

(3) 水中光分解試験（自然水）

¹⁴C-スピノシン A 又は ¹⁴C-スピノシン D を pH 9.2 の自然水（米国インディアナ州、農業用貯水池）にそれぞれ 2.0 又は 0.2 µg/mL となるように添加した後、25±0.5℃、自然太陽光下 [米国インディアナ州（北緯 39.9°）：光強度は真夏の光の 1/3] または暗所下で最長 48 時間インキュベートする水中光分解試験が実施された。

自然太陽光下における推定半減期は、スピノシン A 及び D とともに 4.3 時間であった。

48 時間後、自然太陽光下におけるスピノシン A は 4.7% TAR、スピノシン D は 5.5% TAR であったが、暗所下ではいずれも安定であり、スピノシン A が 88.9% TAR、スピノシン D が 87.5% TAR を占めた。主要分解物は B 及び E であった。（参照 7、18）

5. 土壌残留試験

火山灰土・埴壤土（岩手）及び洪積土・埴壤土（石川）を用いて、スピノシン A 及びスピノシン D、分解物 B 及び E を分析対象化合物とした土壌残留試験（容器内及び圃場）が実施された。

結果は表 9 に示されている。推定半減期は、スピノシン A では 4～82 日、スピノシン D では 6～90 日、スピノシン A 及びスピノシン D の含量では 4～84 日であった。B の最高値は 90 日後に 0.17 mg/kg、E の最高値は 0.01 mg/kg であり、これらの推定半減期は算出されなかった。

表 9 土壌残留試験成績①

試験	濃度*	土壌	推定半減期（日）		
			スピノシン A	スピノシン D	スピノシン A+D
容器内試験	0.6 mg/kg	火山灰土・埴壤土	12	7	10
		洪積土・埴壤土	82	90	84
圃場試験	600 g ai/ha	火山灰土・埴壤土	4	6	4
		洪積土・埴壤土	19	18	18

※容器内試験では純品、圃場試験ではフロアブルを使用

沖積土・砂質埴土（高知）及び火山灰土・シルト質埴土（熊本）を用いて、スピノシン A、スピノシン D、分解物 B 及び A17 を分析対象化合物とした土壌残留試験（容器内及び水田圃場）が実施された。

結果は表 10 に示されている。スピノシン A、スピノシン D、分解物 B 及び A17 の 4 成分の合計で 5～9 日、スピノシン A、スピノシン D 及び分解物 B の 3 成分の合計で 25～45 日であった。（参照 19）

表 10 土壌残留試験成績②

試験	濃度	土壌	推定半減期 (日)
			成分合計*
容器内試験	0.4 mg/kg	沖積土・砂質埴土	45
		火山灰土・シルト質埴土	25
水田圃場試験	10 kg/ha	沖積土・砂質埴土	9
		火山灰土・シルト質埴土	5

※容器内ではスピノシン A、スピノシン D 及び分解物 B の 3 成分合計、
水田圃場ではスピノシン A、スピノシン D、分解物 B 及び A17 の 4 成分合計

6. 作物残留試験

果実、野菜、茶等を用いて、スピノシン A 及びスピノシン D を分析対象化合物とした作物残留試験が実施された。

結果は別紙 3 に示されている。国内で栽培された農産物における、スピノシン A 及びスピノシン D の含量の最高値は、もも（果皮）を除くと、50 g ai/ha で 2 回散布し、最終散布 7 日後に収穫したみつば（茎葉）の 1.55 mg/kg であった。

作物残留試験の含量分析値を用いて、スピノシン A 及びスピノシン D を暴露評価対象化合物とした場合、国内で栽培された農産物から摂取される推定摂取量が表 11 に示されている（別紙 4 参照）。なお、本推定摂取量の算定は、登録に基づく使用方法から、スピノシン A 及びスピノシン D が最大の残留を示す使用条件ですべての適用作物に使用され、加工・調理による残留農薬の増減が全くないと仮定の下に行った。（参照 20、53、54）

表 11 食品中より摂取されるスピノシン A 及びスピノシン D（含量）の推定摂取量

	国民平均 (体重：53.3 kg)	小児 (体重：15.8 kg)	妊婦 (体重：55.6 kg)	高齢者(65 歳以上) (体重：54.2 kg)
摂取量 ($\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$)	55.4	36.4	65.3	54.9

7. 家畜体内薬物動態試験及び残留試験

(1) 薬物動態試験及び残留試験（鶏）

鶏（白色レグホーン種、雌鶏（22 又は 25 週齢）、30 羽/群）を用いて、 ^{14}C -スピノシン A 又は ^{14}C -スピノシン D を 5 日間混餌投与（10 ppm）し、代謝試験が実施された。

投与期間中、卵は 1 日 2 回採取され、排泄物は 24 時間間隔で採取された。最終投与後 24 時間以内にと殺され、肝臓、脂肪、筋肉、腎臓が採取され、組織の TRR が測定された。

残留値が最も高かったのは肝臓及び脂肪であり、最も低かったのは筋肉であった。結果を表 12 に示す。（参照 73）

表 12 ¹⁴C-スピノシン A 及び ¹⁴C-スピノシン D 経口投与後の鶏組織の TRR 及び残留濃度

試料	スピノシン A 投与 (mg/kg)		スピノシン D 投与 (mg/kg)	
	dpm/g	残留濃度(mg/kg) ¹⁾	dpm/g	残留濃度(mg/kg) ²⁾
脂肪	19,952	2.187	8,420	1.022
肝臓	8,034	0.881	14,367	1.744
筋肉	1,081	0.118	1,011	0.123
腎臓	5,147	0.564	6,252	0.759

¹⁾ dpm/g 値を比放射活性値(9,124 dpm/μg)で除算して求めたスピノシン A 組織の mg/kg 値 (スピノシン A 当量として表した値)。

²⁾ dpm/g 値を比放射活性値(8,236 dpm/μg)で除算して求めたスピノシン D 組織の mg/kg 値 (スピノシン D 当量として表した値)。

卵の分析を行った結果、残留濃度は全投与期間を通じて継続して増加傾向にあり、定常状態にはならなかった。残留濃度の結果を表 13 に示す。(参照 73)

表 13 ¹⁴C-スピノシン A 及び ¹⁴C-スピノシン D 経口投与後の卵の TRR 及び残留濃度

試料	スピノシン A 投与 (mg/kg)		スピノシン D 投与 (mg/kg)	
	dpm/g	残留濃度(mg/kg) ¹⁾	dpm/g	残留濃度(mg/kg) ²⁾
1 日目	検出不能	—	検出不能	—
2 日目	124	0.014	155	0.019
3 日目	751	0.082	602	0.073
4 日目	1,715	0.188	1,170	0.142
5 日目	2,931	0.321	1,826	0.222
6 日目 ³⁾	3,442	0.377	2,627	0.319

¹⁾ dpm/g 値を比放射活性値 (9,124 dpm/μg) で除算して求めたスピノシン A 投与後の卵の総残留濃度 [mg/kg 値 (スピノシン A 当量として表した値)]。

²⁾ dpm/g 値を比放射活性値 (8,236 dpm/μg) で除算して求めたスピノシン D 投与後の卵の総残留濃度 [mg/kg 値 (スピノシン D 当量として表した値)]。

³⁾ 6 日目の卵は、最終投与日(5 日目)の試料採取時と動物のと殺時の間の 2~3 時間に採取したものである。

組織における非抽出性放射活性の割合は、脂肪で総残留の 0.1~0.3%、肝臓及び筋肉で 2.2~5.7%であった。卵では非抽出性残留物の割合がやや高く、試料中総残留の 8.4~10.8%に相当していた。各試料の水性残留物割合が低かったことから、これらの残留物の結合性は低いと考えられた。

極性残留物の割合が最も高かったのは肝臓で、試料中総残留の約 4~10%に相当していた。他のすべての組織・畜産物では、極性残留物は総残留の 2%以下であった。これらの極性残留物は多成分からなることが判明しており、酵素加水分解又は弱酸加水分解による有機溶媒可溶成分への変換は起こりにくいと考えられた。

鶏における代謝には、3つの代謝経路が関与していると考えられた。2つの主要経路は、forosamine糖の*N*-メチル部分からの1つのメチル基の除去、あるいはトリメチルラムノース糖の*O*-メチル部分からの1つ又は2つのメチル基の除去であった。これら2つの代謝経路によって、スピノシンAでは8種類の、スピノシンDでは10種類の代謝物が生成された。第3の経路は他の2つと比較してマイナーな経路であり、forosamine糖の除去であった。この経路は、*O*-脱メチル化経路とともに3種類以上の微量代謝物の生成をもたらした。これらの微量代謝物は、いずれも肝臓以外の組織にはほとんどみられなかった。

スピノシンA、スピノシンD及びその*N*-脱メチル化代謝物（代謝物B及びE）は、鶏の組織及び卵で同定された主要残留物であった。¹⁴C-スピノシンA又は¹⁴C-スピノシンDを投与した鶏の組織及び卵における代謝物を含む残留分布を表14及び15に示す。（参照73）

表14 ¹⁴C-スピノシンA投与後の鶏組織における残留分布

画分	脂肪		肝臓		筋肉		卵	
	%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg
スピノシンA	80.5	1.761	13.8	0.122	54.6	0.064	34.3	0.129
代謝物B	2.0	0.044	11.3	0.100	12.0	0.014	11.0	0.041
代謝物J	1.5	0.033	0.9	0.008	2.3	0.003	3.3	0.012
代謝物K及びAH ¹⁾	4.1	0.090	9.3	0.082	5.1	0.006	9.7	0.037
代謝物F			4.6	0.041				
代謝物AP-1 ²⁾			7.0	0.062				
代謝物AP-2 ²⁾			4.1	0.036				
代謝物AP-3 ³⁾			2.7	0.024	1.5	0.002	1.4	0.005
代謝物AP-4 ³⁾			7.8	0.069	5.7	0.007	4.7	0.018
代謝物AP-5 ⁴⁾			2.4	0.021			1.6	0.006
代謝物AP-6 ⁴⁾			1.9	0.017			1.1	0.004
上記以外の抽出物	0.3	0.007	5.0	0.044	5.7	0.007	10.8	0.041
水性溶解物			10.4	0.092	1.5	0.002	1.6	0.006
不明 ⁵⁾	11.6	0.254	18.8	0.166	12.6	0.015	20.5	0.077

¹⁾ 代謝物AH：スピノシンAの*O*-脱メチル体で、代謝物J及びK以外のもの。

²⁾ 代謝物AP-1及びAP-2：AP-2は代謝物Fの*O*-脱メチル体で、AP-1は同定できていないが、AP-2の類似体と考えられる。

³⁾ 代謝物AP-3及びAP-4：スピノシンAの*O*-脱メチル化及び*N*-脱メチル化されたもの（脱メチルの位置不明）。

⁴⁾ 代謝物AP-5及びAP-6：AP-3又はAP-4がさらに*O*-脱メチル化されたもの（脱メチルの位置不明）。

⁵⁾ ・TLCプレートで代謝ゾーンとして認められなかったすべての放射活性
 ・シリカカラム画分又はSPEカートリッジ画分に残留し分析できなかった放射活性
 ・抽出過程又はクリーンアップ過程において不明となった放射活性

表 15 ¹⁴C-スピノシン D 経口投与後の鶏組織における残留分布

画分	脂肪		肝臓		筋肉		卵	
	%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg
スピノシン D	78.9	0.806	3.3	0.058	39.1	0.048	21.5	0.069
代謝物 E	6.8	0.069	21.0	0.366	14.7	0.018	25.0	0.080
代謝物 J of D ¹⁾	2.4	0.025						
代謝物 K of D ²⁾ 及び AH of D ³⁾	6.0	0.061	12.2	0.213	6.1	0.007	8.0	0.026
代謝物 F of D ⁴⁾			3.4	0.059	1.6	0.002		
代謝物 DP-1 ⁵⁾			5.2	0.091	2.7	0.003		
代謝物 DP-2 ⁵⁾			3.9	0.068				
代謝物 DP-3 ⁶⁾			6.7	0.177	1.5	0.002	5.4	0.017
代謝物 DP-4 ⁶⁾			17.7	0.309	6.0	0.007	11.5	0.037
代謝物 DP-5 ⁷⁾			2.2	0.038	2.0	0.002	2.6	0.008
代謝物 DP-6 ⁸⁾			2.4	0.042	1.2	0.001	1.7	0.005
代謝物 DP-7 ⁸⁾			2.5	0.044	0.9	0.001	1.5	0.005
代謝物 DP-8 ⁸⁾			2.5	0.044	0.8	0.001	1.4	0.004
上記以外の抽出物	0.1	0.001	3.6	0.063	2.2	0.003	8.4	0.027
水性溶解物			4.2	0.073	1.0	0.001	0.5	0.002
不明 ⁹⁾	5.8	0.059	9.2	0.160	20.2	0.025	12.5	0.040

- 1) 代謝物 J of D: スピノシン D の O-脱メチル体。O-脱メチル化の位置は代謝物 J と同じ位置。
 2) 代謝物 K of D: スピノシン D の O-脱メチル体。O-脱メチル化の位置は代謝物 K と同じ位置。
 3) 代謝物 AH of D: スピノシン D の O-脱メチル体。O-脱メチル化の位置は代謝物 J 及び K と異なる位置。
 4) 代謝物 F of D: スピノシン D の Pseudoaglycone。
 5) 代謝物 DP-1 及び DP-2: DP-2 はスピノシン D の Pseudoaglycone の O-脱メチル体で、DP-1 は同定できていないが、DP-2 の類似体と考えられる。
 6) 代謝物 DP-3 及び DP-4: スピノシン D の O-脱メチル化及び N-脱メチル化されたもの (脱メチルの位置不明)。
 7) 代謝物 DP-5: スピノシン D の 2 回 O-脱メチル化されたもの (脱メチルの位置不明)。
 8) 代謝物 DP-6、DP-7 及び DP-8: スピノシン D の 2 回 O-脱メチル化及び 1 回 N-脱メチル化されたもの (脱メチルの位置不明)。
 9) ・ TLC プレートで代謝ゾーンとして認められなかったすべての放射活性
 ・ シリカカラム画分又は SPE カートリッジ画分に残留し分析できなかった放射活性
 ・ 抽出過程又はクリーンアップ過程において不明となった放射活性

鶏 (9 羽/群) を用いて、スピノサドの 42 日間強制経口投与 (0、0.1、0.3、1、5 ppm 飼料添加相当量をゼラチンカプセルに入れ、1 日 1 回投与) による残留試験が実施された。

投与前から投与 41 日後まで毎日すべての鶏から卵が採取された。投与終了後、5 群のすべての鶏がと殺され、各鶏のと体の半身 (骨及び内臓を除いた皮膚及び脂肪をつけた半身) すべてを試料とした他、別の半身からは筋肉、脂肪及び肝臓が採取された。HPLC を用いて、卵及び採取されたすべての組

織についてスピノシン A 及びスピノシン D の残留濃度が測定された。スピノシン A 及びスピノシン D 濃度を合計してスピノサドの総残留物濃度が求められた。

投与 42 日後の鶏組織中残留濃度及び投与 41 日後の卵の残留濃度を表 16 及び 17 に示した。卵中の残留濃度は投与 13 日目までにプラトーに達した。スピノサドは卵及び検査した全組織に移行し、主に脂肪組織に移行することが示された。(参照 74)

表 16 スピノサド経口投与後の鶏組織中の残留性(投与 42 日後の残留)

投与量 (ppm)	総残留 ¹⁾ (スピノシン A+D) (mg/kg)					
	全身	白筋	赤筋	腹腔脂肪	皮下脂肪	肝臓
対照	ND ²⁾	ND	ND	<0.01	0.03	ND
0.1	<0.01	ND	ND	0.03	0.05	ND
0.3	<0.01	ND	ND	0.05	0.07	ND
1.0	0.03	ND	<0.01	0.16	0.17	0.02
5.0	0.19	0.05	0.07	1.4	1.63	0.11

¹⁾ 各投与群の最大残留濃度

²⁾ ND : 検出せず (検出限界 : 0.003 mg/kg)

表 17 スピノサド経口投与後の各投与日における卵中残留濃度

投与量 (ppm)	総残留 ¹⁾ (スピノシン A+D) (mg/kg)								
	1日	4日	7日	10日	13日	20日	28日	35日	41日
対照	ND ²⁾	ND	ND	ND	ND	—	ND	ND	ND
0.1	—	—	—	—	—	—	<0.01	ND	ND
0.3	—	—	—	—	—	—	ND	ND	0.01
1.0	—	—	—	—	—	—	0.01	0.01	0.01
5.0	ND	0.10	0.13	0.21	0.24	0.22	0.14	0.18	0.19

¹⁾ 各投与群の平均残留濃度

²⁾ ND : 検出せず (検出限界 : 0.003 mg/kg)

(2) 薬物動態試験 (山羊)

① 経口投与試験

泌乳山羊 (1頭/群) を用いて、¹⁴C-スピノシン A 又は ¹⁴C-スピノシン D の 3 日間強制経口投与 (摂餌量の 10 ppm 相当量、カプセル、1 日 1 回投与) による薬物動態試験が実施された。乳汁は 1 日 2 回、尿及び糞便は 1 日 1 回採取された。最終投与後 24 時間以内に動物はと殺され、肝臓、腎臓、脂肪及び筋肉の試料が採取された。各試料についての TRR が測定された。残留 ¹⁴C の測定と、TLC 及び HPLC による定量が行われた。結果を表 18 に示す。

スピノシン A を投与した組織には 8 種類、スピノシン D を投与した組織には 5 種類の代謝物が検出された。代謝物について TLC 及び HPLC で分離後、質量分析を行った結果、スピノシン A 及び D は主に forosamine 糖の *N*-脱メチル化、マクロライド環の複数の部位における水酸化、及び両反応の組み合わせにより代謝されることが明らかになった。

スピノシン A を投与したすべての組織に代謝物 B 及びマクロライドの水酸化による 2 種類の代謝物が存在し、これらは腎臓及び肝臓に最も多く認められた。スピノシン A の 8 種類の代謝物中 6 つが同定された。

スピノシン A について同定されたものと類似した代謝物がスピノシン D についても確認された。検出された 5 種類の代謝物中 3 種類の構造が推定された。これらの代謝物は、代謝物 E 及びスピノシン D 分子のマクロライド環の水酸化による 2 種類の代謝物である。スピノシン D の代謝経路はスピノシン A と同様の経路であった。

組織中の TRR は、スピノシン A 投与で 0.30~3.57 mg/kg、スピノシン D 投与で 0.11~1.82 mg/kg であった。残留が最も高かったのは脂肪であり、最も低かったのは筋肉であった。組織中スピノシン A 濃度はスピノシン D 濃度の 2~3 倍であった。すべての試料において最も多い残留物は、未変化体のスピノシン A 又はスピノシン D であった。(参照 75)

表 18 山羊における ¹⁴C-スピノシン A 及び ¹⁴C-スピノシン D 経口投与後の組織中 TRR 及び濃度

試料	スピノシン A 投与 (mg/kg)		スピノシン D 投与 (mg/kg)	
	TRR	スピノシン A	TRR	スピノシン D
脂肪	3.57	3.07	1.82	1.54
筋肉	0.30	0.15	0.11	0.06
腎臓	0.97	0.34	0.30	0.12
肝臓	1.58	0.47	0.50	0.10
乳汁 ¹⁾	0.63	0.44	0.16	0.14

¹⁾ 数値は投与 3 日後に採取した 2 つの試料の平均である。

②経皮投与試験

泌乳山羊（2頭）を用い、¹⁴C-スピノシン（ミリスチン酸イソプロピル溶液及びオレイン酸溶液）が皮下に単回投与された。1頭には¹⁴C-スピノシン A を 18 mg/kg 体重、もう 1 頭には¹⁴C-スピノシン D を 4 mg/kg 体重それぞれ投与された。

投与後 4 日間、1 日 2 回乳汁が採取された。糞便及び尿は 1 日 1 回採取された。動物は投与 4 日後にと殺され、剖検、組織試料が採取され、液体シンチレーション法（LSC）により総放射活性が分析された。結果を表 19 に示す。

スピノシン A 及びスピノシン D の TRR の分布は同様であり、残留が最も多かったのは肝臓であった。脂肪中の残留は腎臓と同程度であり、いずれも筋肉における残留値より高かった。乳汁中の TRR は、スピノシン A では投与約 72 時間後にプラトーに達し、スピノシン D では 48～60 時間後にピークに達した。スピノシン A に関連した残留代謝物濃度はスピノシン D 関連の残留代謝物濃度より 4～5 倍多く、2 成分の用量比に比例していた。投与量の約 0.05% が乳汁中に排泄され、糞便中の排泄総放射活性は投与量の 2.3～2.6% であった。これらの結果は、本試験において 2 種類のスピノシンの正味の吸収/排泄に差がなかったことを示している。抽出性放射活性の割合は、肝臓、腎臓、筋肉、脂肪のスピノシン A については 89～100%、同一組織におけるスピノシン D については 83～99% であった。乳汁試料中の抽出性残留物の割合は、スピノシン A では 97% 以上、スピノシン D では 96% 以上であった。

HPLC と溶出面分の LSC とを組み合わせ、代謝物プロファイルの評価が行われた。代表的な抽出物を HPLC によって分析し、スピノシン A、スピノシン D 及び残留代謝物の構造を決定した。すべての組織及び乳汁における残留の大半は、親化合物スピノシン A 又はスピノシン D であった。親化合物の *N*-脱メチル化体に相当する 2 種類の微量代謝物（代謝物 B 及び E）が同定された。その他に、各親化合物の水酸化又は *N*-脱メチル化による 4 種類の代謝物が認められた。同定されたこれらの代謝物は、①の経口投与試験において同定された代謝物と一致していた。（参照 76）

表 19 ¹⁴C-スピノシン A 及び ¹⁴C-スピノシン D 経皮投与後の山羊の可食組織及び乳汁中の TRR

試料		平均 TRR (mg/kg)	
		¹⁴ C-スピノシン A 投与 (18 mg/kg 体重)	¹⁴ C-スピノシン D 投与 (4 mg/kg 体重)
肝臓		1.68	0.39
腎臓		0.86	0.17
筋肉 ¹⁾		0.27	0.045
脂肪 ²⁾		0.95	0.22
乳汁 (投与後の 時間)	7 時間	0.017	0.021
	19 時間	0.079	0.061
	31 時間	0.128	0.077
	43 時間	0.202	0.093
	55 時間	0.323	0.092
	67 時間	0.507	0.074
	79 時間	0.539	0.076
	82 時間	0.517	0.085

¹⁾ 3 つの個別試料 (臀部、腰部及び肩部の筋肉) の平均。

²⁾ 2 つの個別試料 (腰部及び腎周囲の脂肪) の平均。

(3) 残留試験 (牛)

① 経口投与試験

泌乳牛を用い、スピノサドの 28 日間強制経口投与 (0、1、3、10 ppm 飼料添加相当量をゼラチンカプセルに入れ、1 日 1 回投与) による残留試験が実施された。なお、0、1、3 ppm 投与群は雌牛各 3 頭が、10 ppm 群は雌牛 7 頭がそれぞれ用いられた。乳汁は、投与 2 日前から投与 28 日後まで毎日、すべての雌牛から 1 日 2 回採取された。最終投与後 24 時間以内に、休薬試験に供した 10 ppm 投与群の雌 4 頭を除くすべての動物がと殺された。休薬試験に供した残りの動物は、最終投与 8、15、29 及び 57 日後にと殺された。また、乳汁は、最終投与 1~14 日後は毎日、その後は、最終投与 21、28、42 及び 56 日後に採取された。

乳汁、乳清、乳脂肪及び組織 (筋肉、腎臓、肝臓及び脂肪) は、スピノシン A、スピノシン D、代謝物 B 及び E の個々の分析対象物について、HPLC を用いて分析された。また、免疫測定法 (IA) による分析も行われ、総残留も測定された。

検出限界及び定量限界は、HPLC ではそれぞれ 0.003 及び 0.01 mg/kg、IA では 0.003 及び 0.01 mg/kg であった。

最終投与後のスピノサドの組織中残留濃度を表 20 に、投与 14 及び 28 日

後の乳汁、乳脂肪及び乳清中の残留濃度を表 21 に示した。組織の値は各投与群で得られた最大残留濃度を示した。乳汁、乳脂肪及び乳清については平均残留濃度を求めた。

休薬期間中の乳汁中のスピノサドは、2頭中1頭では、最終投与28日後には検出限界未満に、他の1頭は最終投与56日後には定量限界未満であった。

これらの結果から、スピノサドは乳汁及び分析したすべての組織に移行し、また、乳脂肪及び脂肪に最も高い濃度で移行することが示された。(参照 77)

表 20 スピノサド経口投与後の乳牛組織中の残留濃度

試料	投与期間又は 休薬期間	実投与量 (ppm)	残留濃度 ¹⁾ (mg/kg)	
			IA 法	HPLC
筋肉	最終投与後 24 時間以内	0.84	0.037	0.026
		3.28	0.095	0.069
		10.7	0.428	0.299
	最終投与 8 日後	10.6	0.270	0.234
	最終投与 15 日後	8.53	0.028	0.022
最終投与 29 日後	9.08	ND	ND	
最終投与 57 日後	10.3	0.030	0.022	
腎臓	最終投与後 24 時間以内	0.84	0.097	0.082
		3.28	0.365 ²⁾	0.257
		10.7	1.200	0.830
	最終投与 8 日後	10.6	0.372	0.231
	最終投与 15 日後	8.53	0.074	0.038
最終投与 29 日後	9.08	(0.006) ³⁾	(0.005) ³⁾	
最終投与 57 日後	10.3	0.051	0.034	
肝臓	最終投与後 24 時間以内	0.84	0.224	0.151
		2.77	0.795	0.444
		10.7	3.178	1.698
	最終投与 8 日後	10.6	0.842	0.343
	最終投与 15 日後	8.53	0.085	0.047
最終投与 29 日後	9.08	0.013	(0.004) ³⁾	
最終投与 57 日後	10.3	0.026	0.014	
脂肪	最終投与後 24 時間以内	0.83	NA ⁴⁾	0.663
		3.28	NA	1.716
		10.7	NA	7.489
	最終投与 8 日後	10.6	NA	3.673
	最終投与 15 日後	8.53	NA	0.305
最終投与 29 日後	9.08	NA	0.026	
最終投与 57 日後	10.3	NA	0.183	

1) 各投与群の最大残留濃度

2) 実投与量は 2.77 ppm

3) 検出限界 (0.003 mg/kg) と定量限界 (0.01 mg/kg) の間

4) 各脂肪中残留は HPLC のみを用いて測定した。

表 21 スピノサド経口投与後の乳汁、乳脂肪及び乳清中の残留濃度

試料	平均投与量 (ppm)	平均残留濃度 ¹⁾ (mg/kg)			
		試験 14 日		試験 28 日	
		IA	HPLC	IA	HPLC
乳汁	0.86	0.071	0.044	0.049	0.040
	2.86	0.178	0.128	0.157	0.133
	9.85	0.598	0.631	0.506	0.473
乳脂肪	0.86	NA ²⁾	0.174	NA	0.179
	2.86	NA	0.485	NA	0.589
	9.85	NA	2.117	NA	1.888
乳清	0.86	NA	<0.01	NA	<0.01
	2.86	NA	0.01	NA	0.015
	9.85	NA	0.05	NA	0.062

¹⁾ 各投与群の平均残留濃度

²⁾ 乳脂肪及び乳清中の残留は HPLC 法のみを用いて測定した。

②経皮投与

乳牛を用いた、スピノサド (2.46%含有懸濁濃縮製剤) のポアオン投与 (未希釈) 又は畜体噴霧投与 (希釈) による残留試験が実施された。7 日ごとに製剤の 400 ppm 希釈液 2 L を噴霧する群 (雌 9 頭)、21 日ごとに 400 ppm 希釈液 5 L を噴霧する群 (雌 9 頭) 及び 14 日ごとに 2 mg/kg をき甲から尾端までの背部にポアオンする群 (雌 15 頭) が設定され、いずれの投与も、5 回連続で適用された。各動物から乳汁が採取された。

スピノサドを直接噴霧した試験群については、3 頭ずつが最終投与 2、7 及び 14 日後にと殺された。ポアオン投与した試験群については、泌乳中の乳牛について 3 頭ずつ最終投与 2 及び 14 日後にと殺された。残りの乾乳期牛は、3 頭ずつ最終投与 21、28 及び 35 日後にと殺された。と殺時に筋肉、腎臓、肝臓、皮下脂肪及び腎臓脂肪が採取された。一部の乳汁並びにすべての筋肉、腎臓及び肝臓について、IA を用いてスピノサドの残留濃度が測定された。検出限界及び定量限界はそれぞれ 0.003 及び 0.010 mg/kg であった。一部の乳脂肪とすべての脂肪は、HPLC を用い、スピノシン A、スピノシン D、代謝物 B 及び E を対象に分析が行われた。各代謝物の検出限界及び定量限界は、それぞれ 0.003 及び 0.01 mg/kg であった。結果を表 22、23 及び 24 に示す。

試験結果より、スピノサドは、乳汁及び分析したすべての組織に移行し、乳脂肪及び脂肪で最も高い濃度となることが示された。2 L の 400 ppm 噴霧群では、最終投与 2 日後に全組織中の残留濃度が最高値を示した。5 L の 400 ppm 噴霧群では、最終投与 2 日後に腎臓及び肝臓の残留濃度が最高値を示し、筋肉及び脂肪組織では最終投与 7 日後に最高値を示した。ポアオン群については、最終投与 2 日後に筋肉、肝臓及び腎臓における残留濃度が最高値を示したが、皮下脂肪及び腎臓脂肪については、最終投与 28 日後に最高値を示

した。(参照 78)

表 22 スピノサド経皮投与後の乳牛組織中の残留濃度

投与方法	スピノサドの最大残留濃度 ¹⁾ (mg/kg)					
	最終投与後の日数	筋肉	腎臓	肝臓	皮下脂肪	腎臓脂肪
2 L、400 ppm 噴霧	2	0.043	0.131	0.224	0.470	0.472
	7	0.016	0.045	0.083	0.181	0.319
	14	0.011	0.030	0.054	0.303	0.211
5 L、400 ppm 噴霧	2	0.031	0.107	0.167	0.175	0.260
	7	0.043	0.058	0.114	0.269	0.356
	14	0.014	0.030	0.049	0.200	0.245
2 mg/kg 体重 ポアオン	2	0.284	0.871	1.16	1.656	2.386
	14	0.128	0.224	0.354	2.246	2.273
	21	0.096	0.151	0.171	0.936	0.894
	28	0.136	0.309	0.375	2.711	2.719
	35	0.075	0.051	0.077	0.791	0.562

¹⁾ 各数値は、雌牛 3 頭の群で得られた結果の最大残留濃度である。

表 23 スピノサドの経皮投与後の乳牛の乳汁中残留濃度

採材時点 (各投与後)	スピノサドの平均残留濃度 ¹⁾ (mg/kg)		
	2 L、400 ppm 噴霧	5 L、400 ppm 噴霧	2 mg/kg 体重ポアオン
1 回目	0.061	0.091	0.090
2 回目	0.061	0.083	0.214
3 回目	0.069	0.084	0.340
4 回目	0.060	0.078	0.428
5 回目	0.061	0.092	0.647

¹⁾ 各数値は、各群の全乳牛の午前及び午後の搾乳で得られた乳中のスピノサドの総残留の平均である。

表 24 スピノサドの経皮投与後の乳牛の乳脂肪中残留濃度

採材時点 (各投与後)	スピノサドの平均残留濃度 ¹⁾ (mg/kg)		
	2 L、400 ppm 噴霧	5 L、400 ppm 噴霧	2 mg/kg 体重ポアオン
1 回目	0.179	0.306	0.062
2 回目	0.216	0.276	0.243
3 回目	0.184	0.271	0.762
4 回目	0.220	0.301	0.994
5 回目	0.245	0.206	1.061

¹⁾ 各数値は、HPLC によって測定した一部供試牛のスピノシン A、スピノシン D、代謝物 B 及び E 総濃度の平均である。

(4) 残留試験 (羊)

羊 (メリノ種、1.5~2.5 歳、5 頭/群) を用い、短毛の羊にはスピノサド (10 ppm 水溶液) のディッピング投与、長毛の羊にはスピノサド (25 ppm 水溶液) の手動噴射投与による残留試験が実施された。1 群 5 頭からなる 14 の投与群+無処置対照群 7 頭が用いられ、供試動物が無作為に各群に配された。各群の雌雄比を調整し、雌雄それぞれ 2 又は 3 頭とされた。投与 5、12、15、21、39 及び 56 日後にと殺された。各組織の採材は、背脂肪、筋肉、肝臓、腎周囲脂肪及び腎臓の順で行われた。

別の試験として、羊 (ドーセットホーン種、雌) を用い、スピノサド (10 ppm 水溶液) のディッピング投与による残留試験が実施された。対照群は水のみで浸漬された。対照群と投与群 4 群が設定され、体重に基づき供試動物が割り付けられた。対照群は 2 頭、投与群は 1 群 5 頭とされた。投与動物は、投与 5、15、21 及び 56 日後にと殺された。対照群は、投与 5 及び 15 日後に各 1 頭ずつと殺された。各組織の採材は、背脂肪、筋肉、肝臓、腎周囲脂肪及び腎臓の順で行われた。

両試験では、脂肪 (背部及び腎臓周囲) について、従来の抽出/クリーンアップ操作とこれに続く HPLC により分析され、腎臓、肝臓及び筋肉は IA を用いて分析された。試験に供したすべての組織の検出限界及び定量限界は、0.003 及び 0.01 mg/kg であった。結果を表 25 に示す。(参照 79、80)

表 25 スピノサドの経皮投与後の羊の組織中残留濃度

投与方法	スピノサドの最大残留濃度(mg/kg) ¹⁾					
	試験日	筋肉	腎臓	肝臓	背脂肪	腎臓周囲脂肪
10 ppm、 ディッピング (メリノ種)	5	ND ²⁾	0.014	<0.01	0.029	0.042
	12	ND	<0.01	<0.01	0.033	0.040
	15	ND	ND	ND	0.026	0.030
	21				0.033	0.032
	39				0.023	<0.01
	56				<0.01	<0.01
25 ppm、 手動噴霧 (メリノ種)	5	ND	ND	ND	<0.01	<0.01
	12	ND	ND	<0.01	<0.01	<0.01
	15	ND	ND	ND	<0.01	<0.01
	21				ND	ND
10 ppm、 ディッピング (ドーセット ホーン種)	5	ND	ND	<0.01	0.017	0.027
	15	ND	ND	ND	<0.01	0.011
	21				<0.01	<0.01
	56				ND	ND

¹⁾ 各投与群の最大残留濃度

²⁾ ND: 検出せず (検出限界: 0.003 mg/kg)

8. 一般薬理試験

マウス及びラットを用いた一般薬理試験が実施された。

結果は表 26 に示されている。(参照 21)

表 26 一般薬理試験概要

試験の種類	動物種	動物数 匹/群	投与量 (mg/kg 体重) (投与経路)*	最大 無作用量 (mg/kg 体重)	最小 作用量 (mg/kg 体重)	結果の概要
中枢神経系	一般状態	ICR マウス	雄 3 0, 150, 500, 1,500, 5,000 (経口)	500	1,500	自発運動及び身づくろいの減少、反応性の低下
		Wistar ラット	雄 3 0, 150, 500, 1,500, 5,000 (経口)	500	1,500	自発運動減少、反応性の低下
	体温	Wistar ラット	雄 6 0, 500, 1,500, 5,000 (経口)	1,500	5,000	投与 2~5 日後に低下、7 日後に回復
	脳波	Wistar ラット	雄 3 0, 500, 1,500, 5,000 (経口)	1,500	5,000	波形パターンには変化がなかったが、Total power が投与前に比べて減少
	ヘキバルブ [*] タル睡眠	ICR マウス	雄 8 0, 500, 1,500, 5,000 (経口)	500	1,500	延長傾向 (有意差なし)
	痙攣誘発	ICR マウス	雄 10 0, 500, 1,500, 5,000 (経口)	5,000	—	10 匹中 1 匹に強直性屈曲・伸展及び間代性痙攣、昏睡 死亡：陽性対照群でのみ 4 例
循環器系 血圧・心拍数	Wistar ラット	雄 6 0, 500, 1,500, 5,000 (経口)	500	1,500	血圧低下、5,000 mg/kg 体重 では心拍数も低下 死亡：5,000 mg/kg 体重群で 投与 8 日後に 1 例	
自律神経系 瞳孔径	Wistar ラット	雄 6 0, 500, 1,500, 5,000 (経口)	1,500	5,000	投与 2~5 日後に散瞳	
消化器系 小腸炭末 輸送能	ICR マウス	雄 8 0, 500, 1,500, 5,000 (経口)	5,000	—	影響なし	
骨格筋 懸垂動作	ICR マウス	雄 8 0, 500, 1,500, 5,000 (経口)	5,000	—	影響なし	
血液系 凝固	ラット	雄 6 0, 500, 1,500, 5,000 (経口)	5,000	—	1,500 mg/kg 体重のみで PT 延長がみられたが、用量相関 性はなく、投与による影響と は考えられなかった	

*：いずれの試験も、スピノサド原体を 0.5% トラガント水溶液に懸濁

—：最小作用量が設定できない。

9. 急性毒性試験

(1) 急性毒性試験（ラット）

スピノサドの急性毒性試験が実施された。各試験の結果は表 27 に示されている。（参照 22～24）

表 27 急性毒性試験結果概要（原体）

投与経路	動物種	LD ₅₀ (mg/kg 体重)		観察された症状
		雄	雌	
経口	Fischer ラット 雌雄各 5 匹	>7,500	5,270	流涙、着色鼻漏及び会陰部の汚れ 雄：7,500 mg/kg 体重、雌：5,000 mg/kg 体重以上で死亡例あり、死亡例では流涎、加速呼吸及び横臥
	ICR マウス 雌雄各 5 匹	6,120	7,120	会陰部の汚れ、活動低下及び削瘦 雄：5,000 mg/kg 体重以上、雌：7,500 mg/kg 体重で死亡例あり
経皮	NZW ウサギ 雌雄各 5 匹	>2,000	>2,000	症状及び死亡例なし
吸入	Fischer ラット 雌雄各 10 匹	LC ₅₀ (mg/L)		腹部の汚れ、鼻周囲の血様付着物及び血涙 雄：5.18 mg/L、雌：0.90 mg/L 以上で死亡例あり
		>5.18	>5.18	

注) 経口投与試験では 0.5%MC 水溶液に懸濁

代謝物 B 及び K の ICR マウス用いた急性経口毒性試験が実施された。

各試験の結果は表 28 に示されている。代謝物 K により 10 例が死亡した。

1 例は死因不明であったが、9 例には剖検時に肺のうっ血及び暗色化、血胸が認められたことから、9 例の死因は誤投与によるものと考えられた。（参照 25、26、63）

表 28 急性毒性試験結果概要（代謝物）

被験物質	投与経路	動物種	LD ₅₀ (mg/kg 体重)		観察された症状
			雄	雌	
代謝物 B	経口	ICR マウス 雌雄各 5 匹	3,160	3,160	流涙及び活動低下 雌雄とも 5,000 mg/kg 体重で死亡例あり、死亡例では会陰部の汚れ及び活動低下
代謝物 K	経口	ICR マウス 雌雄各 5 匹	>5,000	>5,000	雌雄とも 2,000 mg/kg 体重で死亡例あり

(2) 急性神経毒性試験（ラット）

Fischer ラット（一群雌雄各 10 匹）を用いた強制経口（原体：0、200、630 及び 2,000 mg/kg 体重、0.5%MC 水溶液に懸濁）投与による急性神経毒性試験が実施された。

630 mg/kg 体重以上投与群の雌雄で投与 1 日後に一時的な体重増加抑制が認められた。いずれの投与群も神経毒性を示唆する所見は認められなかった。

また、2,000 mg/kg 体重投与群において、大脳側頭葉、薄束核（延髄）、脊髄、下垂体後葉等の軸索腫脹、錐体（延髄）、脊髄後根神経節、三叉神経節の神経線維変性、片側網膜及び視神経の萎縮並びに角膜又は眼に近接した血管への鉍質沈着が認められたが、同様の頻度で対照群でも認められたため、投与による影響とは考えられなかった。

本試験において、630 mg/kg 体重以上投与群の雌雄で体重増加抑制が認められたことから、一般毒性に対する無毒性量は雌雄で 200 mg/kg 体重であると考えられた。神経毒性は認められなかった。（参照 27）

10. 眼・皮膚に対する刺激性及び皮膚感作性試験

NZW ウサギを用いた眼刺激性試験及び皮膚刺激性試験が実施された。眼に対して軽度の結膜発赤及び浮腫が認められたが、点眼 48 時間後には消失した。皮膚に対する刺激性は認められなかった。（参照 28、29）

Hartley モルモットを用いた皮膚感作性試験（Maximization 法）が実施された。皮膚感作性は認められなかった。（参照 30）

11. 亜急性毒性試験

(1) 90 日間亜急性毒性試験（ラット）

Fischer ラット（一群雌雄各 10 匹）を用いた混餌（原体：0、30、60、120 及び 600 ppm：平均検体摂取量は表 29 参照）投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。なお、0 及び 600 ppm 投与群については別途回復群を設け、4 週間の回復期間が設定された。

表 29 90 日間亜急性毒性試験（ラット）の平均検体摂取量

投与群		30 ppm	60 ppm	120 ppm	600 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	2.2	4.3	8.6	42.7
	雌	2.6	5.2	10.4	52.1

各投与群で認められた毒性所見は表 30 に示されている。

600 ppm 投与群の雌雄で甲状腺ろ胞上皮細胞の細胞質内空胞化が認められた。これらは、上皮細胞が肥大し、ろ胞内部のコロイドは対照群と比べて染色性が減少していた。ただし、4 週間の回復期間中に、重篤度及び発生率ともに減少していたため、可逆性であると考えられた。

600 ppm 投与群の雄で心絶対及び比重量²並びに肝比重量増加、雌で心及び脾絶対重量増加がみられたが、これらの臓器における病理組織学的検査では特に所見が認められなかった。

本試験において、600 ppm 投与群の雌雄で甲状腺ろ胞上皮細胞の細胞質内

² 体重比重量を比重量という（以下同じ）。

空胞化が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 120 ppm (雄 : 8.6 mg/kg 体重/日、雌 : 10.4 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 7、31、32)

表 30 90 日間亜急性毒性試験 (ラット) で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
600 ppm	・甲状腺ろ胞上皮細胞の細胞質内空胞化	・甲状腺ろ胞上皮細胞の細胞質内空胞化
120 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

(2) 90 日間亜急性毒性試験 (マウス)

ICR マウス (一群雌雄各 10 匹) を用いた混餌 (原体 : 0、50、150、450 及び 1,200 ppm : 平均検体摂取量は表 31 参照) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

表 31 90 日間亜急性毒性試験 (マウス) の平均検体摂取量

投与群		50 ppm	150 ppm	450 ppm	1,200 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	6.0	17.9	57.2	110
	雌	8.1	23.1	71.5	142

各投与群で認められた主な所見は表 32 に示されている。

1,200 ppm 投与群では、投与 6 週後に雄 3 例、雌 2 例が死亡し、その他の動物も悪液質を呈したため、全動物が投与 44 日にと殺された。

多くの臓器及び組織で認められた細胞質内空胞化あるいは空胞をもつリンパ球、組織球浸潤の電子顕微鏡観察により、これらには細胞質内層状封入体構造が確認され、この 2 つの病変における空胞は本質的に同等と考えられた。層状封入体構造は、リン脂質症の特徴的な所見と一致し、また、本剤はリン脂質症を起こす他の化合物と類似した化学構造を持っていることより、リン脂質症と同様のメカニズムで多くの臓器及び組織における細胞質内の空胞化をもたらすものと考えられた。

本試験において、150 ppm 以上投与群の雌雄でリンパ節のリンパ球空胞化及び壊死等が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 50 ppm (雄 : 6.0 mg/kg 体重/日、雌 : 8.1 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 7、32、33、63)

表 32 90 日間亜急性毒性試験（マウス）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
1,200 ppm*	<ul style="list-style-type: none"> ・運動量低下、被毛粗剛、呼吸促迫及び削瘦 ・RBC 低下 ・WBC、Neu、Lym 及び Mon 増加 ・Glu、BUN、T.Chol 及び TG 低下 ・Glob 増加 ・脾腫、リンパ節腫大 ・肝多発性壊死、肝臓の炎症 ・脾臓の炎症 ・リンパ節の炎症及び壊死 ・細胞質内空胞化（心筋、下垂体） ・胸腺萎縮 	<ul style="list-style-type: none"> ・運動量低下、被毛粗剛、呼吸促迫及び削瘦 ・体重低下及び体重増加抑制 ・RBC、Hb、Ht 及び MCHC 低下 ・WBC、Lym 及び Mon 増加 ・Glu 及び Alb 低下 ・ALP 及び Glob 増加 ・脾腫 ・肝多発性壊死、小葉中心性肝細胞肥大 ・脾臓の炎症、脾髄外造血亢進 ・リンパ節の炎症及び壊死 ・細胞質内空胞化（心筋、下垂体） ・胸腺萎縮 ・子宮頸管粘膜下組織球浸潤
450 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・体重低下及び体重増加抑制 ・Ht、MCV 及び MCH 低下 ・ALP、ALT 及び AST 増加 ・Alb 低下 ・肝絶対及び比重量増加 ・腎及び脾絶対及び比重量増加 ・壊死（胸腺リンパ球、骨髄、脾リンパ球） ・肺胞内マクロファージ浸潤 ・胃粘膜の炎症、組織球浸潤及び硝子滴沈着 ・舌の筋炎及び再生 ・骨格筋再生及び変性 ・膵腺房細胞空胞化及び萎縮 ・細胞質内空胞化及び空胞細胞集簇（肝細胞、舌、胸腺リンパ球、副腎の皮質網状層及び精巢上体上皮細胞） ・脾髄外造血亢進 	<ul style="list-style-type: none"> ・MCV 及び MCH 低下 ・Neu 増加 ・ALT 及び AST 増加 ・腎及び脾絶対及び比重量増加 ・リンパ節腫大 ・肺胞内マクロファージ浸潤 ・肝臓の炎症 ・胃粘膜の壊死、炎症、組織球浸潤及び硝子滴沈着 ・舌の筋炎及び再生 ・骨格筋再生及び変性 ・細胞質内空胞化及び空胞細胞集簇（脾及び胸腺のリンパ球、腎皮質尿細管、膵腺房細胞、舌、卵管、子宮、子宮頸管、膈上皮細胞及びクッパー細胞） ・壊死（胸腺のリンパ球、脾リンパ球） ・子宮内膜下組織球浸潤 ・リンパ節組織球浸潤
150 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・Hb 低下 ・胃粘膜石灰沈着及び壊死 ・リンパ節のリンパ球空胞化及び壊死 ・細胞質内空胞化及び空胞細胞集簇（リンパ節及び脾臓のリンパ球、腎皮質尿細管） ・小葉中心性肝細胞肥大 	<ul style="list-style-type: none"> ・肝絶対及び比重量増加 ・リンパ節のリンパ球空胞化及び壊死 ・胃粘膜石灰沈着 ・細胞質内空胞化（肝細胞、卵巣）
50 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

* : 1,200 ppm 投与群は投与 44 日に全例がと殺、解剖された。臓器重量は測定されていない。

(3) 90 日間亜急性毒性試験（イヌ）

ビーグル犬（一群雌雄各 4 匹）を用いた混餌（原体：雄は 0、150、300 及び 900/1,350 ppm、雌は 0、150、300 及び 900 ppm：平均検体摂取量は

表 33 参照) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

表 33 90 日間亜急性毒性試験 (イヌ) の平均検体摂取量

投与群		150 ppm	300 ppm	1,350/900 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	4.89	9.73	33.4
	雌	5.38	10.5	29.9

各投与群で認められた主な所見は表 34 に示されている。

1,350 ppm 投与群の雄 1 例が、投与 5 週時に瀕死状態に陥ったため切迫と殺されたため、この群の投与量は投与 38 日より 900 ppm に変更された。この 1 例は、死亡に先立って立位姿勢が保持できなくなった。

900 ppm 投与群の雌 1 例では、ALP が増加し、肝クッパー細胞増生と小肉芽腫が観察された。900 ppm 投与群の雌雄でみられた脾及び肝絶対及び比重量増加は、これらの臓器における実質細胞の細胞質空胞化に伴うものであった。

本試験において、300 ppm 以上投与群の雌雄で諸臓器での細胞質内空胞化及び空胞細胞集簇 (白脾髄、リンパ節等) 等が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 150 ppm (雄: 4.89 mg/kg 体重/日、雌: 5.38 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 7、32、34、63)

表 34 90 日間亜急性毒性試験 (イヌ) で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
1,350/900 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ 自発運動低下 (2/4 例) ・ 水様性の赤又は黒色便 (1/4 例) ・ 眼脂 ・ 体重低下又は体重増加抑制 ・ 摂餌量低下、消瘦 ・ RBC、網状赤血球数、Ht 及び Hb 低下 ・ WBC 及び Lym 減少 ・ Alb 及び A/G 比低下 ・ ALT、AST、Glob、T.Chol 及び TG 増加 ・ 心及び甲状腺比重量増加 ・ 脾、肝及び脾絶対及び比重量増加 ・ 脾臓の淡褐色化及び水腫 ・ 甲状腺の赤色点 ・ 胸腺萎縮 ・ 白脾髄の萎縮 ・ 肺の泡沫細胞集簇 ・ 胃粘膜萎縮 ・ クッパー細胞増生 ・ 動脈炎 (肺、精巣、精巣上体、大脳、 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重低下又は体重増加抑制 ・ 摂餌量低下 ・ 軟便 ・ Ht、Hb 及び MCH 低下 ・ PLT、WBC 及び Lym 減少 ・ Alb 及び A/G 比低下 ・ ALT、AST、Glob、T.Chol 及び TG 増加 ・ 甲状腺比重量増加 ・ 脾、肝及び脾絶対及び比重量増加 ・ クッパー細胞増生 ・ 動脈炎 (胸腔) ・ 白脾髄の萎縮 ・ 骨髄の限局性壊死/細胞減少 ・ 細胞質内空胞化 (肝細胞、直腸、脾臓房細胞、甲状腺 C 細胞、上皮小体)

	胸部脊髄、視神経及び胸腔) ・骨髄の限局性壊死 ・細胞質内空胞化 (盲腸、肝細胞、精巢精上皮細胞、甲状腺 C 細胞、上皮小体)	
300 ppm 以上	・細胞質内空胞化及び空胞細胞集簇 (白脾髄、リンパ節、口蓋扁桃、回腸、結腸、直腸及び膵腺房細胞)	・肺の泡沫細胞集簇 ・胃粘膜萎縮 ・細胞質内空胞化及び空胞細胞集簇 (白脾髄、リンパ節、口蓋扁桃、回腸、盲腸及び結腸)
150 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

(4) 90 日間亜急性神経毒性試験 (ラット)

Fischer ラット (一群雌雄各 10 匹、うち各群 5 匹は神経組織病理学検査用) を用いた混餌 (原体: 0、30、60、120 及び 600 ppm: 平均検体摂取量は表 35 参照) 投与による 90 日間亜急性神経毒性試験が実施された。

表 35 90 日間亜急性神経毒性試験 (ラット) の平均検体摂取量

投与群		30 ppm	60 ppm	120 ppm	600 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	2.2	4.3	8.6	42.7
	雌	2.6	5.2	10.4	52.1

薄束核領域及び脳下垂体後葉の軸索膨化、中脳、ガッセル神経節、腓骨神経、脊髄神経根及び延髄の錐体における神経線維の変性、片側性の網膜及び視神経の萎縮、角膜又は隣接血管の鈣質化が 600 ppm 投与群の雌雄にみられたが、対照群にも同様の頻度でみられたため、投与との関連性は考えられなかった。

本試験において、いずれの投与群でも投与の影響は認められなかったことから、神経毒性の無毒性量は雌雄とも本試験の最高用量 600 ppm (雄: 42.7 mg/kg 体重/日、雌: 52.1 mg/kg 体重/日) であると考えられた。神経毒性は認められなかった。(参照 35)

1.2. 慢性毒性試験及び発がん性試験

(1) 1 年間慢性毒性試験 (イヌ)

ビーグル犬 (一群雌雄各 4 匹) を用いた混餌 (原体: 0、50/60、100/120、300/360 ppm³: 平均検体摂取量は表 36 参照) 投与による 1 年間慢性毒性試験が実施された。

³ 試験開始当初は 0、50、100 及び 300 ppm であったが、13 週時に体重増加を理由に給餌量を減じたため、最終投与量は 0、60、120 及び 360 ppm となった。

表 36 1年間慢性毒性試験（イヌ）の平均検体摂取量

投与群		50/60 ppm	100/120 ppm	300/360 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	1.44	2.68	8.46
	雌	1.33	2.72	8.22

各投与群で認められた毒性所見は表 37 に示されている。

投与 26 週時に、雄のすべての投与群において Eos の有意な低下が、雌の 300/360 ppm 投与群において RBC の有意な増加が認められたが、一過性的の変化であり、検体投与に関連するものではないと考えられた。

本試験において、300/360 ppm 投与群の雌雄で空胞細胞集簇（白脾髄、リンパ節等）等が認められたことから、無毒性量は雌雄で 100/120 ppm（雄：2.68 mg/kg 体重/日、雌：2.72 mg/kg 体重/日）であると考えられた。（参照 7、32、36）

表 37 1年間慢性毒性試験（イヌ）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
300/360 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ TG、AST 及び ALT 増加 ・ 細胞質内空胞化及び空胞細胞集簇（白脾髄、腸間膜リンパ節、口蓋扁桃、回腸、盲腸、結腸及び直腸） ・ 動脈炎（精巣上体） ・ 上皮小体上皮細胞空胞化 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 甲状腺絶対及び比重量増加 ・ 細胞質内空胞化及び空胞細胞集簇（白脾髄、頸部リンパ節、腸間膜リンパ節、口蓋扁桃） ・ 動脈炎（大脳髄膜）
100/120 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

（2）2年間慢性毒性/発がん性併合試験（ラット）

Fischer ラット（一群雌雄各 65 匹）を用いた混餌（原体：0、50、200、500 及び 1,000 ppm：平均検体摂取量は表 38 参照）投与による 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験が実施された。

表 38 2年間慢性毒性/発がん性併合試験（ラット）の平均検体摂取量

投与群		50 ppm	200 ppm	500 ppm	1,000 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	2.4	9.5	24.1	49.4
	雌	3.0	12.0	30.1	62.8

各投与群で認められた毒性所見は表 39 に示されている。

1,000 ppm 投与群では、雌雄ともに死亡率が増加（雄：80%、雌：60%）し、最大耐量を超えたと判断されたため、それぞれ投与 714 及び 611 日に全例がと殺された。

腫瘍性病変の統計学的に有意な増加は認められなかった。

本試験において、200 ppm 以上投与群の雌雄で甲状腺ろ胞上皮細胞空胞化

等が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 50 ppm（雄：2.4 mg/kg 体重/日、雌：3.0 mg/kg 体重/日）であると考えられた。発がん性は認められなかった。（参照 7、32、37、63）

表 39 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験（ラット）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
1,000 ppm (雄：714 日、 雌：611 日に と殺)	<ul style="list-style-type: none"> ・死亡又は切迫と殺 ・体重低下及び体重増加抑制 ・消瘦、呼吸速迫、外陰部の汚れ ・BUN、Cre 及び AST 増加 ・TG 及び T.Bil 低下 ・脾及び腎絶対及び比重量増加、肝比重量増加 ・胸水 ・心筋の変性 ・咽頭の細網内皮系細胞集簇及び筋線維変性 ・肺、前立腺及び甲状腺の炎症 ・腸間膜リンパ節の細網内皮系細胞集簇 	<ul style="list-style-type: none"> ・死亡又は切迫と殺 ・体重低下及び体重増加抑制 ・消瘦、呼吸速迫、外陰部の汚れ ・WBC 増加 ・BUN、AST 及び ALP 増加 ・副腎、肝及び脾絶対及び比重量増加 ・胸水 ・心筋の変性 ・咽頭の細網内皮系細胞集簇、筋線維変性 ・腎尿細管空胞化 ・腸間膜脂肪組織萎縮 ・脾細網内皮系細胞集簇、髓外造血亢進 ・腺胃粘膜の変性及び再生（12 カ月） ・腸間膜リンパ節の細網内皮系細胞集簇
500 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・Glob、ALP 及び血中リン増加 ・心及び甲状腺絶対及び比重量増加 	<ul style="list-style-type: none"> ・Glob 及び T.Chol 増加 ・心、甲状腺、卵巣及び腎絶対及び比重量増加 ・甲状腺壊死 ・肺及び甲状腺ろ胞細胞炎症
200 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・甲状腺ろ胞上皮細胞空胞化 	<ul style="list-style-type: none"> ・甲状腺ろ胞上皮細胞空胞化 ・肝多発性類洞拡張
50 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

(3) 18 カ月間慢性毒性/発がん性併合試験（マウス）

ICR マウス（一群雌雄各 70 匹）を用いた混餌（原体：0、25、80 及び 360 ppm：平均検体摂取量は表 40 参照）投与による 18 カ月間慢性毒性/発がん性併合試験が実施された。

表 40 18 カ月間慢性毒性/発がん性併合試験（マウス）の平均検体摂取量

投与群		25 ppm	80 ppm	360 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	3.4	11.4	50.9
	雌	4.3	13.8	67.0

各投与群で認められた毒性所見は表 41 に示されている。

360 ppm 投与群の雌で死亡率が増加し、投与 54 週時の死亡率が 60% となったため、投与 455 日に全例がと殺された。

腫瘍性病変の統計学的に有意な増加及び早期化は認められなかった。

本試験において、360 ppm 投与群の雌雄で肺マクロファージ集簇等が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 80 ppm (雄: 11.4 mg/kg 体重/日、雌: 13.8 mg/kg 体重/日) であると考えられた。発がん性は認められなかった。(参照 7、32、38)

表 41 18 カ月間慢性毒性/発がん性併合試験 (マウス) で認められた毒性所見

投与量	雄	雌
360 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ 外陰部の汚れ ・ 体重増加抑制、摂餌量低下 ・ Ht 及び Hb 低下 ・ WBC 増加 ・ 血中カルシウム、TP 及び Alb 低下 ・ AST 増加 ・ 脾絶対及び比重量増加 ・ 腎近位尿細管変性及び再生 ・ 腺胃部粘膜の過形成及び炎症 ・ 前胃粘膜過角化症及び過形成 ・ 細胞質内空胞化及び空胞細胞集簇 (腸間膜リンパ節マクロファージ、脾腺房細胞、上皮小体及び精巣上体上皮細胞) ・ 腸間膜リンパ節洞内組織球症 ・ 肺マクロファージ集簇 ・ 舌及び骨格筋ミオパチー 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 死亡又は切迫と殺 (全例) ・ 全身衰弱を伴う耳介皮膚炎、流涙、削瘦、外陰部被毛汚れ及び被毛粗剛 ・ 体重増加抑制、摂餌量低下 ・ Ht 及び Hb 低下 ・ WBC 増加 ・ 血中リン、BUN 及び ALT 増加 ・ Alb 低下 ・ 脾及び肝絶対及び比重量増加 ・ 腺胃部粘膜の過形成及び炎症 ・ 細胞質内空胞化及び空胞細胞集簇 (腸間膜リンパ節マクロファージ、副腎、子宮頸部粘膜細胞、子宮粘膜上皮細胞、卵管粘膜上皮細胞、膣粘膜、卵巣、脾腺房細胞、上皮小体) ・ 腸間膜リンパ節洞内組織球症 ・ 肺マクロファージ集簇 ・ 舌のミオパチー
80 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

(4) 18 カ月間発がん性試験 (マウス) (補足試験)

マウスを用いた 18 カ月慢性毒性/発がん性併合試験①[12. (3)]において、360 ppm 投与群の雌では、投与 54 週時に死亡率が 60%を超えたため、補足試験として、ICR マウス (一群雌雄各 60 匹) を用いた混餌 (原体: 0、8 及び 240 ppm: 平均検体摂取量は表 42 参照) 投与による 18 カ月間発がん性試験が実施された。なお、病理組織学的検査は、雌の対照群及び 240 ppm についてのみ実施された。

表 42 18 カ月間発がん性試験 (マウス) の平均検体摂取量

投与群		8 ppm	240 ppm
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	1.1	32.7
	雌	1.3	41.5

各投与群で認められた主な所見は表 43 に示されている。