

## ネオニコチノイド系農薬ジノテフランのCD-1マウスによる経口毒性試験

多田 幸恵<sup>a</sup>, 田中 豊人<sup>a</sup>, 鈴木 俊也<sup>a</sup>, 猪又 明子<sup>b</sup>, 守安 貴子<sup>b</sup>

ネオニコチノイド系農薬ジノテフランは、稲、野菜、果実等に使用されるほか、動物用医薬品としても使用される。ジノテフランは近年急激に出荷量が増加しているが、これまで哺乳類におけるジノテフランの行動観察の報告は無く、安全性に関しても公表された知見は極めて少ない。今回、マウスを用いたジノテフランの反復投与試験を実施し、併せて行動観察を行った。

雌雄のCD-1マウス各40匹を5週齢でそれぞれ4群に分け、0（対照群）、22、44及び88 mg/kg体重のジノテフランを、10 mL/kg体重の投与容量で、1日1回、週5日間、4週間にわたり、体重測定後胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与2週間後に多様式T型水迷路試験を、投与3週間後に探索行動の運動活性を測定した。4週間の投与期間終了後、イソフルラン麻酔下で採血と殺し、血液・生化学及び病理学的検索を行った。

雌雄のマウスとも全群で死亡例はなく、体重及び摂餌量にジノテフラン投与の影響はみられなかった。血液検索で雌雄の投与群にWBCの減少傾向が認められた。また、雌雄の投与群で好中球数の用量相関性の減少がみられ、雌の高濃度群では有意な減少であった。生化学的検索、病理学的検索及び行動観察では投与の影響はみられなかった。これまで、哺乳動物の免疫系に及ぼすジノテフランの影響は報告されていないが、WBC及び好中球数の減少はジノテフランの免疫系への影響を示唆している。

**キーワード:** ジノテフラン, ネオニコチノイド, 殺虫剤, 経口毒性試験, CD-1マウス

### はじめに

有機リン系農薬の代替として開発されたネオニコチノイド系農薬は、ニコチン類似構造を有し、アセチルコリン系の神経情報伝達をかく乱する<sup>1)</sup>。

欧米では、2000年代より蜜蜂の大量失踪（いわゆる「蜂群崩壊症候群」（CCD）が問題となり、その原因は、感染症、ダニ、農薬等である可能性が指摘された。その一因と考えられるネオニコチノイド系農薬三種（イミダクロプリド、チアメトキサム、クロチアニジン）<sup>2-4)</sup>を、欧米では2013年12月から2年間使用禁止とし、現在も評価作業を継続中である。日本においてもネオニコチノイド系農薬と蜜蜂被害事例との関連性が指摘されているが<sup>5)</sup>、科学的根拠が確認されていないためネオニコチノイド系農薬の使用は禁止されていない。

ジノテフラン（IUPAC：(RS)-1-メチル-2-ニトロ-3-(テトラヒドロ-3-フリルメチル)グアニジン；CAS No.165252-70-0）はテトラヒドロフリル基を有する殺虫剤で、ニコチン性アセチルコリンレセプターに対する結合性は低いにもかかわらず、電気生理学的にはアゴニスト作用を示す特徴を有する。稲、野菜、果実等を対象に日本では2002年に登録された。欧米では未承認であるが、近年わが国では国内出荷量が急激に増加し、水稲用の無人ヘリコプター防除における農薬の使用実績（平成21～23年度全国平均）は、他のネオニコチノイド系農薬の5～85倍であった<sup>6)</sup>。日本における3才児の尿を分析したOsakaらの報告<sup>7)</sup>では、過半数のサ

ンプルからジノテフランが検出された。また、Haradaらの報告<sup>8)</sup>では、成人の尿を分析し算定した一日推定摂取量は、ネオニコチノイド系農薬中ジノテフランが最も高く、64.5 µg/dayであった。ネオニコチノイド系農薬に関しては、行動<sup>9, 10)</sup>、神経<sup>11, 12)</sup>、免疫<sup>13, 14)</sup>、肝臓<sup>15, 16)</sup>及び生殖毒性<sup>17)</sup>等、安全性に関する情報が報告されているが、ジノテフランの毒性報告は少ない<sup>9, 18)</sup>。

今回、マウスを用いたジノテフランの反復投与試験を実施し、併せて行動観察を行ったので結果を報告する。

### 実験方法

#### 1. 被験物質

被験物質として、ジノテフラン標準品（CAS No. 165252-70-0, Lot. ECH3280, 純度99.3%）を、注射用蒸留水（日本薬局方、大塚製薬株式会社、東京）に溶解後使用した。

#### 2. 実験動物及び飼育条件

雌雄のCrI:CD1(ICR)マウス各40匹を日本チャールス・リバー株式会社（神奈川）より4週齢で入手し、基礎飼料CE-2（日本クレア株式会社、東京）と限外ろ過処理した水道水を自由に摂取させ、1週間馴化飼育後、視診上健康なマウスを5週齢で試験に供した。各群の動物数は、雌雄各10匹とし、投与開始日の体重をもとに、体重別層化無作為抽出法により群分けを行った。動物は、バリアーシステ

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部生体影響研究科  
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

ム内の飼育室にて、ALPHA-dri (Shepherd Specialty Papers) 床敷きのプラスチックケージに1匹ずつ収容し、室温 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 5\%$ 、換気回数毎時10回(HEPAフィルター経由)、12時間蛍光灯照明の条件下で飼育した。

### 3. 投与用量の設定

投与用量は、ジノテフランの一日摂取許容量(ADI)が $0.22\text{ mg/kg}$ 体重/日であることから<sup>19)</sup>、その100倍量である $22\text{ mg/kg}$ 体重/日を最低用量とし、公比を2として0, 22, 44及び $88\text{ mg/kg}$ 体重/日の4群を設定した(それぞれ対照群、低、中及び高濃度群とする)。投与は、 $10\text{ mL/kg}$ 体重の投与容量で、1日1回、週5日間、4週間にわたり、体重測定後、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。対照群には注射用蒸留水を同様に投与した。一般状態を毎日観察し、摂餌量は週1回測定した。

### 4. 行動観察

多様式T型水迷路試験は、投与2週間後に、 $21^{\circ}\text{C}$ に水温調節した多様式T型水迷路を用い、錯誤回数と迷路脱出に要した時間を1日1回、3日間にわたり測定した。120秒経過後も脱出できなかったマウスは、測定者が脱出させ、結果は120秒として算出した。

探査行動の運動活性は、投与3週間後に、小動物行動測定装置SCANET CV-40(メルクエスト、富山)により測定し、測定時間は1分間のインターバルを10回、合計10分間とした。測定項目は、総移動距離(Total distance)、平行移動回数(Number of horizontal activity)、移動時間

(Movement time)、平均移動速度(Average speed)、平均移動時間(Average time of movement)、立ち上がり回数(Number of rearing)、立ち上がり時間(Rearing time)、平均立ち上がり時間(Average time of rearing)、排糞数(Number of defecation)及び排尿(Urination)の10項目とした<sup>20)</sup>。

### 5. 血液学的検査

投与期間終了後、イソフルラン麻酔下で心臓採血し、抗凝固剤EDTA-2K処理した試験管に血液を採取し、多項目自動血球計数装置(KX-21NV、シスメックス株式会社、兵庫)を用い、赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)、血色素量(HGB)、ヘマトクリット値(HCT)、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)及び血小板数(PLT)を測定した。血液塗沫標本は、May-Grünwald-Giemsa染色し、光学顕微鏡下で血球形態の観察と白血球分類を行った。

### 6. 生化学的検査

血漿を用い、自動分析装置(TBA-120FR、東芝メディカルシステムズ株式会社、東京)にて、血清総蛋白濃度(TP)、アルブミン/グロブリン比(A/G)、血糖値(GLU)、総コレステロール濃度(T-CHO)、トリグリ

セリド濃度(TG)、尿素窒素濃度(BUN)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性(AST)及びアラニンアミノトランスフェラーゼ活性(ALT)を測定した。

### 7. 病理学的検索

心臓採血後放血致死させ、解剖時の肉眼観察を行った。脳、胸腺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓及び精巣(または卵巣及び子宮)を摘出し、重量測定後、体重 $100\text{ g}$ あたりの相対重量を算出した。肺、唾液腺及び肉眼的に異常所見を示した部位を併せて摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、定法に従いパラフィン包埋し、薄切後ヘマトキシリン・エオジン染色し光学顕微鏡下で観察した。

本動物実験は、当センターの動物飼育施設において、動物実験委員会の承認の下、当センターの動物実験実施規程に基づいて実施した。実験動物の取扱いについては、Guide for the Care and Use of Laboratory Animalsの指針<sup>21)</sup>を遵守した。

### 8. 統計学的解析

各群の分散をBartlettの方法で検定し、等分散の場合はWilliams、不等分散の場合はWilliams-Shirlyの方法で有意差検定を行った(Excel統計Ver.7.0)。病理組織学的検索結果は、対照群との間でFisherの直接確立検定を行い、用量相関性が推察される結果についてはJonckheereの傾向検定を行った(StatLight, Yukms株式会社、東京)。危険率はいずれも5%とした。

## 結果及び考察

### 1. 一般状態、体重及び摂餌量

投与期間中、雌雄のマウスとも全群で死亡例はなく、一般状態についても特記すべき変化は認められなかった。試験期間中の体重の推移をFig. 1に示す。雌雄のマウスとも全期間を通じて対照群との間に有意な差はみられなかった。

試験期間中の平均1日摂餌量は、雄の対照群が $175.2\pm 3.2$ (Mean $\pm$ SE)、低濃度群 $175.3\pm 3.4$ 、中濃度群 $163.3\pm 3.0$ 及び高濃度群 $166.3\pm 3.3\text{ g/kg}$ 体重/日、雌の対照群が $169.0\pm 3.7$ 、低濃度群 $169.3\pm 4.8$ 、中濃度群 $170.4\pm 3.0$ 及び高濃度群 $164.1\pm 3.4\text{ g/kg}$ 体重/日で、雌雄のマウスとも対照群との比較で有意な差は認められなかった。

農薬・動物用医薬品評価書<sup>19)</sup>に掲載されたジノテフランの90日間混餌投与試験では、ラット(投与量:雄 $1620$ 、雌 $384\text{ mg/kg body weight/day}$ )及びイヌ(投与量:雄 $862$ 、雌 $58\text{ mg/kg body weight/day}$ )で体重増加抑制の報告がある。データ未公表のため投与後の体重変動が明らかでないが、雄と比較し雌で体重の増加抑制が認められている。今回の試験では高濃度群( $88\text{ mg/kg body weight/day}$ )の雌においても、体重の増加抑制はみられず、摂餌量にもジノテフラン投与の影響は認められなかった。

### 2. 行動観察

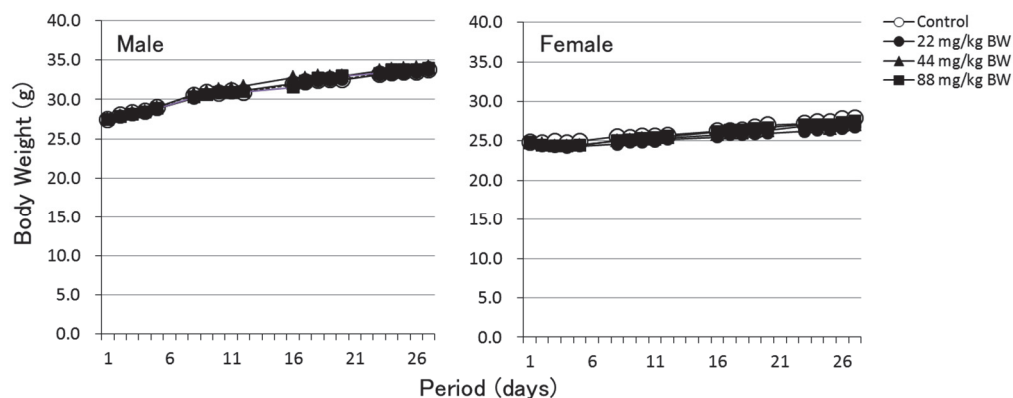


Fig. 1. Average Body Weight Changes in CD-1 Mice given Dinotefuran for 4 weeks. Values are the means of ten mice.

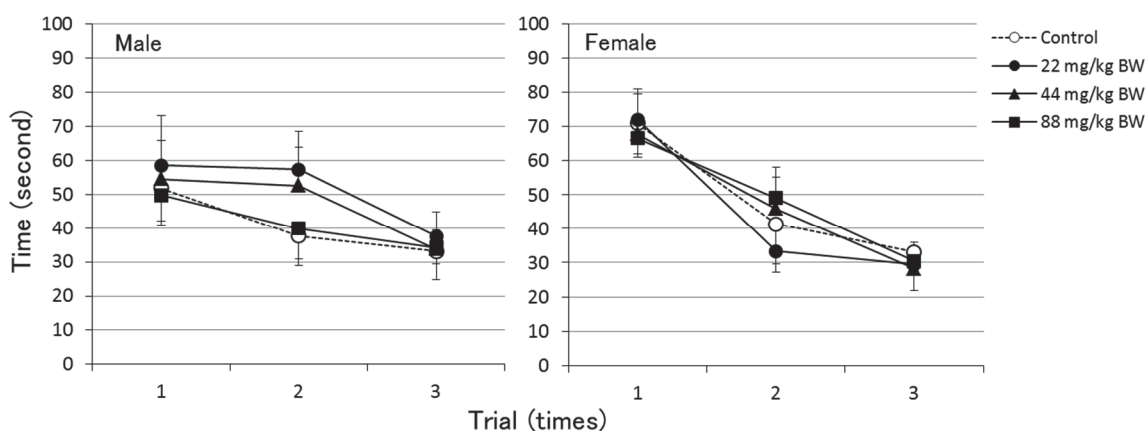


Fig. 2. Average Time of Water Maze Test in CD-1 Mice given Dinotefuran for 2 weeks. Values are the means of ten mice, and error bars denote S.E.

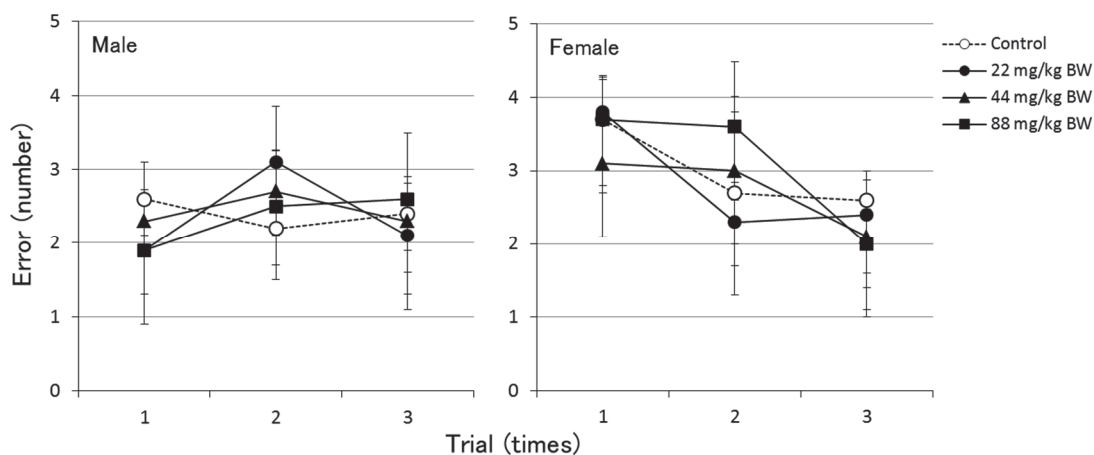


Fig. 3. Average Number of Errors of Water Maze Test in CD-1 Mice given Dinotefuran for 2 weeks. Values are the means of ten mice, and error bars denote S.E.

多様式T型水迷路試験で、雄の低及び中濃度群の2日目に、迷路脱出に要した時間の延長傾向がみられたが、両群とも対照群との間に有意な差は認められなかった (Fig. 2) . 水迷路脱出時の錯誤回数は、雄が平均1.9~3.1回、雌

が平均2.0~3.7回で、雄よりも雌で多い傾向を示したが、投与群・対照群間の比較で、投与による影響は認められなかった (Fig. 3) .

水迷路試験は学習及び記憶能力の測定が目的とされる<sup>22)</sup>.

Table 1. Motor Activity of Exploratory Behaviour in CD-1 Mice given Dinotefuran for 3 weeks

Item	Dose of dinotefuran (mg/kg body weight)			
	0 (control)	22	44	88
<i>Male</i>				
Effective number of mice	10	10	10	10
Total distance	1322.6±81.5 <sup>a</sup>	1394.4±132.9	1369.9±98.7	1419.9±120.5
Number of horizontal activity	126.8±2.8	124.9±5.5	125.0±3.5	120.9±3.5
Movement time	338.5±12.4	347.9±20.3	339.8±14.1	339.6±16.3
Average speed	3.88±0.13	3.92±0.20	4.00±0.19	4.12±0.15
Average time of Movement	2.67±0.08	2.77±0.08	2.72±0.10	2.81±0.12
Number of rearing	113.3±5.8	115.0±13.6	113.8±14.3	102.8±12.2
Rearing time	219.4±12.5	206.4±23.5	219.0±22.8	189.7±18.3
Average time of Rearing	1.96±0.09	1.84±0.09	1.98±0.10	1.91±0.12
Number of defecation	4.4±0.7	4.0±0.5	4.9±0.4	4.7±0.9
Urination	5/10	7/10	5/10	6/10
<i>Female</i>				
Effective number of mice	10	10	10	10
Total distance	1519.6±92.0	1434.0±85.5	1565.8±118.0	1594.8±127.8
Number of horizontal activity	120.8±2.9	127.5±2.7	124.5±3.6	123.8±3.1
Movement time	363.6±13.4	357.7±12.8	362.2±13.0	355.4±13.1
Average speed	4.18±0.18	3.99±0.15	4.27±0.20	4.44±0.24
Average time of Movement	3.04±0.16	2.81±0.11	2.93±0.13	2.89±0.13
Number of rearing	117.5±11.5	126.0±12.2	125.0±8.0	115.3±10.7
Rearing time	215.8±20.5	212.5±16.9	228.8±9.2	218.2±11.3
Average time of Rearing	1.86±0.13	1.72±0.08	1.87±0.08	1.98±0.12
Number of defecation	4.3±0.6	3.3±0.6	3.6±0.4	4.9±0.7
Urination	5/10	4/10	3/10	6/10

<sup>a</sup>Values are the means±standard errors.

ネオニコチノイド系農薬による蜜蜂の大量失踪の原因が記憶能力に関連するのであれば、水迷路試験の結果に何らかの影響がみられるのではないかと推察したが、今回の試験では、対照群を含む雌雄の全群において、方向を見失いパニック状態に陥る、あるいは無気力にその場に滞るマウスはなく、全群のマウスで、測定回を追うごとに脱出に要する時間が短縮された。最終回（3日目）の測定で脱出に120秒以上を要したマウスはなく、錯誤回数の増加も認められなかった。今回の試験では、マウスの学習機能及び記憶能力にジノテフラン投与の影響は認められなかった。

探索行動の運動活性の結果をTable 1に示す。運動活性は、移動距離、移動回数及び立ち上がり回数等を測定し、新奇環境における自発的活性や不安様行動などを評価する。新奇環境に初めておかれた実験動物は探索行動が増加し、移動や排泄等が増えるが、時間の経過と共に環境に慣れ、洗顔や身繕いのような安定した情動行動が増加し、移動行動も安定してくるとされる。今回の試験では、雌雄とも測定した全ての項目において、対照群と投与群との間に有意な差はみられなかった。情動性行動の指標とされる排糞、排尿についても、投与に関連した変化は認められなかった。

### 3. 血液学的検索

血液学的検索結果をTable 2に示す。雄では、中及び高濃度群でPLTの有意な増加がみられた。雌では、全投与群

でMCVの有意な減少、高濃度群でMCHの有意な減少が認められた。また、雄の低濃度群を除く雌雄の投与群でWBCの減少傾向がみられた。好中球数は雌雄とも用量相関性の減少を示し、雌の高濃度群では有意な減少であった。血液塗抹標本の観察では、雌雄いずれの群においても、赤血球、白血球及び血小板の形態に異常はみられなかった。

農薬・動物用医薬品評価書<sup>19)</sup>によると、ラットの90日間混餌投与試験で雄（投与量3160 mg/kg body weight /day）にリンパ球数比の増加、イヌの1年間混餌投与試験で雌（投与量512 mg/kg body weight /day）に好中球の減少、ラットの2年間混餌投与試験で雄（投与量991 mg/kg body weight/day）に好中球の減少が報告されている。血液性状におけるこれらの変化は、これまであまり注目されてこなかったが、今回の試験では、評価書における試験の投与用量よりも低用量でWBCの減少傾向及び好中球数の減少が認められた。好中球の減少は、複数の試験で認められた変化であり、偶発的なものとは考え難く、ジノテフランの影響によるものと思われる。

### 4. 生化学的検索

雄のマウスでは、全測定項目において投与による影響は認められなかった。雌では、投与群でGLUの減少傾向がみられ、高濃度群では有意な減少であった（Table 3）。その他の項目では投与による影響は認められなかった。

Table 2. Hematology in CD-1 Mice given Dinotefuran for 4 weeks

Item	Dose of dinotefuran (mg/kg body weight)			
	0 (control)	22	44	88
<i>Male</i>				
Effective number of mice	10 <sup>a</sup>	10	10	10
RBC (x 10 <sup>4</sup> /μL)	773.0±14.9 <sup>b</sup>	760.9±9.8	762.2±6.9	764.8±14.5
HGB (g/dL)	12.9±0.2	12.5±0.1	12.5±0.1	12.4±0.2
HCT (%)	42.2±0.8	40.9±0.5	40.9±0.3	41.1±0.7
MCV (fL)	54.6±0.6	53.8±0.5	53.7±0.4	53.7±0.3
MCH (pg)	16.7±0.2	16.4±0.2	16.4±0.1	16.3±0.1
MCHC (g/dL)	30.5±0.1	30.5±0.1	30.6±0.1	30.3±0.2
WBC (x 10 <sup>2</sup> /μL)	38.1±5.6	40.3±4.8	33.2±2.8	30.7±2.9
Lymphocyte (x 10 <sup>2</sup> /μL)	31.5±4.7	34.6±4.6	27.5±2.5	25.3±2.3
Neutrophil (x 10 <sup>2</sup> /μL)	5.16±1.37	4.59±0.69	4.50±0.68	3.93±0.73
Eosinophil (x 10 <sup>2</sup> /μL)	1.23±0.29	0.87±0.18	0.68±0.13	0.93±0.20
Basophil (x 10 <sup>2</sup> /μL)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Monocyte (x 10 <sup>2</sup> /μL)	0.25±0.09	0.25±0.14	0.49±0.11	0.58±0.18
PLT (x 10 <sup>4</sup> /μL)	107.5±5.1	108.1±3.8	120.5±2.6*	120.5±5.0*
<i>Female</i>				
Effective number of mice	10	10	10	9
RBC (x 10 <sup>4</sup> /μL)	745.4±14.7	761.9±12.7	738.8±14.6	743.2±28.6
HGB (g/dL)	12.5±0.2	12.5±0.2	12.2±0.2	12.1±0.4
HCT (%)	40.5±0.7	40.4±0.6	39.4±0.6	39.1±1.5
MCV (fL)	54.4±0.4	53.0±0.3*	53.4±0.5*	52.6±0.3*
MCH (pg)	17.8±1.0	16.4±0.1	16.5±0.2	16.3±0.2*
MCHC (g/dL)	30.9±0.2	30.9±0.2	31.0±0.2	30.9±0.3
WBC (x 10 <sup>2</sup> /μL)	42.3±6.4	33.8±2.6	35.0±4.1	29.6±1.9
Lymphocyte (x 10 <sup>2</sup> /μL)	35.9±5.7	28.8±2.2	30.8±3.8	25.8±1.6
Neutrophil (x 10 <sup>2</sup> /μL)	5.32±0.89	3.63±0.65	3.34±0.61	2.79±0.41*
Eosinophil (x 10 <sup>2</sup> /μL)	0.98±0.25	1.07±0.28	0.76±0.17	0.81±0.24
Basophil (x 10 <sup>2</sup> /μL)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Monocyte (x 10 <sup>2</sup> /μL)	0.12±0.06	0.35±0.08	0.09±0.05	0.11±0.06
PLT (x 10 <sup>4</sup> /μL)	103.4±3.3	98.7±3.1	95.0±2.9	94.7±6.2

<sup>a</sup>Effective numbers smaller than 10 occurred due to the failure of taking samples.

<sup>b</sup>Values are the means±standard errors.

\*Significantly different from the corresponding control values ( $p < 0.05$ , Williams's test).

Table 3. Plasma Biochemistry in CD-1 Mice given Dinotefuran for 4 weeks

Item	Dose of dinotefuran (mg/kg body weight)			
	0 (control)	22	44	88
<i>Male</i>				
Effective number of mice	10 <sup>a</sup>	10	10	9
TP (g/dL)	4.16±0.09 <sup>b</sup>	3.78±0.16	4.13±0.10	4.09±0.11
A/G	2.05±0.06	2.05±0.14	1.96±0.08	2.00±0.09
GLU (mg/dL)	235.0±21.3	242.6±18.7	225.0±16.8	234.9±26.3
T-CHO (mg/dL)	117.3±6.9	111.8±6.9	115.2±3.3	115.9±8.1
TG (mg/dL)	82.7±8.4	94.0±12.4	102.9±12.9	99.7±13.5
BUN (mg/dL)	23.3±1.6	22.8±1.1	25.6±1.5	25.6±0.9
AST (U/L)	79.6±10.0	74.2±13.1	84.8±8.6	62.8±5.3
ALT (U/L)	25.1±1.6	26.3±2.7	28.5±2.0	22.7±1.2
<i>Female</i>				
Effective number of mice	10	10	10	9
TP (g/dL)	3.82±0.14	4.01±0.14	3.70±0.22	3.73±0.27
A/G	2.65±0.30	2.57±0.23	2.76±0.36	2.44±0.05
GLU (mg/dL)	238.0±20.4	204.1±13.2	212.2±16.8	178.0±15.7*
T-CHO (mg/dL)	102.1±4.8	94.4±5.2	94.5±4.2	92.7±5.1
TG (mg/dL)	76.3±11.5	66.5±6.9	69.6±8.3	68.0±9.8
BUN (mg/dL)	21.8±1.5	22.9±1.4	22.1±1.4	21.4±1.9
AST (U/L)	89.5±12.1	77.6±5.1	93.9±15.8	89.0±8.7
ALT (U/L)	23.6±2.7	25.5±2.0	33.7±8.9	32.0±7.9

<sup>a</sup>Effective numbers smaller than 10 occurred due to the failure of taking samples.

<sup>b</sup>Values are the means±standard errors.

\*Significantly different from the corresponding control values ( $p < 0.05$ , Williams's test).

Table 4. Absolute and Relative Organ Weights in CD-1 Mice given Dinotefuran for 4 weeks

Item	Dose of dinotefuran (mg/kg body weight)			
	0 (control)	22	44	88
<i>Male</i>				
Effective number of mice	10	10	10	10
Initial body weight (g)	27.5±0.4 <sup>a</sup>	27.5±0.4	27.5±0.4	27.5±0.5
Final body weight (g)	33.7±0.7	34.1±0.9	34.9±0.9	34.6±1.0
Absolute organ weight (mg)				
Brain	502.2±4.8	500.0±4.7	499.4±7.9	511.0±6.9
Thymus	44.0±2.4	44.3±2.9	41.4±2.2	36.3±3.0
Heart	150.8±5.0	143.8±3.5	147.6±3.3	151.5±4.5
Spleen	81.3±5.6	90.3±7.1	89.7±5.4	92.1±5.1
Liver	1799.6±79.2	1830.8±71.7	1846.4±92.3	1970.0±110.1
Adrenal glands	4.14±0.34	4.37±0.20	4.42±0.35	4.76±0.32
Kidneys	513.3±21.9	517.5±21.8	526.2±19.7	544.4±21.2
Testes	236.5±8.4	236.0±9.7	235.8±9.7	273.8±11.2
Relative organ weight (mg/100g body weight)				
Brain	1494.9±30.6	1478.1±44.3	1445.2±34.0	1486.0±43.6
Thymus	130.2±6.5	130.9±9.7	119.3±6.3	105.4±8.5
Heart	446.4±6.6	422.8±7.0	424.3±8.8	437.9±7.5
Spleen	239.3±12.4	264.2±18.1	256.2±11.4	265.9±12.9
Liver	5320.2±137.5	5363.9±111.4	5286.9±206.4	5663.6±199.7
Adrenal glands	12.3±1.0	12.8±0.5	12.7±1.0	13.8±0.8
Kidneys	1517.2±34.5	1522.5±57.7	1507.4±34.5	1572.5±44.0
Testes	701.5±20.6	694.4±26.8	681.4±27.1	794.5±36.4
<i>Female</i>				
Effective number of mice	10	10	10	10
Initial body weight (g)	24.8±0.3	24.8±0.5	24.8±0.4	24.8±0.4
Final body weight (g)	28.4±0.7	27.7±0.6	28.0±0.6	28.4±0.6
Absolute organ weight (mg)				
Brain	508.0±5.6	496.8±5.4	503.0±7.0	497.2±3.9
Thymus	60.9±3.9	63.2±5.0	59.7±3.7	60.3±2.0
Heart	122.8±2.8	125.6±3.3	124.2±2.8	124.6±3.7
Spleen	98.4±5.5	100.6±8.2	99.8±5.0	106.5±6.9
Liver	1414.4±63.2	1371.9±53.4	1358.1±51.3	1365.1±57.5
Adrenal glands	8.70±0.77	8.51±0.42	8.13±0.57	7.41±0.45
Kidneys	368.6±7.0	357.7±12.6	347.1±13.1	350.6±6.7
Ovaries	9.00±0.46	10.28±0.76	9.40±0.67	9.28±0.61
Uterus	163.1±14.7	135.1±16.7	164.3±24.2	157.2±14.6
Relative organ weight (mg/100g body weight)				
Brain	1794.6±40.1	1800.7±27.9	1835.3±34.9	1758.5±28.8
Thymus	214.2±13.0	230.0±20.5	213.3±12.9	213.5±7.9
Heart	432.8±9.0	454.4±9.1	444.0±7.8	440.0±11.8
Spleen	345.2±14.4	362.7±26.6	355.7±14.2	376.1±24.5
Liver	4958.4±135.3	4957.0±143.0	4846.7±136.0	4826.2±203.8
Adrenal glands	30.7±2.7	30.8±1.6	29.1±2.0	26.1±1.4
Kidneys	1301.6±32.3	1292.4±32.1	1238.2±34.3	1241.1±32.8
Ovaries	31.7±1.5	37.2±2.7	33.5±2.3	32.7±2.2
Uterus	574.4±49.1	486.0±55.4	578.4±77.4	551.2±47.9

<sup>a</sup>Values are the means±standard errors.

## 5. 病理学的検索

絶対及び相対器官重量を、最終体重と共にTable 4に示す。雄の高濃度群で精巣重量の増加傾向がみられたが、対照群との比較で統計的に有意な差ではなかった。その他の器官においては雌雄とも、投与による影響は認められなかった。

解剖時に行った肉眼観察では、投与の影響によると思われる変化はみられなかった。

病理組織学的検索結果をTable 5に示す。雌雄のマウスともジノテフラン投与の影響と思われる変化は観察されなかった。自然発生病変として、肝臓で炎症性細胞浸潤、肝細胞の巣状壊死、腎臓で尿細管の好塩基変性、尿細管の拡

Table 5. Histopathology in CD-1 Mice given Dinotefuran for 4 weeks

Item	Dose of dinotefuran (mg/kg body weight)			
	0 (control)	22	44	88
<i>Male</i>				
Effective number of mice	10	10	10	10
Liver				
Inflammatory cell infiltration	4 <sup>a</sup>	4	5	3
Focal necrosis of hepatocytes	0	1	0	0
Kidney				
Tubular atrophy	0	3	2	3
Tubular dilation	1	3	1	1
Cyst	2	0	0	1
Inflammatory cell infiltration	3	2	1	1
Mineralization	0	0	0	0
Tubular regeneration	2	1	0	0
Adrenal gland				
Subcapsular cell hyperplasia	0	0	1	1
<i>Female</i>				
Effective number of mice	10	10	10	10
Liver				
Inflammatory cell infiltration	5	5	6	5
Focal necrosis of hepatocytes	0	0	0	2
Kidney				
Tubular atrophy	1	1	0	1
Tubular dilation	1	2	1	3
Cyst	0	2	0	0
Inflammatory cell infiltration	2	0	0	1
Mineralization	1	0	0	1
Tubular regeneration	0	4	1	1
Adrenal gland				
Subcapsular cell hyperplasia	0	0	0	0

<sup>a</sup>Number of mice with the lesion.

張, 炎症性細胞浸潤, また, 副腎で被膜下細胞の軽度過形成等が散見されたが, それらの発現頻度にジノテフラン投与による影響は認められなかった.

雌においても投与による影響は観察されなかった. 自然発生病変についても, その発現頻度に投与の影響は認められなかった.

今回の試験において, ジノテフラン投与群のマウスに WBCの減少傾向及び好中球数の減少が認められた. Priscoら<sup>13)</sup>は, クロチアニジンあるいはイミダクロプリドに曝露されたハチは感染症にかかり易くなっていることを実験的に示し, ミツバチの大量死がネオニコチノイド系農薬による免疫応答の低下に起因することを示唆した. ネオニコチノイド系農薬アセタミプリドの亜慢性投与が, ラットのマクロファージ機能及びリンパ球増生を低下させるとの報告もある<sup>14)</sup>. これまでジノテフランについては, 哺乳動物の免疫系に及ぼす影響は報告されていないが, 今回のWBC及び好中球数の減少は, ジノテフランの免疫系への影響を示唆していると考えられる.

Yasudaら<sup>23)</sup>の報告によると, 日本ミツバチは西洋ミツバチと比較し全般的に農薬に弱く, 中でもネオニコチノイド系農薬ジノテフランに最も感受性が高いとされる. これまでジノテフランは, 殺虫作用は強いがヒト等哺乳動物への有害作用の報告が少なく, 日本国内で大量に使用されてきた. しかし, 平成26年3月, 環境省は水環境保全に向け

た取組のための要調査項目リストを改定し, 水生昆虫(トンボ類)等への毒性があることを懸念し, ネオニコチノイド系農薬7種(ジノテフランを含む)を要調査項目として選定した<sup>24)</sup>. 農薬は散布時の暴露ばかりでなく, 散布後に公共水域に流出して水道原水に含まれる等の恐れがあり, ネオニコチノイド系農薬の環境及びヒトへの影響に対する関心が高まっている. 日本における3才児の尿<sup>7)</sup>及び成人の尿<sup>8)</sup>を分析した結果においても, ネオニコチノイド系農薬中ジノテフランの検出は最も高い. ジノテフランの生体影響に関しては, 平成26年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書で, ジノテフラン及びクロチアニジンの原体及び塩素処理後の抽出物が, 神経系に分化したPC12細胞(ラットの副腎髄質褐色腫から単離株化)に対して細胞致死毒性を示すとの報告もある<sup>18)</sup>. これまでの安全性試験は, 高濃度暴露に主眼が置かれていたが, 今後は, 実環境における低濃度暴露を考慮した試験, 特に免疫系に及ぼす影響の検討は必須であると思われる.

## ま と め

ネオニコチノイド系農薬ジノテフランの反復投与試験をCD-1マウスを用いて実施し, 併せて行動観察を行った.

雌雄のマウスとも全群で死亡例はなく, 体重及び摂餌量にジノテフラン投与の影響はみられなかった. 雌雄の投与群でWBCの減少傾向が認められた. また, 好中球数の用

量相関性の減少がみられ、雌の高濃度群では有意な減少であった。生化学的検索、病理学的検索及び行動観察においては投与の影響は認められなかった。これまでジノテフランの哺乳動物に対する免疫系に及ぼす影響は報告されていないが、今回のWBC及び好中球数の減少は、ジノテフランの免疫系への影響を示唆していると考えられる。

#### 文 献

- 1) Li, P., Ann, J. and Akk, G.: *J. Neurosci. Res.*, **89**, 1295-1301, 2011.
- 2) Whitehorn, P.R., O'Connor, S., Wackers, F.L., *et al.*: *Science*, **336**, 351-352, 2012.
- 3) Henry, M., Béguin, M., Requier, F., *et al.*: *Science*, **336**, 348-350, 2012.
- 4) Gill, R.J., Ramos-Rodriguez, O. and Raine, N.E.: *Nature*, **491**, 105-108, 2012.
- 5) 農林水産省：蜜蜂被害事例調査（平成25年度～27年度）の結果及び今後の取組について。  
<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouyaku/160707.html>（2017年11月20日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある）
- 6) 残留農薬研究所：農薬の大気経路による影響評価事業，農薬の大気経路による飛散リスク評価・管理対策中間報告書。  
[https://www.env.go.jp/water/dojo/noyaku/hisan\\_risk/hyoka\\_jigyuu/interirm\\_rep/main.pdf](https://www.env.go.jp/water/dojo/noyaku/hisan_risk/hyoka_jigyuu/interirm_rep/main.pdf)（2017年11月20日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある）
- 7) Osaka, A., Ueyama, J., Kondo, T., *et al.*: *Environ. Res.*, **147**, 89-96, 2016.
- 8) Harada, K.H., Tanaka, K., Sakamoto, H., *et al.*: *PLoS One*, **10**, 1-16, 2016.
- 9) 山田敏郎, 山田和子, 和田直樹: *The Japanese Society of Clinical Ecology*, **21**, 10-23, 2012.
- 10) Williamson, S.M., Willis, S.J. and Wright, G.A.: *Ecotoxicology*, **23**, 1409-1418, 2014.
- 11) Yardimci, M., Sevgiler, Y., Rencuzogullari, E., *et al.*: *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, **65**, 387-398, 2014.
- 12) Cimino, A.M., Boyles, A.L., Thayer, K.A., *et al.*: *Environ. Health Perspect.*, **125**, 155-162, 2017.
- 13) Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **110**, 18466-18471, 2013.
- 14) Shakthi Devan, R.K., Prabu, P.C. and Panchapakesan, S.: *Drug Chem. Toxicol.*, **38**, 328-336, 2015.
- 15) Green, T., Toghil, A. and Lee, R.: *Toxicol. Sci.* **86**, 36-47, 2005.
- 16) Green, T., Toghil, A., Lee, R., *et al.*: *Toxicol. Sci.*, **86**, 48-55, 2005.
- 17) Tokumoto, J., Danjo, M., Kobayashi, Y., *et al.*: *J. Vet. Med. Sci.*, **75**, 755-760, 2013.
- 18) 平成26年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書，化学物質・農薬分科会，水道における水質リスク評価および管理に関する総合研究。  
<http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10901000-Kenkoukyoku-Soumuka/0000096223.pdf>（2017年11月20日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある）
- 19) 食品安全委員会農薬専門調査会：府食942号，農薬・動物用医薬品評価書ジノテフラン（第5版），2013年11月。
- 20) Tanaka, T.: *Toxicol. Ind. Health*, **28**, 697-702, 2012.
- 21) Institute for Laboratory Animal Research: *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th ed., National research council, 2011, National Academies Press, Washington DC.
- 22) OECD: 発達神経毒性試験，経済協力開発機構（OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン。  
<http://www.nihs.go.jp/hse/chem-info/oecd/tgj/tg426j.pdf>（2017年11月20日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある）
- 23) Yasuda, M., Sakamoto, Y., Goka, K., *et al.*: *J. Econ. Entomol.*, **110**, 447-452, 2017.
- 24) 「水環境保全に向けた取組のための要調査項目リスト」の改訂について。  
<http://www.env.go.jp/press/17989.html>（2017年11月20日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある）



**Oral Toxicity Study of the Neonicotinoid Pesticide Dinotefuran in CD-1 Mice**Yukie TADA<sup>a</sup>, Toyohito TANAKA<sup>a</sup>, Toshinari SUZUKI<sup>a</sup>, Akiko INOMATA<sup>a</sup>, and Takako MORIYASU<sup>a</sup>

The neonicotinoid pesticide dinotefuran is widely used in Japan. However, there are minimal data available on the adverse effects of dinotefuran in either experimental animals or humans. The present study, evaluated the oral toxicity of dinotefuran in CD-1 mice.

Overall, 40 male and 40 female, 5-week-old, CD-1 mice were administered 0 (control), 22, 44, or 88 mg of dinotefuran/kg body weight via oral gavage, once per day, 5 days per week, for 4 weeks. After 2 or 3 weeks of exposure, behavioral parameters were measured. After 4 weeks, the mice were sacrificed under isoflurane anesthesia, and hematological, biochemical, and pathological consequences were investigated.

There were no significant differences in body weight or food intake during the experimental period for either sex. Spatial learning memory or movement activity of exploratory behavior was not affected by dinotefuran. In the hematological study, white blood cells in the treated groups showed a tendency to decrease, and neutrophils in the female high-dose group significantly decreased compared with the corresponding control group. There were no treatment-related changes in the biochemical and pathological findings.

**Keywords:** dinotefuran, neonicotinoid, pesticide, oral toxicity study, CD-1 mice

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

