0(0)	0(0)	1(8)
	体温： 平均±SD	38.5±0.3	38.1±0.4	37.7±0.6	37.7±0.8
7日目	(H0)姿勢： 立ち上り	7(58)	9(75)	6(50)	2(17)
	(H)その他：脱毛[1]	0(0)	1(8)	0(0)	1(8)
14日目	(H)その他：脱毛[1]	0(0)	2(17)	1(8)	1(8)

(H)：ハンドリング間の観察

(H0)：ホームケージでの観察

数値は所見を有する動物数およびその発生率% (括弧内) を示す。

程度：[1]=軽度，[2]=中等度から重度

*p<0.05 (ANOVA + Dunnett 検定)

運動量および移動運動量； FOB 検査終了 30 分後、全動物について運動量および移動運動量を個別に測定した。測定は 8 組の赤外線放射装置/検出装置を備えた 8 字迷路を用いて 10 分間の試験を 6 回 (合計 60 分) 実施した。運動量はビームの遮断回数として、また移動運動量はビーム遮断後、別のビームを遮断するまでを測定した。

500 および 2000mg/kg 群の雌雄で、投与 0 日の運動量および移動運動量の低下が統計学的有意 (p≤0.05) となった。対照群に比して運動量

は雄で 42~51%、雌で 88~91%低く、移動運動量は雄で 47~53%、雌で 91~92%低下した。7 および 14 日目では有意な変動は認めなかった。

100mg/kg 群の雌でも投与 0 日の運動量および移動運動量が対照群に比して 39%および 46%と有意 ($p \leq 0.05$) に低かった。7 および 14 日目では有意な変動は認めなかった。

100mg/kg 群の雄では、運動量および移動運動量に投与の影響は認められなかった。

雌について行った追加試験 (25 および 50mg/kg) では、運動量および移動運動量に投与の影響は認めなかった。

運動量

初回試験	性	雄			雌		
	用量(mg/kg)	100	500	2000	100	500	2000
	投与前	+ 4	+ 2	-16	+31	+20	+17
	0 日目	- 8	-42*	-51*	-39*	-88*	-91*
	7 日目	-12	- 9	-12	- 7	+10	+ 1
	14 日目	-11	- 5	-16	+ 7	+19	+27
追加試験	性	雌					
	用量(mg/kg)	25	50				
	投与前	+ 3	+19				
	0 日目	-23	- 2				

N=12

数値は対照群の総運動量カウント値に対する比の増減 (%)

*: $p \leq 0.05$ (ANOVA + Dunnett 検定)

移動運動量

初回試験	性	雄			雌		
	用量(mg/kg)	100	500	2000	100	500	2000
	投与前	+12	+ 5	-16	+23	+20	+21
	0 日目	- 7	-47*	-53*	-46*	-91*	-92*
	7 日目	-15	- 5	-13	-21	+ 3	+ 0.3
	14 日目	-10	+ 1	-16	- 7	+15	+32
追加試験	性	雌					
	用量(mg/kg)	25	50				
	投与前	+ 6	+14				
	0 日目	-23	- 4				

N=12

数値は対照群の総移動運動量カウント値に対する比の増減 (%)

*: $p \leq 0.05$ (ANOVA + Dunnett 検定)

剖検および脳重量； 全生存動物について剖検し、全臓器、体腔、剖面、開口部および外表の検査を実施した。各群雌雄各 6 匹について、ペントバルビタールの腹腔内投与 (50mg/kg) による深麻酔下、左心室から亜硝酸ナトリウム (リン酸緩衝液に溶解) を流した後、Universal 固定液 (1% グルタルアルデヒドおよび 4% EM 級ホルマリン/リン酸緩衝液) で灌流した。各動物から脳および脊髄、両眼 (視神経含む)、末梢神経 (坐骨、脛骨、腓腹)、ガッセル神経節、腓腹筋、両前肢、神経組織または骨格筋の肉眼的病変部を採取し、10% 緩衝ホルマリンに後固定した。脳はホルマリン固定前に重量を測定した。追加試験動物については剖検および組織採取は実施しなかった。

雌雄いずれの投与群にも、投与に関連した肉眼的病変は認められなかった。また、脳重量にも変化は認められなかった。

病理学的検査； 雌雄の対照および 2000mg/kg 群について灌流固定した神経組織の顕微鏡的病理検査を実施した。脳の 8 冠状断面、脊髄 (頸髄、胸髄、腰髄)、ならびに馬尾、眼、視神経、腓腹筋をパラフィンに包埋し、ヘマトキシリン・エオジン (H&E) で染色して検査した。頸膨大および腰膨大の後根神経節 (後根および前根線維を含む) ならびにガッセル神経節、末梢神経組織 (坐骨、脛骨、腓腹) はメタクリル酸グリコール (GMA) に包埋し、改良 Lee 染色法で染色した。2000mg/kg 群で投与に関連した変化が認められなかったため、100 および 500mg/kg 群組織については検査を行わなかった。

投与に関連する影響は認められなかった。

雌雄のラットに、本検体を 25 および 50 (雌のみ)、100、500 および 2000 mg/kg の用量で単回強制経口投与し、投与当日でのみ雌雄 500 および 2000mg/kg 投与で運動量および移動運動量が低下し、尿の着色を認めた。また、雌では硬直性歩行、運動失調、流涙等の一般状態の変化も認めた。雌では 100 mg/kg でも投与当日の運動量および移動運動量が低下した。

雄 100mg/kg、雌 25 および 50mg/kg では投与の影響を認めなかった。

雌雄共に神経組織には病理組織学的変化を認めなかった。

以上より、本試験における総合的な無毒性量は雄で 100mg/kg、雌では 50mg/kg と判断された。

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 (毒性資料No. 原体-8)

「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成12年11月24日付け12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知)の運用についての「4. 試験成績の提出の除外について」(2)⑧ア及びイの規定により下記の理由が該当することから試験を省略した。

急性毒性試験等他の試験成績から、当該農薬の有効成分がコリンエステラーゼ阻害性を有しないと認められる。また、遅発性神経毒性を有する既知の化学物質との化学的構造上の相関等からみて、遅発性神経毒性を有するおそれはないと認められる。

6. 90日間反復経口投与毒性

(1) ラットを用いた90日間反復経口投与毒性試験 (資料 No. 原体-9)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2006年

検体純度: %

供試動物: Wistar Rj: WI系ラット、投与群: 1群雌雄各10匹
投与開始時6週齢、体重; 雄190~218g、雌159~178g

投与期間: 90日間 (2004年10月13日~2005年1月12日)

投与方法: 検体を0 (対照群)、150、7000 および 14000ppm の濃度で飼料に混入し
90日間にわたり随時摂食させた。およそ7週毎に検体を混入した飼料
を調製した。

用量設定根拠:

観察・検査項目および結果:

一般状態および死亡率; 全動物について毎日2回 (週末および休日は1回)、死
亡および瀕死状態について確認し、一般状態については少なくとも毎日
1回記録した。詳細な身体検査は少なくとも週1回実施した。

試験期間を通じて、投与に起因する死亡例および一般状態の変化は認め
なかった。

神経毒性評価; 全生存動物について投与11~12週に投与用量を隠して以下の神
経毒性評価を実施した。

自発運動量 (90分間/セッション、15分/インターバル)

感覚反応: 瞳孔反射、表面立ち直り反射、角膜反射、屈筋反射、聴
覚性驚愕反射、テイルピンチ反応

握力 (前および後肢)

いずれの項目についても、検体投与の影響は認められなかった。

体重；全動物の体重を投与期間中週 1 回測定した。最終屠殺時にも絶食させた動物の体重を測定した。

14000ppm では、雄の体重増加量が 1 週目に統計学的に有意 (22%, $p < 0.01$) に低かった^{注1)}が、その後の体重変化は対照群と同等であった。雌の体重は投与期間を通して低く (多くの測定時点で有意)、試験終了時の平均累積体重増加量は対照群に比して約 12% 低かった (有意差無し)。

7000ppm では、雌の体重が投与期間を通して低く (12 週を除いて有意)、試験終了時の平均累積体重増加量は対照群に比して 17% ($p < 0.01$) 低かった。

150ppm の雌雄^{注2)}、7000ppm の雄では、体重および体重増加量に投与の影響は認められなかった。

注1) 申請者注：一過性のものであるため有害な影響とは考えられなかった。

注2) 申請者注：雄 150ppm で 7 週以降 (10 週を除く)、累積体重増加量に有意な増加がみられたが、用量に関連した傾向がみられないことから偶発性のものと考えられた。

以下に体重の推移 (図) および累積体重増加量 (表) を示す。

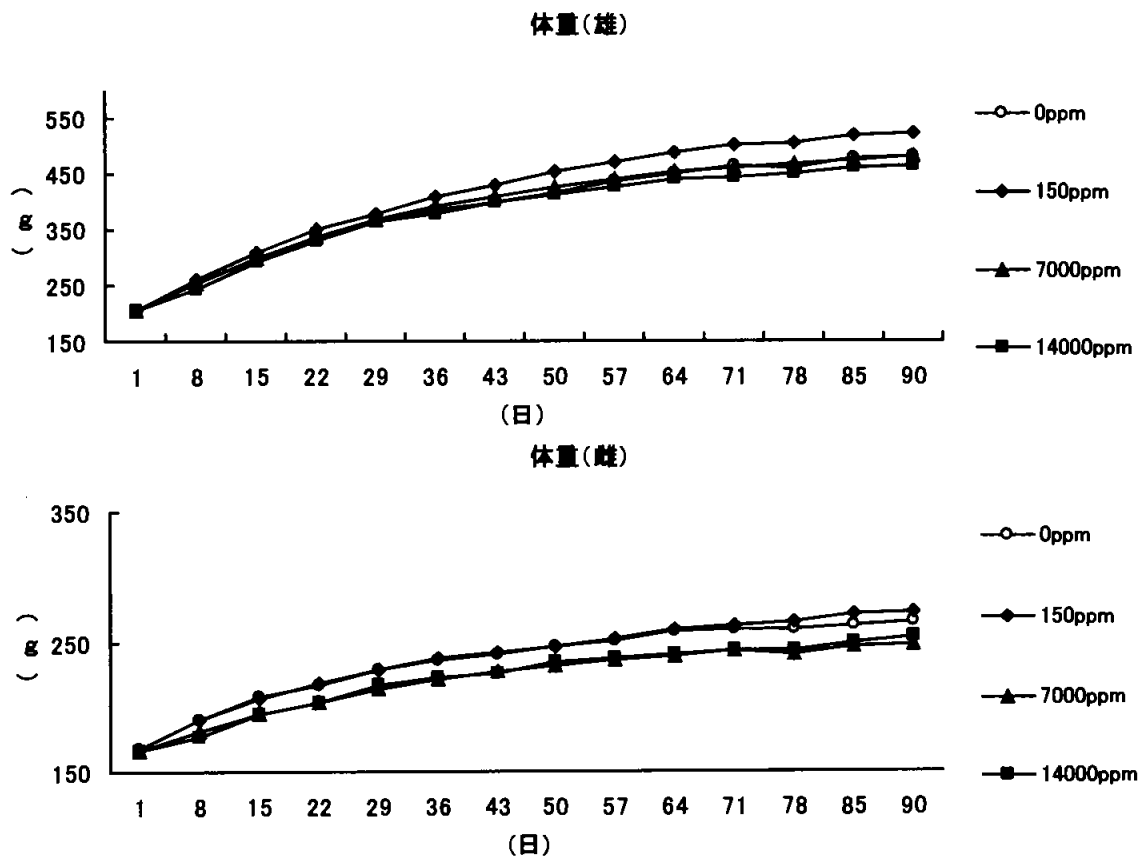


表. 累積体重増加量

性	雄			雌		
	用量 (ppm)	150	7000	14000	150	7000
1 週	110	97	↓78	103	↓64	↓44
2 週	111	98	94	95	↓69	↓70
3 週	114	102	99	101	↓74	↓74
4 週	110	101	101	101	↓78	↓80
5 週	115	103	98	102	↓79	80
6 週	117	104	100	101	↓83	↓81
7 週	↑119	105	99	101	↓83	85
8 週	↑116	101	96	102	↓83	↓84
9 週	↑116	101	97	103	↓80	↓81
10 週	115	99	92	101	↓82	↓83
11 週	↑118	102	95	106	↓81	↓84
12 週	↑116	98	94	111	85	88
13 週	↑115	99	94	108	↓83	88

↑ ↓ ; p<0.05、↓ ; p<0.01

(Bartlett, Kruskal-Wallis または ANOVA + Dunn's Rank Sum test または Dunnett's) 数値は対照群の値を 100 とした場合の比 (%)

摂餌量 ; 全動物の摂餌量を毎週測定した。

雄では全ての投与群において、摂餌量に投与の影響は認められなかった。

雌 14000ppm および 7000ppm では、平均摂餌量が投与期間を通して対照群に比して 5~14% および 8~17% 低く、ほとんどの時点での測定で統計学的に有意であった (p<0.05 または 0.01 : Bartlett, Kruskal-Wallis または ANOVA + Dunn's Rank Sum test または Dunnett's)。

雌 150ppm では摂餌量に投与の影響は認められなかった。

検体摂取量 ; 投与期間中の平均検体摂取量は以下の通りであった。

投与量 (ppm)		150	7000	14000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	9.5	457	949
	雌	11.4	492	1009

眼科学的検査 ; 順化期間中には全動物について、投与期間中は投与 13 週目に対照群および高用量群の全生存動物について眼科学的検査を実施した。

投与に関連する眼科学的所見は雌雄共に認めなかった。

臨床検査：投与 91、92 または 93 日目に全生存動物について一晩絶食の後、イソフルラン吸入麻酔下で後眼窩静脈叢より採血し、血液および凝固検査試料（EDTA およびクエン酸 Na 処理）、生化学的検査試料（ヘパリン処理血漿および血清）とした。

血液学的検査；以下の項目について血液学的検査を実施した。

赤血球数（RBC）、ヘモグロビン（Hb）、ヘマトクリット（Ht）、平均赤血球容積（MCV）平均赤血球ヘモグロビン量（MCH）平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）、網状赤血球数（RET）、白血球数（WBC）および白血球分画、血小板数（PLT）、プロトロンビン時間（PT）

投与に関連した変動は認められなかった。

尚、プロトロンビン時間について、雌の 7000ppm および 14000ppm で軽度の短縮が有意（ $p < 0.01$ ）認められたが、生物学的に意味のあるものではないと考えられた。

対照群と比べ統計学的に有意差の認められた変化を次表に示す。

表. 血液学的検査結果

性	雄			雌		
	150	7000	14000	150	7000	14000
PT					↓91	↓90

↓： $P < 0.01$ （Bartlett test, ANOVA+Dunnett's）

表中の数値は対照群に対する比（%）

生化学的検査；以下の項目について生化学的検査を実施した。

総ビリルビン（TBIL）、グルコース（GLUC）、尿素（UREA）、クレアチニン（CREA）、総コレステロール（CHOL）、トリグリセリド（TRIG）、塩素（CL）、ナトリウム（NA）、カリウム（K）、カルシウム（Ca）、無機リン（PHOS）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ASAT）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALAT）、アルカリホスファターゼ（ALP）、γ-グルタミルトランスフェラーゼ（GGT）、総蛋白（TPRO）、アルブミン（ALB）、グロブリン（GLOB）[#]、アルブミン/グロブリン比（A/G）[#]（[#] 計算により算出）

14000ppm 投与群では、雌雄共に CHOL、GGT および GLOB が有意に高く、A/G 比は有意に低かった。また、雄の TPRO および ALB も有意に高く、ASAT は有意に低かった。雌では、TBIL および ALAT 活性が有意に低かった。

7000ppm 投与群では、雄で TPRO および GLOB が有意に高かった。また、雌では CHOL、GGT および GLOB が有意に高く、TBIL および A/G 比が有意

に低かった。

150ppm 投与群では、雄の A/G 比でのみ有意な低下が認められた。

尚、TBIL、ASAT および ALAT の低下が認められたが、これらの項目は通常、上昇に意味があり、低下は毒性学的に重要な変化とは考えられなかった。また、A/G 比の低下が雄の全投与群、雌の 7000ppm 以上の群で認められた。しかし、いずれも ALB の低下は伴わず、A/G 比の低下の程度も概して大きなものでないことから、検体の影響とは考えられなかった。その他の統計学的に有意な差はいずれもわずかな差で、毒性学的に意味のあるものではないと考えられた。

対照群と比べ統計学的に有意差の認められた変化を次表に示す。

表. 生化学的検査結果

性	雄			雌		
	150	7000	14000	150	7000	14000
ASAT			↓ 67			
ALAT						↓ 57
GGT ¹⁾			↑ 3 ¹⁾		↑ 2 ¹⁾	↑ 3 ¹⁾
CREA			↓ 88			
CHOL			↑ 158		↑ 136	↑ 127
TBIL					↓ 65	↓ 57
GLUC					↓ 87	↓ 83
TPRO		↑ 107	↑ 114			
ALB			↑ 109			
GLOB		↑ 116	↑ 124		↑ 117	↑ 126
A/G	↓ 92	↓ 90	↓ 86		↓ 83	↓ 79
CL			↓ 99			
Ca			↑ 104			

↑ ↓ ; p<0.05、↑↓ ; p<0.01

(Bartlett, Kruskal-Wallis または ANOVA + Dunn's Rank Sum test または Dunnett's)

表中の数値は対照群に対する比 (%)

¹⁾対照群の値が「0」のため平均実測値 (IU/L) を示した。

尿検査 ; 投与 86~87 日目に前夜の尿を全生存動物から採取し、以下の項目について検査した。尿採取中は給餌および給水は中断した。

外観、尿量、pH、屈折率、グルコース、ビリルビン、ケトン体、潜血、蛋白、ウロビリノーゲン、沈渣 (赤血球、白血球、上皮細胞、細菌、円柱、結晶)

投与に関連した変化は認められなかった。

肉眼的病理検査; 投与 91、92 または 93 日目に全生存動物を深麻酔下で屠殺し、全ての主要臓器・組織、体腔について肉眼的病理検査を行った。

14000ppm では、雌雄共に全例で肝の肥大が認められた。

7000ppm でも雄で 8 例、雌で 7 例に肝の肥大が認められた^{註3)}。

表. 肉眼的に認められた肝肥大の発生数

性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	150	7000	14000	0	150	7000
動物数	9	10	10	10	10	9	10	10
肥大	0	0	**8	**10	0	1	**7	**10

** ; p<0.01 (Fisher 検定 / 申請者により実施)

臓器重量 ; 最終計画殺に供された全生存動物を対象として以下の臓器重量を測定した。

副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、卵巣、下垂体、前立腺、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺 (および上皮小体) および子宮 (子宮頸部含む)

14000ppm および 7000ppm 群では雌雄いずれも、肝臓の実重量、対体重比および対脳重量比が統計学的に有意に対照群を上回った。この肝臓重量の変化は用量依存性で、検体投与に関連した変化^{註3)}と考えられた。この他、精巣上体の対体重比に統計学的有意差が 150ppm で認められたが、統計学的に有意ではあっても、用量に依存した変化はみられず、偶発的なもので、投与とは関連しないものと判断された。

対照群と比べ統計学的に有意差の認められた変化を次表に示す。

表. 臓器重量

性	雄			雌			
	用量 (ppm)	150	7000	14000	150	7000	14000
検査動物数	10	10	10	9	10	10	
最終体重	↑ 110				↓ 94		
肝臓	実重量		↑134	↑156		↑118	↑131
	対体重比		↑135	↑164		↑126	↑139
	対脳重量比		↑135	↑158		↑120	↑133
精巣上体	対体重比	↓ 85					

↑ ↓ ; p<0.05、↑ ; p<0.01 (Bartlett, ANOVA + Dunnett's)

表中の数値は対照群に対する比(%)

病理組織学的検査；途中死亡および計画屠殺したすべての動物について、以下の組織を採取し、病理組織学的に検査した。

副腎、大動脈、関節面（大腿-脛骨関節）、骨（胸骨）、骨髄（胸骨）、脳、精巣上体、食道、涙腺、眼および視神経、ハーダー腺、心臓、腸（十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸）、腎臓、咽頭／喉頭、肝臓、肺、リンパ節（顎下、腸間膜）、乳腺、鼻腔、卵巣、膵臓、下垂体、前立腺、坐骨神経、精嚢、骨格筋、皮膚、脊髄（頸部、胸部、腰部）、脾臓、胃、顎下腺（唾液腺）、精巣、胸腺、甲状腺（上皮小体を含む）、舌、気管、膀胱、子宮（子宮頸部を含む）、膾

採取した臓器は10%中性緩衝ホルマリンで固定した。眼、視神経、ハーダー腺、精巣上体および精巣についてはダビドソン固定液に固定した。

咽頭／喉頭、鼻腔、涙腺を除いた全ての臓器についてパラフィン包埋し、対照群および最高投与群について、すべての臓器を薄切して、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した。肝臓、腎臓、肺、甲状腺、下垂体、膵臓および肉眼的異常部位は中間用量についても全動物の標本を作製した。

14000ppm および 7000ppm において、雌雄のほぼ全例の肝臓で小葉中心性肝細胞肥大が認められ、その程度は用量依存性であった。この変化は肝臓の重量増加ならびに肉眼的な肥大に関連していた³⁾。

また、雄では7000ppm および 14000ppm で腎尿細管の硝子滴⁴⁾の発生が対照群と比べて多かった（有意差なし）。

雌雄 14000ppm および雄 7000ppm で甲状腺濾胞上皮細胞肥大が有意に認められ、その重症度は用量依存性と判断された。さらに、雄では数例でコロイドの変化を認めたが統計学的に有意ではなかった。

14000ppm および 7000ppm の雄では下垂体好塩基性細胞肥大の発生がやや多かったが、その発生頻度に用量に関連性がみられず、統計学的な有意差もみられなかった。

14000ppm の雌雄ならびに 7000ppm および 150ppm の雄において、膵臓の外分泌腺単細胞壊死が観察されたが、用量に関連した頻度の増加がみられなかったため、毒性学的に意義のあるものではないと判断された。また、この変化は90日間反復経口投与補足試験（資料No. 原体-10）では確認されなかったため、投与とは関連しないものと考えられた。

この他の病理組織学的所見はいずれも自然発生的で投与に関連しないものと考えられた。

注3) 申請者注：ラット慢性毒性/発がん性併合試験（資料No. 原体-17）の1年間投与7000ppmにおいても同様な肝変化が認められているが、その後3ヶ月間の回復期間で肝への影響は消失し、回復性が認められる事から本試験7000ppmでの肝変化は適応反応ととらえられた。しかし、本試験14000ppm投与については回復性が確認できないことから、毒性影響と考えた。

注4) 申請者注

雄でみられた腎尿細管の硝子滴は、 α 2u-グロブリンの蓄積と関連した雄のラット特有にみられる病変であり、ヒトへのリスクの可能性を示すものではないと考えられる。

主な組織変化の発生数を次の表に示した。

表. 認められた主な組織変化の発生数

性		雄				雌			
用量 (ppm)		0	150	7000	14000	0	150	7000	14000
検査動物数		9	10	10	10	10	9	10	10
肝： 小葉中心性肝細胞肥大	軽微	0	0	3	1	0	0	8	3
	軽度	0	0	7	5	0	0	2	5
	中程度	0	0	0	3	0	0	0	2
	合計	0	0	**10	**9	0	0	**10	**10
甲状腺： 濾胞上皮細胞肥大	軽微	0	1	6	4	0	0	0	5
	軽度	0	0	2	4	0	0	0	1
	合計	0	1	**8	**8	0	0	0	**6
コロイド変化	軽微	0	1	2	2	0	0	0	0
	軽度	0	0	1	1	0	0	0	0
	合計	0	1	3	3	0	0	0	0
下垂体： 好塩基性細胞肥大	軽微	3	2	4	3	0	0	0	0
	軽度	0	0	2	2	0	0	0	0
	合計	3	2	6	5	0	0	0	0
脾臓： 外分泌腺単細胞壊死	軽微	0	4	2	1	0	0	0	4
	軽度	0	1	2	3	0	0	0	0
	合計	0	*5	4	4	0	0	0	*4
腎： 尿細管硝子滴	軽微	2	1	2	3	1	0	0	1
	軽度	0	1	3	3	0	0	0	0
	合計	2	2	5	6	1	0	0	1

* ; p<0.05、** ; p<0.01 (Fisher 検定 / 申請者により実施)

本試験において、投与に起因する死亡例および一般状態の変化は認めなかった。7000ppm 以上の投与で、試験期間を通して体重増加抑制が雌にみられ、雌の摂餌量も低かった。14000ppm 投与群の雄および7000ppm 以上の雌では総コレステロール、 γ -グルタミルトランスフェラーゼおよびグロブリンが有意に高かった。また、雄では7000ppm でグロブリン、7000ppm 以上で総蛋白が有意に高く、14000ppm でアルブミンが有意に高かった。剖検では雌雄14000ppm 以上で肝肥大、肝重量増加が認められ組織学的には小葉中心性肝細胞肥大が認められた。また、病理組織学的検査では、雄7000ppm 以上、雌14000ppm で甲状腺の濾胞上皮細胞肥大が認められた。

150ppm では雌雄共に投与による影響は認めなかった。

以上の結果より、本検体をラットへ90日間混餌投与したところ、無毒性量は雌雄共に150ppm^{註6)} (雄:9.5 mg/kg/日、雌:11.4 mg/kg/日)と結論した。

註6) 申請者注

本試験(投与濃度150、7000および14000ppm)において無毒性量は150ppmであったが、投与濃度50、150および3500ppmで実施したラット90日間反復経口投与補足試験(資料No.原体-10)では、3500ppmで毒性影響を認めないことからラット90日間混飼投与における総合的な無毒性量を3500ppm(雄:228mg/kg/日、雌:260 mg/kg/日[ラット90日間反復経口投与補足試験3500ppm群での1日当たり換算検体摂取量])と結論した。

(2) ラットを用いた 90 日間反復経口投与毒性試験 (補足試験)

(資料 No. 原体-10)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 : 2006 年

検体純度 : %以上

供試動物 : Wistar Rj: WI(IOPS HAN)系ラット、投与群 : 1 群雌雄各 10 匹
投与開始時 6 週齢、体重 ; 雄 205~231g、雌 165~187g

投与期間 : 90 日間 (2005 年 6 月 2 日~9 月 1 日)

投与方法 : 検体を 0 (対照群)、50、150 および 3500ppm の濃度で飼料に混入し 90 日間にわたり随時摂食させた。およそ 7 週毎に検体を混入した飼料を調製した。

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 ; 全動物について毎日 2 回 (週末および休日は 1 回)、死亡および瀕死状態について確認し、一般状態については少なくとも毎日 1 回記録した。詳細な身体検査は少なくとも週 1 回実施した。

投与に関連する死亡および一般状態の変化は認められなかった。
なお、試験 69 日目に動物福祉の見地から 3500ppm の雄 1 例を屠殺した。
この 1 例に認めた一般状態所見や剖検所見は投与に関連しないものと考えられた¹⁾。

¹⁾申請者注 : 屠殺例で認めた一般状態あるいは剖検所見が他の試験動物では認められず、孤立した発生であることから、検体投与に関連しないものと判断される。

体重；全動物の体重を投与期間中週 1 回測定した。最終屠殺時にも絶食させた動物の体重を測定した。

雄ではいずれの用量でも、体重への影響は認めなかった。

雌は 3500 ppm で体重が 4~9 週の間、5 週を除き統計学的に有意 ($p < 0.05$ または $p < 0.01$) に低かった。また、累積体重増加量でも 4、7 及び 8 週では有意 ($p < 0.05$) な低値であった。しかし、150ppm では体重に変動はみられず、体重変化の程度が 3500 ppm と 50 ppm とで同程度で、用量に関連していなかったことから、毒性学的に意味のあるものではないと考えられた。

以下に雌雄の体重推移 (図) および雌の体重および累積体重増加量 (表) を示す。

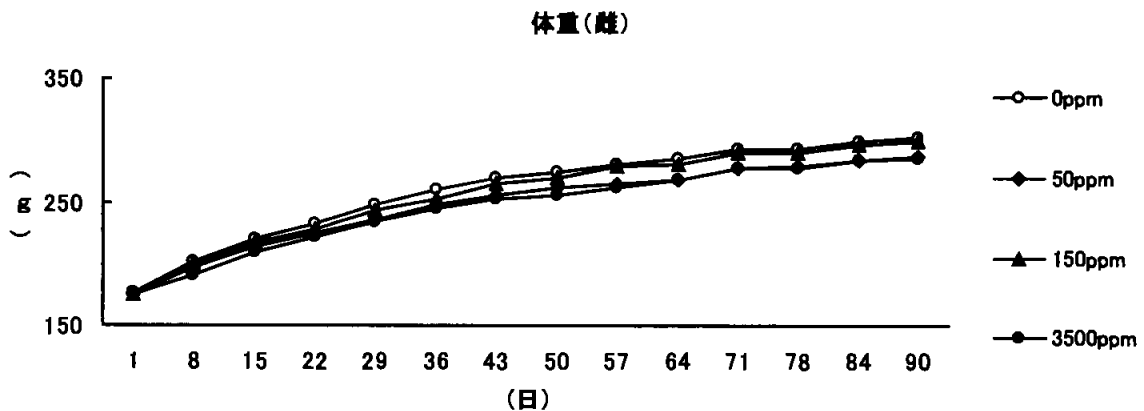
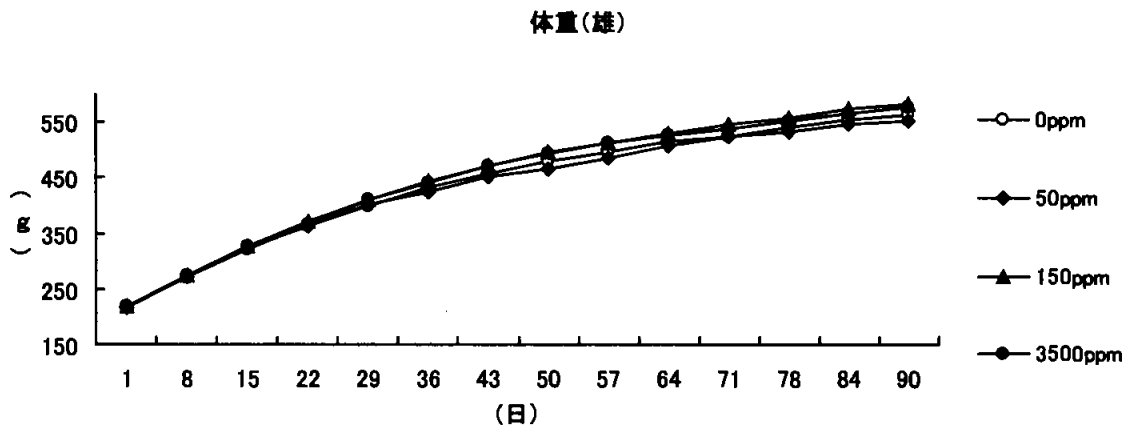


表. 雌の体重および累積体重増加量

雌 用量 (ppm)	体重			累積体重増加量		
	50	150	3500	50	150	3500
1 週	98	99	95	100	104	74
2 週	97	98	95	93	98	81
3 週	97	98	95	93	98	85
4 週	95	98	↓94	87	96	↓82
5 週	95	97	94	90	95	85
6 週	95	98	↓94	88	96	85
7 週	96	99	↓93	91	99	↓83
8 週	↓94	99	↓93	87	100	↓83
9 週	↓94	99	↓94	87	98	86
10 週	95	99	95	89	99	89
11 週	95	99	95	90	99	90
12 週	95	99	95	90	100	89
13 週	95	99	94	90	100	89

↑ ↓ ; p<0.05、↓ ; p<0.01

(Bartlett, Kruskal-Wallis または ANOVA + Dunn's Rank Sum test または Dunnett's)

数値は対照群の値を 100 とした場合の比(%)

摂餌量 ; 全動物の摂餌量を毎週測定した。

雄では摂餌量に変化は認められなかった。

雌 50ppm および 3500 ppm で平均摂餌量が投与期間を通して 5~13%対照を下回り、多くの場合、統計学的に有意であった。しかし、150ppm では摂餌量に変化は無く、摂餌量変化の程度が 3500 ppm と 50 ppm と同程度で、用量に関連していなかったことから、毒性学的に意味のあるものではないと考えられた。

検体摂取量 ; 投与期間中の平均検体摂取量は以下の通りであった。

投与量 (ppm)		50	150	3500
検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	3.2	9.3	228
	雌	3.7	11.4	260

生化学的検査: 投与 91、92 または 93 日目に全生存動物について一晩絶食の後、イソフルラン吸入麻酔下で後眼窩静脈叢より採血し、生化学的検査用試料 (ヘパリン処理血漿および血清) とした。

以下の項目について生化学的検査を実施した。

総ビリルビン(TBIL)、グルコース(GLUC)、尿素(UREA)、クレアチニン(CREA)、総コレステロール(CHOL)、トリグリセリド(TRIG)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALAT)、アルカリホスファターゼ(AP)、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)、アミラーゼ(AMYL)、リパーゼ(LIP) (以上は血漿試料を用いて測定)、総蛋白(TPRO)、アルブミン(ALB) (血清試料)、グロブリン(GLOB)、アルブミン/グロブリン比(A/G) (計算により求めた)

なお、アミラーゼおよびリパーゼについては別の90日間反復経口投与毒性試験(資料No. 原体-9)で脾臓に組織所見が認められたことから測定した。

いずれの測定項目も雌雄共に統計学的有意差はなく、毒性学的に意味のある変化は認められなかった。

また、アミラーゼおよびリパーゼ活性にも変動はなく、脾臓に関連した変化は認めなかった。

表. アミラーゼおよびリパーゼ測定値の概略を次表に示す。

性	雄			雌		
	用量 (ppm)	50	150	3500	50	150
AMYL	94	89	100	101	112	99
LIP	100	91	85	111	104	114

表中の数値は対照群に対する比(%)

(Bartlett, Kruskal-Wallis または ANOVA + Dunn's Rank Sum test または Dunnett's)

肉眼的病理検査; 投与 91、92 または 93 日目に全生存動物を深麻酔下(イソフルラン吸入)で屠殺し、全ての主要臓器・組織、体腔について肉眼的病理検査を行った。

3500ppm 雌で、投与に関連すると考えられる肝の肥大が認められた。他に認められた所見は偶発的で投与に関連しないものと考えられた。

表. 認められた肝肥大の発生数

性別	雄				雌			
	用量 (ppm)	0	50	150	3500	0	50	150
動物数	10	10	10	9	10	10	10	10
肥大	4	1	3	5	0	0	1	*4

*; p<0.05 (Fisher 検定 / 申請者により実施)

臓器重量；最終計画屠殺に供された全生存動物を対象として以下の臓器重量を測定した。

脳、腎臓、肝臓、下垂体、甲状腺（上皮小体含む）

絶食後の最終屠殺時体重は雌の 3500ppm で対照群に比して有意 ($p < 0.05$) に低かった。

3500ppm では、雌雄共に肝臓の実重量および対体重比、さらに雄では対脳重量比が統計学的に有意に対照値を上回った。

雄の脳重量対体重比で 50ppm および 3500ppm で有意な増加が認められたが、用量に関連性がなく、偶発的なものと判断された。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた変化を次表に示す。

表. 臓器重量

性		雄			雌		
用量 (ppm)		50	150	3500	50	150	3500
検査動物数		10	10	9	10	10	10
最終体重							↓ 94
肝臓	実重量			↑ 115			↑ 109
	対体重比			↑ 113			▲ 116
	対脳重量比			↑ 115			
脳	対体重比	↑ 108		▲ 108			

↑ ↓ ; $p < 0.05$, ▲ ; $p < 0.01$ (Bartlett, ANOVA + Dunnett's)

表中の数値は対照群に対する比 (%)

病理組織学的検査；全ての動物について、以下の組織を採取した。

肝臓、腎臓、甲状腺（上皮小体を含む）、脾臓、下垂体、その他肉眼的に異常を認めた組織

採取した臓器は 10% 中性緩衝ホルマリンで固定した。

全動物の採取した臓器についてパラフィン包埋・薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した。

3500 ppm では、雄 9 例中 2 例、雌 10 例中 5 例の肝臓で、わずかな程度の小葉中心性肝細胞肥大がみられた。これは肝重量増加と関連していたが、適応反応と考えられるため、有害影響とは考えられなかった。^{※2)}

また、雄 9 例中 3 例の腎で尿細管硝子滴が認められたが、硝子滴腎症は近位尿細管への $\alpha 2u$ -グロブリンの蓄積と関連した雄のラットにみられる病変であり、ヒトへのリスクの可能性を示すものではないと考えられ

る。

雌雄共に対照を含めた全ての群の1~数例で、膵臓外分泌細胞の単細胞壊死がみられ、3500 ppm 群雄では発生率が幾分高かった。しかし、この変化は対照群でも観察され、その程度は軽微ないし軽度であり、毒性的に意味のあるものではないと考えられた。(申請者注：統計学的な有意差も伴わなかった。)

その他に認められた所見は偶発的で、投与に関連しないものと考えられた。

表. 認められた主な組織変化の発生数

性		雄				雌			
用量 (ppm)		0	50	150	3500	0	50	150	3500
検査動物数		10	10	10	9	10	10	10	10
肝： 小葉中心性肝細胞肥大	軽微	0	0	0	2	0	0	0	*5
腎： 尿細管硝子滴	軽微	0	0	0	3	0	0	0	0
膵臓： 外分泌腺単細胞壊死	軽微	2	2	3	3	2	1	1	1
	軽度	0	1	0	1	1	0	0	1
	合計	2	3	3	4	3	1	1	2

* ; p<0.05 (Fisher 検定 / 申請者により実施)

3500ppm では、剖検で雌に肉眼的に肝臓肥大が観察された。雌雄共に肝重量が軽度に増加し、組織学的検査でわずかな程度の小葉中心性肝細胞肥大を認めたが、適応反応であり有害影響ではないと考えられた^{註3)}。

150 および 50ppm では投与に関連する影響は雌雄いずれにおいても観察されなかった。

以上の結果より、本検体をラットへ 90 日間混餌投与したところ、無毒性量は雌雄共に 3500ppm (雄：228mg/kg/日、雌：260mg/kg/日) と結論した^{註4)}。

註2、註3、註4) 申請者注

3500ppm での肝重量の増加を伴った軽微な小葉中心性の肝細胞肥大と同様な肝の変化がラット慢性毒性/発がん性併合試験(資料 No. 原体-17) の1年間投与の 7000ppm においても認められている。しかし、その後3ヶ月間の回復期間で肝への影響は消失し、回復性が認められる事からこの肝での変化は適応反応ととらえられた。この事から、本試験 3500ppm でのラットの肝に対する影響は投与に対する適応反応ととらえられ、3500ppm は無毒性量と判断した。

(3) イヌを用いた 90 日間反復経口投与毒性試験

(資料 No. 原体-11)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年： 2008 年

検体純度： %

供試動物： ビーグル犬 1 群雌雄各 4 匹

投与開始時 約 8~9 ヶ月齢、体重；雄 7.8~11.0kg、雌 6.1~8.8kg

投与期間： 90 日間 (2007 年 3 月 13 日~6 月 14 日)

投与方法： 検体を 0 (対照群)、180、1800 および 18000ppm の濃度で飼料に混入し、90 日間にわたり随時摂食させた。およそ 6~7 週毎に検体を混入した飼料を調製した。

用量設定根拠；

観察・検査項目および結果：

一般状態および死亡率；全動物について毎日一般状態および生死を観察した。

投与に起因する一般状態の変化および死亡は認めなかった。

身体検査；毎週 1 回、被毛・皮膚、眼、耳、歯、歯茎、粘膜、直腸温、歩行、姿勢、一般行動、心拍・呼吸数、腹部触診、外性器、乳腺等に関する詳細な身体検査を行った。また、心理的状态 (覚醒程度、行動の変化)、姿勢、歩行および行動機能、筋緊張、姿勢反応 (踏み直し- 触覚性、視覚性、固有位置感覚、跳び直り反応、手押し車反応)、脊髄反射 (膝蓋反射、屈筋反射、骨盤肢および上肢反射、肛門周囲反射、皮筋反射)、感覚 (表面痛、深部痛)、脳神経反射 (頭部の一般的検査、直接または間接対光反射、眼瞼- 瞬目反射、角膜反射、脅威) についても評価した。

いずれの項目にも変化は認めなかった。

体重；毎週 1 回、給餌前に体重を測定した。

18000ppm では投与第 1 週目に平均体重が雄で 0.1kg 低下し、雌では

0.1kg の増加に留まった。(対照群は雄雌で各 0.1kg および 0.2kg の増加) これは、雌雄で摂餌量が少なかったことと一致していた。その後、雄の体重は対照群と同様に推移したが、雌では数週間に亘り、体重増加および体重値が対照群よりも低かった ($p < 0.05$ 又は $p < 0.01$)。その結果、雌の総体重増加は 0.3 kg に留まり、対照群の 1.7kg に比して有意に低かった。また、最終 (91 日目) 平均体重も 7.7 kg と対照群の 9.8 kg に比して有意に低かった。

1800ppm および 180ppm では、体重に投与の影響は認めなかった。

以下の表に平均最終体重および平均体重増加量を示す。

表. 平均最終体重および平均体重増加量

性	雄				雌			
	0	180	1800	18000	0	180	1800	18000
用量 (ppm)								
最終 (91 日目) 体重								↓79
体重増加量(kg) 1-13 週	0.8	1.1	0.9	0.6	1.7	1.2	1.3	↓0.3

↓ ; $p < 0.05$ ↓ ; $p < 0.01$

(Bartlett, Kruskal-Wallis または ANOVA + Dunn' s Rank Sum test または Dunnett' s) 表中の最終体重の数値は対照群に対する比 (%)

摂餌量 ; 全動物の摂餌量を毎日測定した。

18000ppm では、投与 1 週目の摂餌量が対照群に比して雄で 39%、雌で 35%低かった (有意差なし)。その後、雄の摂餌量は対照と同様に推移したが、雌では試験期間を通して低いままであった (7 および 11 週のみ有意)。1~13 週目全体では、雌の平均摂餌量は対照を 21%下回った。1800ppm および 180ppm では雌雄共に、試験期間を通して摂餌量に投与の影響は認めなかった。

以下の表に平均摂餌量を示す。

表. 平均摂餌量

性	雄			雌		
	180	1800	18000	180	1800	18000
用量 (ppm)						
1 週*	100	99	61	96	93	65
7 週*	100	100	89	98	98	↓67
11 週*	100	100	96	96	98	↓83
1~13 週	100	100	92	96	98	79

↓ ; $p < 0.05$ ↓ ; $p < 0.01$

*(Bartlett, Kruskal-Wallis または ANOVA + Dunn' s Rank Sum test または Dunnett' s) 表中の最終体重の数値は対照群に対する比 (%)

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は以下の通りであった。

投与量(ppm)		180	1800	18000
検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	5.6	55.7	532
	雌	6.1	63.1	568

眼科学的検査；順化期間中および投与終了時に全生存動物について眼科学的検査を実施した。

投与の影響は認められなかった。

臨床検査；投与開始前、投与7週および投与12～13週に全動物について頸静脈より採血し、血液および凝固検査試料(EDTAおよびクエン酸Na処理)、生化学的検査試料(ヘパリン処理血漿および血清)とした。

血液検査；以下の項目について血液学的検査を実施した。

赤血球数(RBC)、血色素量(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、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)、網状赤血球数(RET)、白血球数(WBC)、白血球百分比(Differential.C)、血小板数(PLT)、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)

18000ppmでは、雌で12～13週目に、PLTがわずかに高値($P \leq 0.01$)であった。この群の試験開始前の平均値からの増加は、同時期における対照群での5%増加に対し、30%増加($P \leq 0.01$)した。

その他、統計学的に有意な変化が少数認められたが、変化の程度は少なく、また偶発的であることから、投与と関連するものではないと考えられた。

統計学的に有意差の認められた変化ならびに血小板数の変動を次表に示す。

表. 血液学的検査結果

性	雄						雌					
	180		1800		18000		180		1800		18000	
検査時期(週)	7	12-13	7	12-13	7	12-13	7	12-13	7	12-13	7	12-13
PT						↑108						↑108
MCV										↑104		
RET								↑220				
PLT												▲146

↑↓: $P \leq 0.05$ 、▲▼: $P \leq 0.01$ (Bartlett test, ANOVA+Dunnett's)

表中の数値は対照群に対する比(%)

表. 血小板数 (10⁹/L) の変動 : (投与開始前の値に対する比(%))

性	雄				雌			
	0	180	1800	18000	0	180	1800	18000
投与開始前	394	350	238	290	333	354	343	393
7 週	383 (-3%)	361 (+3%)	354 (+49%)	319 (+10%)	354 (+6%)	342 (-3%)	388 (+13%)	422 (+7%)
12-13 週	401 (+2%)	412 (+18%)	363 (+53%)	360 (+24%)	351 (+5%)	376 (+6%)	400 (+17%)	↑512 (+30%)

↑ : P<0.01 (Bartlett test, ANOVA+Dunnett's)

生化学的検査 ; 以下の項目について生化学的検査を実施した。

総ビリルビン(TBIL)、グルコース(GLUC)、尿素(UREA)、クレアチニン(CREA)、総コレステロール(CHOL)、トリグリセリド(TRIG)、塩素(CL)、ナトリウム(NA)、カリウム(K)、カルシウム(CA)、無機リン(PHOS)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALAT)、γ-グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)、アルカリホスファターゼ(ALP)、総蛋白(TPRO)、アルブミン(ALB)、グロブリン(GLOB) #、アルブミン/グロブリン比 (A/G 比) # (# 計算により算出)

18000ppm では雌雄で ALP の有意な上昇が認められた。雌雄とも ALB が有意に低下し、結果として、A/G 比の有意な低下も認められた。さらに、雄では TPRO のわずかな低下と CHOL の低下が有意であった。雌では GGT がわずかに有意に上昇した。

12~13 週目に、雄の全ての投与群で TBIL に、また 18000 ppm 群雌の UREA に統計学的に有意な低値が観察されたが、用量との関連性がなく、また、個体値の変動^{註1)}を考慮すると、投与とは関連しないものと考えられた。

註1) 申請者注 :

実測値の群変動幅 (最高-最低値の差) は雄の TBIL (umol/L) では対照で 1.0、投与群で 0.4~0.5。雌の UREA (umol/L) では対照 2.84、投与群で 0.15~1.93。雄の TBIL、雌の UREA 共に概して対照群の値のバラツキが大きく、投与群では変動が少ない結果となっている。また TBIL、UREA は減少よりも増加した場合の方が毒性的な意義のあるものと考えられることから、雄の TBIL および雌の UREA の低値も毒性的に意義のあるものとは思われない。

対照群と比べ統計学的に有意差の認められた変化を次表に示す。

表. 生化学的検査結果

性	雄						雌					
	180		1800		18000		180		1800		18000	
検査時期 (週)	7	12-13	7	12-13	7	12-13	7	12-13	7	12-13	7	12-13
ALP					↑362	↑431					↑381	↑482
TPRO					↓90	↓88						
ALB					↓85	↓82					↓88	↓88
A/G						↓85					↓83	
TBIL		↓20		↓40		↓30						
CHOL						↓67						
GGT											↑1 ¹⁾	↑4 ¹⁾
UREA												↓79

↑ ↓ ; p<0.05、↑↓ ; p<0.01

(Bartlett, Kruskal-Wallis または ANOVA + Dunn's Rank Sum test または Dunnett's)

表中の数値は対照群に対する比(%)

¹⁾対照群の値が「0」のため実測値 (IU/L) を示した。

尿検査 ; 投与前、投与 36 および 88 日目に全動物について一晚蓄尿して尿を採取し、以下の項目を検査した。採尿時に飲水の制限は行わなかった。

外観、尿量、屈折率、pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン、沈渣

雌雄共にいずれの投与群にも変動は認められなかった。

臓器重量 ; 投与 92~95 日に全動物を深麻酔下で計画屠殺し、以下の臓器重量を測定し、対体重比および対脳重量比も算出した。

肝臓、心臓、脾臓、胸腺、腎臓、精巣、精巣上体、前立腺、卵巣、子宮 (頸部含む)、脳、副腎、下垂体、甲状腺 (上皮小体含む)

18000ppm では雌で肝対体重比が有意に増加し、雄では肝実重量、肝対体重比および肝対脳重量比の有意な増加が認められた。さらに雄では副腎の実重量および対脳重量比も有意に高かった。これらの変化は病理組織学的変化と関連しており、投与に関連するものと考えられた。

1800 ppm 雄でも肝の対脳重量比が有意に高く、また、病理組織学的変化と関連しており、投与に関連するものと考えられた。

前立腺の実重量、対体重比および対脳重量比は全群とも対照より有意に低値であった。しかし、用量と関連がなく、病理組織学的変化との関連

も認められなかったことから、意義のあるものではないと考えられた。

統計学的有意差を認めた臓器重量の変化を次の表に示した。

表. 臓器重量

性		雄			雌		
用量 (ppm)		180	1800	18000	180	1800	18000
検査動物数		4	4	4	4	4	4
最終体重							↓ 78
肝臓	実重量			↑ 136			
	対体重比			↑ 137			↑ 150
	対脳重量比		↑ 123	↑ 140			
前立腺	実重量	↓ 56	↓ 59	↓ 53			
	対体重比	↓ 52	↓ 56	↓ 54			
	対脳重量比	↓ 54	↓ 61	↓ 55			
副腎	実重量			↑ 150			
	対脳重量比			↑ 155			

↑ ↓ ; p<0.05、↑↓ ; p<0.01

(Bartlett, Kruskal-Wallis または ANOVA + Dunn's Rank Sum test または Dunnett's)

表中の数値は対照群に対する比 (%)

肉眼的病理検査 ; 計画屠殺した全ての動物について剖検を行った。

雌雄共にいずれの投与群にも特筆すべき所見は認められなかった。

病理組織学的検査 ; 全ての動物について以下の組織を採取し、病理組織学的検査を実施した。

舌、顎下腺 (唾液腺)、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、肝臓、膵臓、胆嚢、気管、肺、咽頭、喉頭、大動脈、リンパ節 (咽頭後、腸間膜)、心臓、骨髄 (胸骨)、脾臓、胸腺、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、卵巣、乳腺、子宮 (頸部含む)、卵管、膣、脳、脊髄 (頸部、胸部、腰部)、坐骨神経、眼球、視神経、下垂体、副腎、上皮小体、甲状腺、骨 (胸骨)、骨格筋、皮膚、関節面 (大腿骨頭)、肉眼的異常部位

採取した臓器は 10%中性緩衝ホルマリンで固定した。眼、視神経、精巣上体および精巣についてはダビドソン固定液に固定した。

咽頭/喉頭を除いた全ての臓器についてパラフィン包埋して薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した。

18000 ppmにおいて、雌雄の全動物で肝臓に軽微ないし軽度の汎小葉性肝細胞肥大（びまん性）がみられた。雄4例中2例、雌4例中1例に肝細胞内の微量な好酸性物質と軽微な門脈周囲性単細胞壊死が認められた。

また、副腎では、軽度のびまん性皮質肥大／過形成が雄4例中2例で認められた。副腎の病理組織学的変化の重症度は軽微で、他には副腎の形態変化を伴っていなかったが、副腎重量が統計学的に有意に高かったため、投与に関連するものと考えられた。

1800ppmでは、軽微な汎小葉性肝細胞肥大が雄4例中1例、および雌4例中3例認められた。

その他、認めた病理組織学的所見は、偶発的かこの齢のビーグル犬で通常観察される範囲内の変化であると考えられた。

認められた主な組織所見を次の表に示した。

表. 主な組織変化の発生数

性		雄				雌			
		0	180	1800	18000	0	180	1800	18000
用量 (ppm)		0	180	1800	18000	0	180	1800	18000
検査動物数		4	4	4	4	4	4	4	4
肝： 汎小葉性肝細胞肥大 (びまん性)	軽微	0	0	1	0	0	0	3	2
	軽度	0	0	0	4	0	0	0	2
	合計	0	0	1	4*	0	0	3	4*
肝細胞内好酸性物質 (びまん性)		軽微	0	0	2	0	0	0	1
門脈周囲性単細胞壊死 (多巣性)		軽微	0	0	2	0	0	0	1
副腎： 皮質肥大／過形成 (びまん性)		軽度	0	0	2	0	0	0	0

* ; p<0.05 (Fisher 検定 / 申請者により実施)

本検体をビーグル犬に13週間混餌投与した結果、一般状態に変化はなく死亡例も認めなかった。

18000ppmでは雌の体重増加量および摂餌量が低かった。また、雌では血小板数が高値であった。雌雄共にアルカリホスファターゼ活性が高く、総コレステロールは低かった。また、雌雄ともアルブミン濃度が低値でアルブミン／グロブリン比もまた低下した。雄の総タンパク濃度はやや低く、雌ではγ-グルタミルトランスフェラーゼ活性がわずかに上昇した。雌雄で肝重量が増加し、雄では副腎の重

量も増加した。鏡検では、雌雄で肝細胞肥大や単細胞壊死、肝細胞内の微量な好酸性物質などが認められ、雄の副腎で皮質肥大／過形成が観察されるなど、肝臓および副腎に投与関連性の変化が認められた。

1800ppm でも雌雄で肝細胞肥大が認められ、雄では肝の対脳重量比の増加が認められた。

180ppm では、雌雄いずれにも投与に関連した影響は認められなかった。

以上の結果より、本検体のビーグル犬に対する 13 週間混餌投与の無毒性量は雌雄共に、180ppm (雄：5.6 mg/kg 体重/日、雌：6.1 mg/kg 体重/日) と結論した。

7. 21日間反復経皮投与毒性

21日間反復経皮投与毒性試験

(毒性資料No. 原体-12)

「農薬の登録申請に係る試験成績について」（平成12年11月24日付け12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知）の運用についての「4. 試験成績の提出の除外について」（2）⑩イの規定により下記の理由が該当することから試験を省略した。

急性経皮毒性試験の結果から、他の暴露経路による急性毒性に比べ、著しく強い経皮毒性が認められない。

8. 90日間反復吸入毒性

ラットを用いた90日間反復吸入毒性試験

(毒性資料No. 原体-13)

「農薬の登録申請に係る試験成績について」（平成12年11月24日付け12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知）の運用についての「4. 試験成績の提出の除外について」（2）⑪イの規定により下記の理由が該当することから試験を省略した。

急性吸入毒性試験の結果から、著しく強い吸入毒性が認められないため。

9. 反復経口投与神経毒性

ラットを用いた反復経口投与神経毒性試験

(資料 No. 原体-14)

試験実施機関：

[GLP]

報告書作成年：2009 年

検体純度： %

供試動物：Wistar Han Crl:WI (HAN)系ラット、1群雌雄各12匹

投与開始時 約8週齢、体重；雄228.5~291.1g、雌147.4~181.6g

投与期間：90日間

投与方法：検体を0、250、2000および8000ppmの濃度で飼料に混和し90日間混餌投与した。飼料は毎週調製した。

用量設定根拠；90日間反復経口投与毒性試験（資料 No. 原体-9）（濃度0、

観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡率；全動物について毎日2回（週末および休日は1回）一般状態及び生死を観察した。また、詳細な身体検査を毎週実施した。

投与に関連する一般状態の変化および死亡は認められなかった。

体重；全動物の体重を毎週1回測定した（FOBでの体重は別途測定）。屠殺日には最終体重を測定した。

8000ppm群において、雄では28～49日目の体重が有意に低く、21日目、56日目およびその後は試験終了まで軽度の低下傾向（最高6%）が認められた。しかし、総体重増加量はわずかに低かったが有意差は認めなかった。雌では試験期間を通して、体重が有意に低く、総体重増加量も有意に低かった。

2000ppm以下の群では、雌雄とも、体重に影響は認めなかった。

体重変化（図）および総体重増加量（表）を以下に示した。

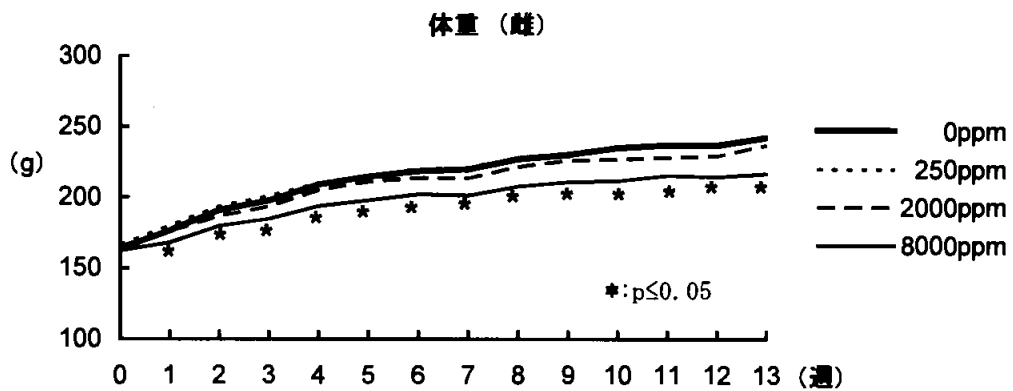
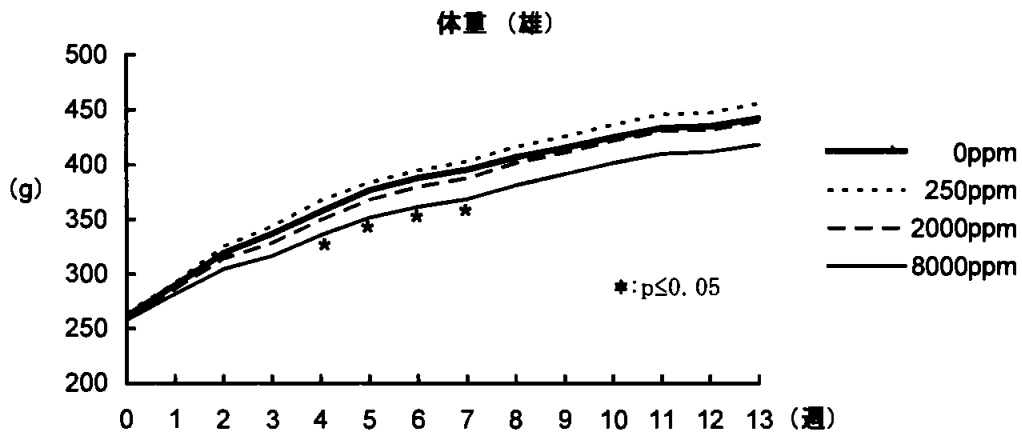


表. 総体重増加量

性	雄			雌			
	用量 (ppm)	250	2000	8000	250	2000	8000
総体重増加量 (0～91日目)		106	100	89	96	93	↓ 71

↓ : p ≤ 0.05 (Dunnett's test)

表中の数値は対照群に対する割合 (%)

摂餌量；摂餌量を毎週1回測定した。

8000ppm 群において、雄では14～42日目の摂餌量が対照群に比して低く、21および35日目では統計学的に有意となった。雌では、14日目以降、有意に対照を下回った。

2000ppm 群では雌で14日目以降、対照群に比して摂餌量が低く、21、56および84日目を除いて有意であった。

250ppm 群では雌で28日目以降、対照群に比して摂餌量がやや低く、77および84日目は有意に低かった。

250および2000ppmの雌で認めた摂餌量の変動は、体重への影響は認められなかったことから、有害影響とは考えられなかった。なお、250および2000ppmの雄では、投与による摂餌量への影響は認めなかった。

表. 摂餌量

性	雄			雌			
	用量(ppm)	250	2000	8000	250	2000	8000
7日目							
14日目					↓91	↓86	
21日目			↓90				↓85
28日目					↓88	↓84	
35日目			↓91		↓89	↓85	
42日目					↓89	↓81	
49日目					↓91	↓79	
56日目							↓82
63日目					↓90	↓83	
70日目					↓89	↓81	
77日目				↓92	↓89	↓82	
84日目				↓91		↓80	
91日目					↓91	↓78	

↓ : p<0.05 (Dunnett's test)

表中の数値は対照群に対する割合(%)

検体摂取量；全投与期間にわたる平均検体摂取量は以下のとおりであった。

用量(ppm)		250	2000	8000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	16.02	126.1	516.0
	雌	19.88	155.9	608.8

機能観察総合検査 (FOB)；全生存動物について、投与前週、投与2、4、8および13週目の5回実施した。以下の項目を検査した。

ホームケージでの観察

姿勢、立毛、不随意運動、歩行異常、発声、運動量低下、反復的頭部上下動、反応性亢進

ハンドリング間の観察

ケージから取りだし時の難易、ハンドリングに対する反応、筋緊張、眼瞼閉鎖、流涙、流涎、鼻汁、着色(涙、鼻、肛門周囲、尿、口)、脱毛、痩せ、咬み跡、眼球突出、歯の破折/不正咬合、爪欠損、脱水、体温(触診による)

オープンフィールド観察 (2 分間)

立ち上がり回数、立毛、呼吸異常、姿勢、不随意運動、常同行動、異常行動、歩行異常、発声、覚醒レベル、排泄量

反射/生理的観察/測定

接近反応、接触反応、聴覚反応、テイルピンチ、通常照明下での瞳孔サイズ、瞳孔反射、正向反射、握力、体重、体温、着地開脚幅

8000ppm 群において、雄の体重が 4 および 8 週目に統計学的に有意に減少(対照に対して 91 および 93%)し、13 週目でもやや低かった(同 94%)。

雌では体重が全ての検査時期で有意に減少(同 90~93%)した。

2000 および 250ppm 群では雌雄とも、検体に関連する所見は認められなかった。

8000ppm 群雄において、8 週目のケージから取り出す際の容易さに差を認め、13 週目の接近反応試験では無反応な動物を認めなかった。

2000ppm 群雄 4 週目で後肢握力が対照を上回った。

250ppm 雄の 4 週目、ケージから取り出す際の容易さに差を認め、オープンフィールドへの尿溜まり数が多かった。

これらの所見は対照に比して有意ではあったが、用量との関係がないか、雌雄のいずれかにのみ認め、全般的に異常値とは思われず、投与に関係するものとは考えられなかった。

FOB の結果を次の表に示した。

表. FOB 結果の所見数 (雄)

		雄			
用量 (ppm)		0	250	2000	8000
検査動物数		12	12 ^{a)}	12	12
投与前	(H) - 脱毛	0	0	1	0
2週目	(H) - 着色 : 赤色、鼻部	0	0	0	1
	(H) - 脱毛	0	0	1	0
4週目	(H) - ケージから出す際の難易 : 極わずかな抵抗	10	*	10	7
	極わずかな抵抗と発声	2	7	2	5
	(H) - 脱毛	0	0	1	0
	排尿 - 尿溜まり数 平均±SD	0.4±0.9	↑ 2.5±2.3	1.0±1.3	0.3±0.7
	反射 / 生理学的観察 - 後肢握力#	100	101	↑ 115	98
	体重#	100	99	95	↓ 91
8週目	(H) - ケージから出す際の難易 : 極わずかな抵抗	7	3	7	*
	極わずかな抵抗と発声	5	8	5	11
	(H) - 脱毛	0	0	1	1
	(H) - 痂皮	1	0	0	0
	体重#	100	102	98	↓ 93
13週目	(H) - 脱毛	1	1	1	0
	反射 / 生理学的観察 - 接近反応 :				*
	無反応	4	6	5	0
	僅かな反応	8	5	7	12
	体重#	100	103	99	94

(H) : ハンドリングでの観察

数値は対照群に対する割合 (%)

* / ↑ ↓ : p < 0.05 (Dunnett's test)

^{a)} 投与前期間に1例死亡した為、投与開始時からは11匹。

表. FOB結果の所見数 (雌)

		雌			
		0	250	2000	8000
用量 (ppm)					
検査動物数		12	12	12	12 ^{b)}
投与前	(H) - 着色 : 黄色、尿	0	0	1	0
2週目	(H) - 着色 : 赤色、鼻部	0	0	0	1
	(H) - 脱毛	0	0	1	1
	体重#	100	102	98	↓ 93
	(H) - 脱毛	0	0	1	1
4週目	体重#	100	101	99	↓ 93
	(H) - 脱毛 :	0	0	1	1
8週目	体重#	100	100	99	↓ 92
	(H) - 脱毛	0	0	0	1
13週目	(H) - 痂皮	0	1	0	0
	(H) - 浮腫 (生殖器周囲部)	0	0	1	0
	体重#	100	100	96	↓ 90
	(H) - 脱毛	0	0	0	1

(H) : ハンドリングでの観察

数値は対照群に対する割合 (%)

↓ : $p < 0.05$ (Dunnett's test)

^{b)} ケージ交換時の手違いがあった事から1例を屠殺し、投与第1週からは11匹。

運動量および移動運動量 ; FOB 検査と同日に FOB 検査終了後、全動物について赤外線ビーム放射装置と検出器を備えた 8 字型迷路を用いて運動量 (ビームを遮断した回数を記録) および移動運動量 (連続して別のビームを遮断した回数) を測定した。測定は 10 分間で 6 回、合計 60 分間実施した。

投与に関連した運動量および移動運動量の変化は認められなかった。

運動量および移動運動量はいくつかの測定時点で試験施設における正常な変動範囲と考えられる対照群に対して ±20% を外れる測定値が認められたが、統計学的有意差はなく^{註1)}、用量との関連性も対照群との差に一貫性もなかった (例 : 雄では各濃度のさまざまな時期に対照を上回り (+20% 以上)、高用量群の雌では 8 週目のみ対照を下回った (-20% 以上)) ことから投与の影響とは考えられなかった。

註1) 申請者注

運動量および移動運動量で、雄 4 週でのみ 2000ppm 以上で有意差 ($p \leq 0.05$) を認めている。しかし上記した様に、用量との関連性がなく、雌雄や検査時期での変動に一貫性が認められないことから投与の影響とは思われない。

表. 運動量

性別	雄				雌			
	0	250	2000	8000	0	250	2000	8000
用量 (ppm)								
投与前週	456±198 (100)	594±174 (130)	542±196 (119)	572±270 (125)	1012±316 (100)	783±204 (77)	910±264 (90)	897±252 (89)
2週	559±146 (100)	605±144 (108)	706±204 (126)	623±242 (111)	886±304 (100)	757±223 (85)	889±243 (100)	796±144 (90)
4週	499±177 (100)	666±138 (133)	↑722±126 (145)	↑694±228 (139)	898±248 (100)	762±122 (85)	832±236 (93)	720±157 (80)
8週	507±152 (100)	544±131 (107)	536±168 (106)	561±217 (111)	789±305 (100)	704±277 (89)	919±292 (116)	639±228 (81)
13週	426±159 (100)	483±121 (113)	395±152 (93)	537±212 (126)	788±261 (100)	638±159 (81)	830±279 (105)	654±99 (83)

表中の数値はセッション総運動量カウント平均値±SD

()は対照群の値に対する割合(%)

↑ : p<0.05 (Dunnett's test)

表. 移動運動量

性別	雄				雌			
	0	250	2000	8000	0	250	2000	8000
用量 (ppm)								
投与前週	253±117 (100)	345±116 (136)	333±119 (132)	326±157 (129)	502±186 (100)	415±158 (83)	467±149 (93)	436±169 (87)
2週	308±97 (100)	339±84 (110)	377±107 (122)	340±136 (110)	421±159 (100)	393±137 (93)	425±120 (101)	367±86 (87)
4週	265±104 (100)	350±86 (132)	↑375±61 (142)	↑371±136 (140)	405±120 (100)	380±97 (94)	377±100 (93)	336±69 (83)
8週	255±111 (100)	257±72 (101)	253±83 (99)	280±132 (110)	347±150 (100)	340±167 (98)	407±154 (117)	274±110 (79)
13週	211±92 (100)	215±63 (102)	181±87 (86)	263±114 (125)	354±124 (100)	300±96 (85)	397±172 (112)	308±63 (87)

表中の数値はセッション総移動運動量カウント平均値±SD

()は対照群の値に対する割合(%)

↑ : p<0.05 (Dunnett's test)

眼科学的検査;投与前および投与 12 週目に全生存動物について眼科学的検査を実施した。

投与に関連した変化は認められなかった。

剖 検 ; 投与終了後全生存動物について剖検し、全ての臓器、体腔、剖面、開口部および外表を肉眼的に検査した。

雌雄いずれにも、検体投与に関連した所見を認めなかった。

最終体重・脳および肝重量 ; 投与終了後、剖検の直前に最終体重を測定した。各群 12 例中 6 例を灌流固定動物、残りの動物を非灌流動物とし、灌流固定動物はペントバルビタール深麻酔下で灌流固定後、脳重量を測定した。また、非灌流動物は二酸化炭素で屠殺し、肝重量を測定した。

最終体重は 8000ppm 群雌で、灌流および非灌流の動物で、対照群を統計学的に有意に下回った (それぞれ 10% および 12%)。雄ならびに 250 および 2000ppm 群の雌では、最終体重に対照群との差はなかった。

脳重量 (灌流動物) は、対照群と投与群との間に差はなかった。

肝臓重量 (非灌流動物) は、8000ppm 群では雄で実重量および対体重比が有意に上昇 (22% および 23%) した。雌では対体重比が有意に上昇 (28%) し、実重量もわずかに上昇 (12% 有意差なし) した。

2000ppm 群では雄で対体重比が有意に上昇 (13%) し、実重量もわずかに上昇 (11% 有意差なし) した。雌では、肝臓の対体重比が有意に上昇 (12%) した。^{注 2)}

250ppm 群では雌雄ともに、肝臓重量に対照群との差は認められなかった。

注 2) 申請者注

2000ppm で雌雄の肝対体重比が有意に増加したが、本試験においては肝の組織学的検査を実施していないため組織から影響を確認できない。しかし、肝への影響は 7000ppm においても回復性が確認されており (ラット慢性毒性/発がん性併合試験 (資料 No. 原体-17))、適応反応と判断した。90 日間反復経口投与毒性試験 (補足試験) (資料 No. 原体-10) の、ラットの肝変化も適応と考えられ、3500ppm を無毒性量と確認している。以上のことから本 90 日間反復投与神経毒性試験においても、2000ppm での肝重量変化は有害影響ではないと考えられる。

統計学的有意差を認めた肝臓重量 (非灌流動物) を次の表に示した。

表. 肝臓重量

肝臓重量 (非灌流動物)								
	雄				雌			
用量 (ppm)	0	250	2000	8000	0	250	2000	8000
平均最終体重								↓ 88
実重量				↑ 122				
対体重比			↑ 113	↑ 123			↑ 112	↑ 128

数値は対照群に対する割合 (%)

↑ ↓ : $p \leq 0.05$ (ANOVA+Dunnett's 検定)

病理学的検査 ; 各群雌雄各 6 例ずつを、ペントバルビタールによる深麻酔下、左心室から亜硝酸ナトリウムリン酸緩衝溶液を流して灌流した後、汎用固定液 (1% グルタルアルデヒド + 4% EM 級ホルムアルデヒド) で灌流した。各動物から脳および脊髄全体、両眼 (視神経含む)、末梢神経 (坐骨、脛骨、腓腹)、ガッセル神経節、腓腹筋、両前肢、神経組織または骨格筋の肉眼的病変部を採取し、10% 緩衝ホルマリンに固定した。灌流に用いなかった生存動物は二酸化炭素で屠殺し、肝臓を採取して 10% 緩衝ホルマリン中に保存した。

雌雄の灌流固定した対照群および 8000ppm 群のラットから採取した一連の神経組織について以下の通り、顕微鏡的病理検査を実施した。

- ・脳 (8 冠状断面)、脊髄 (頸部、胸部、腰部、馬尾)、眼、視神経、腓腹筋。
ーパラフィンに包埋してヘマトキシリン-エオシン染色した
- ・頸膨大および腰膨大からの後根神経節 (後根線維および前根線維を含む)、ガッセル神経節および末梢神経組織 (坐骨、脛骨、腓腹神経)。
ーメタクリル酸グリコール (GMA) に包埋し、改良 Lee 染色変法により染色した。

病理学的検査を実施した対照および 8000ppm 群の雌雄において、投与に関連する所見は認められなかった。

8000ppm 投与群雌雄で、体重、総体重増加量および摂餌量の低下、ならびに、雌における最終体重の低下が認められた。また、肝臓重量（実重量（雄のみ）および対体重比）が増加した。

2000ppm 投与群では雌雄で肝対体重比のみ増加が認められたが、有害影響ではないと考えられた。

250ppm 群では影響は認めなかった。

いずれの投与群も雌雄共に、一般状態の観察結果、FOB（8000ppm 群の雌雄における体重の低下を除く）、運動量測定値、眼科学的検査および神経病理学的検査データには、検体投与の影響は認められなかった。

以上の結果から、神経毒性エンドポイントでの無毒性量^{注3)}は雌雄共に 8000ppm（雄；516.0 mg/kg/日、雌；608.8 mg/kg/日）と結論した。

注3) 申請者注

雌雄 8000ppm で体重および摂餌量等に影響を認めることから、一般毒性における本試験条件下での総合的な無毒性量は雌雄共に 2000ppm（雄；126.1 mg/kg/日、雌；155.9 mg/kg/日）と判断される。

10. 28日間反復投与遅発性神経毒性

ニワトリを用いた28日間反復投与遅発性神経毒性試験

(毒性資料No. 原体-15)

「農薬の登録申請に係る試験成績について」（平成12年11月24日付け12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知）の運用についての「4. 試験成績の提出の除外について」(2)⑬の規定により下記の理由が該当することから試験を省略した。

急性遅発性神経毒性試験成績を提出する必要があると認められる場合であっても、本試験成績の提出を必要としないものとする。