

ネオニコチノイド系農薬ジノテフランの CD-1 マウスによる次世代影響試験

雑賀 絢^a, 多田 幸恵^a, 中村 麻里^a, 北條 幹^a, 生嶋 清美^a, 前野 愛^a, 湯澤 勝廣^a,
長澤 明道^a, 久保 喜一^b, 安藤 弘^{bc}, 田中 和良^{bd}, 鈴木 仁^a, 猪又 明子^e, 守安 貴子^e

ネオニコチノイド系農薬は、世界中で稲作や野菜栽培などに広く使用されており、これまで乳汁や、胎盤を介して胎児へ移行することが報告されている。このことから、次世代への影響が懸念されているが、その知見は極めて少ない。先行研究のマウスへの 28 日間の経口投与で、好中球数に減少が見られたことから、今回、ジノテフランの飲水投与試験を実施し、次世代への影響、特に免疫系に注目して検討した。9 週齢の 28 匹の妊娠 CD-1 マウスを 3 群に分け、妊娠期及び授乳期、仔マウスには離乳後の発達期に、0 (対照群)、0.02 及び 0.2% のジノテフラン溶液を飲水投与した。出産時に産仔数及び一腹仔の重量等を測定し、投与終了後に親仔共に末梢血を血液学的検索と血液生化学的検索に供し、骨髄の白血球分画をフローサイトメーターで分析した。また、主要臓器及び免疫臓器について病理学的検索を行った。産仔数、胎児重量及び性比に群間の差はなく、体重及び臓器重量に投与による影響も見られなかった。血液生化学的検索では、グルコースが雄の仔マウスで用量依存的に有意に減少し、他の試験項目には顕著な差異は認められなかった。血液学的検索、フローサイトメトリー及び病理組織学的検索から、血液毒性あるいは免疫毒性に関連する変化も認められなかった。これまでマウスを用いてジノテフランの次世代影響を詳細に検討した報告は無く、本研究は貴重な情報提供になると考えられる。

キーワード: ジノテフラン, ネオニコチノイド系農薬, 次世代影響試験, CD-1 マウス

はじめに

ネオニコチノイド系農薬はニコチン性アセチルコリン受容体 (以下 nAChR と略す) に結合することで殺虫作用を有する農薬で、昆虫に対して高い選択性を有し、日本では 1990 年代以降に使用量が急増している。また、ネオニコチノイド系農薬は哺乳類の nAChR においても本来の神経伝達物質であるアセチルコリンの作用を抑制、増強するなど、かく乱作用が確認されている¹⁾。さらに、各種のネオニコチノイド系農薬は胎盤や乳汁への移行が認められており、近年、未発達な胎児・乳児への脳への作用が懸念されている²⁾。田中らはネオニコチノイド系農薬の一種であるクロチアニジンの³⁾、佐野らはアセタミプリドの⁴⁾ マウスを用いた次世代行動試験を実施し、仔マウスの行動に影響を及ぼすことを示した。一方で、ミツバチの大量失踪については、クロチアニジンの免疫系への影響が原因であることが示唆された⁵⁾。哺乳類の nAChR においても、神経系だけでなく免疫系にも多様な作用を持つと考えられているため⁶⁾、ネオニコチノイド系農薬の哺乳類への免疫系への影響が懸念される。

これまでに標的臓器に関わらず、ネオニコチノイド系農薬の生体影響を評価した論文は少ない。ネオニコチノイド系農薬の使用に警鐘を鳴らす研究者がいることや、日本

よりかなり規制の厳しい国があることを踏まえると、利用可能な毒性試験の情報を集積することは、作用機序の解明のためだけでなく、規制当局や一般消費者にも有用なことと思われる。

我々は先行研究において、現在最も出荷量の多いジノテフラン (IUPAC: (RS)-1-methyl-2-nitro-3-(tetrahydro-3-furylmethyl) guanidine; CAS No.165252-70-0) に注目し、マウスへの経口投与による一般毒性試験及び行動試験を実施した。その結果、行動毒性は認められなかったが、雌雄共に白血球数の減少傾向が認められ、特に好中球数に用量相関的に減少が見られた⁷⁾。

農薬・動物用医薬品評価書 (以下評価書と略す) によれば、ジノテフランについて、胎盤及び乳汁移行が認められている⁸⁾。また、日本における 3 才児の尿を分析した Osaka らの報告で、過半数のサンプルからジノテフランが検出された⁹⁾。一般に、胎仔期及び乳仔期の免疫系は成獣に比べ未発達で脆弱であるため、血液学的検索で見られた白血球の減少が、ジノテフランの妊娠期、授乳期及び発達期のばく露により増強されることが考えられた。そこで、今回、マウスを用いたジノテフランの飲水投与試験を実施し、次世代への影響を検討したので報告する。

^a 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

^b 当時: 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

^c 現所属: 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科

^d 現所属: 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部環境衛生研究科

^e 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

実験方法

1. 実験動物及び実験デザイン

雌雄のCrj:CD1 (CD-1マウス) 各30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、飼育室でプラスチック製の飼育ケージで1匹ずつ飼育した。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摂取させた。

実験デザインをFig.1に示す。9週齢まで馴化飼育後、雌雄1匹ずつを同居させ、交配させた。雌は交配後、雄と分離した日から毎日体重を測定した。28匹の妊娠した親マウスを対照群 (0%) 8匹、低濃度群 (0.02%) 及び高濃度群 (0.2%) 各10匹に群分けした。

親マウスは自然分娩させ、その仔を授乳させた。新生仔については、その出生時に産仔数、一腹仔の重さ及び性比を測定した。仔マウスは出生時を0日齢として、0, 4, 7, 14及び21日齢時に体重を1匹ずつ測定した。出産した仔数により、成長にばらつきが出るのを防ぐため、4日目に一腹に付き雌雄併せて8匹まで無作為に残し、その他はイソフルランの深麻酔下で安楽死させた。4週齢時に仔マウスを親マウスから離乳させた。その際、一腹に付き雌雄1匹ずつを無作為に残し、その他はイソフルランの深麻酔下で安楽死させた。

なお、本実験は、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に動物実験実施規定に基づいて実施した。実験動物の取り扱いについては、Guide for the Care and Use of Laboratory Animalsの指針を遵守した¹⁰⁾。

2. 被験物質の投与

親マウスには妊娠期間から授乳期まで、仔マウスには離乳後から免疫器官が発達する7週齢まで、被験物質として、ジノテフラン (純度98%以上, D5560, 東京化成工業株式会社) を限外ろ過水に溶解後、自由摂取させた。投与量は、これまでに行った亜急性毒性試験において、550 mg/kg体重/日で白血球数の減少が見られたことから、高濃度群の摂取量が550 mg/kg体重/日となるように0.2%に設定し、低濃度群はその10分の1の濃度の0.02%となるように設定した (成獣のマウスが一日に飲水する量を8 mLとした)。ジノテフランの水中光分解を防ぐため、給水瓶に遮光カバーを装着し、飼育ケージに設置した¹¹⁾。

毎日の摂水量を親マウスにおいては、妊娠期 (20日間)、授乳期 (28日間, 出産から離乳まで)、仔マウスは発達期 (離乳期から7週齢まで) を測定した。

3. 解剖及び試料採取

親マウスは離乳後、仔マウスは7週齢で飲水投与を終了し、3%のイソフルラン吸入麻酔下で心臓採血後、解剖に供した。胸腺、肝臓、腎臓、副腎及び脾臓を摘出し、臓器重量を測定した。各臓器の相対重量は体重100 g当たりの臓器重量として算出した。パイエル板、大腿骨を併せて摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

全血は抗凝固剤EDTA-2K処理した注射筒で血液を採取した。血漿は室温で30分間放置後、1,710 ×gで10分間冷却遠心することによって得た。

4. 血液学的検索

全血を採取後、速やかに多項目自動血球計数装置 (KX21N, 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。血液塗抹標本は、メイグリュンワルド・ギムザ染色し、光学顕微鏡下で血球形態の観察と白血球分画を行った。

5. 血液生化学的検索

血漿を用い、自動分析装置 (TBA-120FR, キヤノンメディカルシステムズ株式会社, 東京) にて、血漿総蛋白濃度 (TP)、アルブミン/グロブリン比 (A/G)、グルコース (GLU)、総コレステロール濃度 (T-CHO)、尿素窒素濃度 (BUN)、アスパラギン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。

6. 骨髄細胞中の白血球分画の分析

大腿骨の関節部分から23ゲージの注射針を挿入し、5 mLのPBSで骨髄細胞をシャーレ内へ押し出し、ピペッティングにより分散後、70 µmのメッシュを通し、溶血試薬 (バクtonディッキンソン, ニュージャージー州) で赤血球を溶血した。白血球をAPC-Cy-7標識抗CD45抗体 (バクtonディッキンソン, 以下のいずれの蛍光試薬も同様)、死細胞を7-AADで染色した後、PE標識抗CD19抗体 (B細胞で強く発現)、BV421標識抗CD11b抗体 (顆粒球及び単球などで強く発現) 及びAPC標識抗Ly-6G and Ly-6C (Gr-1) 抗体 (好中球及び単球で強く発現) と反応させ、フローサイトメーター (CytoFlex S; ベックマンコールター, カリフォルニア州) で計測・解析した。

7. 病理学的検索

摘出した臓器は、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、薄切後にヘマトキシリン・エオジン染色し光学顕微鏡下で観察した。

8. 統計学的解析

各分析項目については分散分析を行い、体重及び臓器重量についてはWilliamsの多重比較検定を、血液学的検索、血液生化学的検索、骨髄中の白血球分画の分析及び病理学的検索についてはShirley-Williamsの多重比較検定を用い、有意差検定を行った。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。

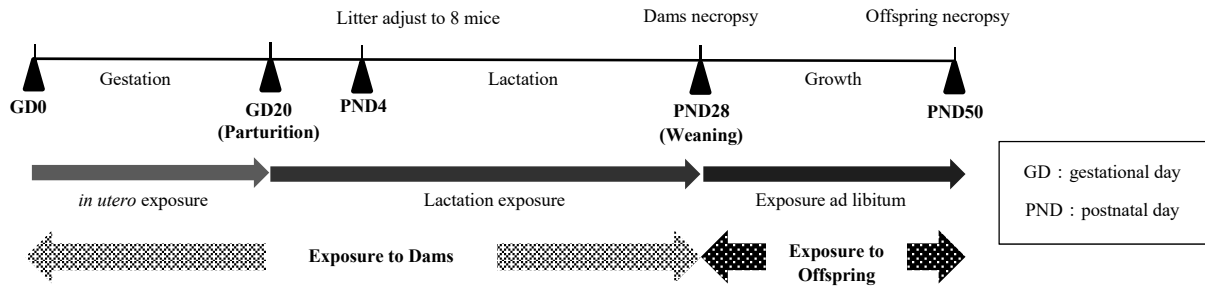


Fig. 1. Experimental Design

結果及び考察

1. 飲水量及び薬物摂取量

Table 1に実験期間中の飲料水摂取量及び被験物質摂取量を示す。親及び雌雄の仔共に全期間を通じてジノテフランによる飲水量の有意な差は見られなかった。したがって、胎児期から7週齢までの70日間のジノテフランの摂取量（妊娠期の母マウス及び離乳後の仔マウスの平均摂取量）は、おおむね計画通り、低用量群で59 mg/kg体重/日程度、高用量で560 mg/kg体重/日程度となった。

2. 仔マウスへの影響

Table 2に一腹の産仔数・一腹の仔の重量及び性比を示す。いずれもジノテフランの投与によると思われる影響は見られなかった。また出生後、授乳期間中及び離乳後の平

均仔体重をFig. 2に示す。出生後、雌雄共に対照群と比較し、差は見られなかった。

ジノテフランの評価書によると、複数のラットの2世代繁殖試験では、混餌投与（親：907～1,840, 雄仔：935～2,170, 雌仔：1,000～2,230 mg/kg体重/日）により、親仔共に体重増加抑制及び脾臓の重量減少が認められている⁸⁾。一方で、ラットの妊娠6日から15日までの強制経口投与による発生毒性試験では、1,000 mg/kg体重/日で親動物に体重増加抑制、摂餌量減少及び飲水量増加が見られたものの、胎児への影響は報告されていない。本実験で、体重推移に影響が見られなかったのは、妊娠中の化学物質摂取量は高濃度群においても計算上486 mg/kg体重/日で、評価書の報告よりも被験物質の負荷量が低かったためと推測される。

Table 1. Average Daily Fluid and Chemical Intakes of CD-1 Mice Administered with Dinotefuran in Drinking Water

		Dose Level of Dinotefuran (%)		
		0 (Control)	0.02 (Low)	0.2 (High)
Fluid intake (g/kgBW/day)				
<i>Dams</i>				
	Gestation	237 ± 14	251 ± 30	243 ± 24
	Lactation	996 ± 73	963 ± 80	964 ± 100
<i>Weanling Offspring</i>				
	Male	324 ± 46	304 ± 24	289 ± 28
	Female	353 ± 26	343 ± 25	318 ± 24
Chemical intake (mg/kg/day)				
<i>Dams</i>				
	Gestation	-	50.2 ± 5.9	486 ± 47
	Lactation	-	193 ± 16	1929 ± 210
<i>Weanling Offspring</i>				
	Male	-	60.7 ± 4.7	578 ± 55
	Female	-	68.6 ± 4.9	635 ± 47

Each value represents daily intake during each period (mean ± SD).

Table 2. Summary of Reproductive Data at Birth after Maternal Exposure of Dinotefuran

Parameter	Dose Level of Dinotefuran (%)		
	0 (Control)	0.02 (Low)	0.2 (High)
No. of dams	8	10	10
No. of litter	8	10	10
No. of live offspring	110	139	143
Average litter size	13.8 ± 1.5	14.4 ± 1.9	14.1 ± 2.8
Average litter weight (g)	22.6 ± 2.3	23.9 ± 4.2	23.6 ± 3.0
Sex ratio (male/female)	1.0 (55/55)	0.90 (66/73)	1.34 (82/61)

Each value represents the mean ± SD.

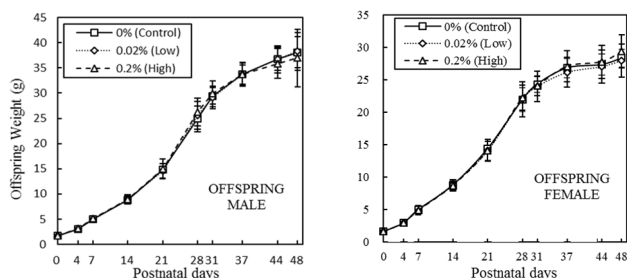


Fig. 2. Average Body Weight of Offspring during the Lactation and Growth Period of Administered with Dinotefuran. Each value represents the mean \pm SD.

3. 血液学的検索

血液学的検索結果をFig. 3 に示す。親マウスでは、対照群に比べて、ジノテフラン投与群の白血球の平均値はわずかに減少していたが、親仔ともに対照群と比較し、白血球数及び白血球分画に有意な差は見られなかった。ジノテフランの評価書には、イヌを用いた1年間の混餌による慢性試験において雌の投与群 (512 mg/kg体重/日) で好中球の減少が記載されている⁸⁾。また、イミダクロプリドを妊娠中に強制経口投与した仔ラットは、出生後の白血球数が有

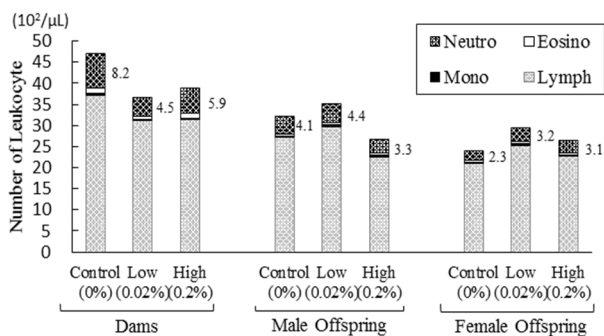


Fig.3. Effect of Dinotefuran Administration on Hematology in Dams and Offspring of CD-1 Mice.

意に減少したとの報告もある¹²⁾。本実験では親仔ともに変化が見られなかったが、種差や、投与量、投与期間等の原因が考えられる。一方、我々の既報の28日間の投与実験において見られた変化⁷⁾が、今回母体マウスで認められなかった。今回は妊娠マウスを用いたことも大きな条件の違いであるが、投与方法の違いが原因として考えられる。総ばく露量として飲水実験でも同程度に設定したものの、ばく露後の最高血中濃度 (Cmax) は、1日1回の強制経口投与のほうが高いことが推測され、そのことが血球数に影響した可能性が考えられる。

4. 血液生化学的検索

血清の血液生化学的検索結果をTable 3に示す。親及び雌の仔マウスの投与群は対照群との差は見られなかった。雄の仔マウスの投与群ではグルコース (GLU) が用量依存的に有意に減少した。ジノテフランの評価書によると、ラットによる90日間亜急性毒性試験において、雄の投与群 (3,160 mg/kg体重/日) でグルコースの減少が認められている⁸⁾。一方で、イミダクロプリドをヒト肝細胞等にばく露することにより、インスリンの働きが阻害され、グルコースの取り込みが減少した報告もある¹³⁾。このことから、ネオニコチノイド系農薬が、血中のグルコースの取り込みに、なんらかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。

5. 骨髄細胞中の白血球分画の分析

骨髄細胞中の白血球分画の分析結果をFig. 4に示す。既報の末梢血での好中球数の減少を踏まえ、今回は骨髄での好中球数やリンパ球数についても注目し、フローサイトメーターにより詳細に解析した。CD45陽性かつCD11b強陽性かつGr-1強陽性の細胞集団を好中球 (CD45⁺CD11b⁺Gr-1⁺)、CD45陽性かつCD19強陽性の細胞集団をB細胞 (CD45⁺CD19⁺) として解析した。親仔ともに、好中球とB細胞の割合に対照群との差は見られなかった。

Table 3. Plasma Biochemistry in CD-1Mice Administered with Dinotefuran

Parameter	Dose Level of Dinotefuran (%)					
	0 (Control)		0.02 (Low)		0.2 (High)	
<i>Dams</i>						
TP (g/dL)	4.0	± 0.4	4.0	± 0.4	4.1	± 0.2
A/G	2.9	± 0.5	2.7	± 0.4	2.6	± 0.4
GLU (mg/dL)	185	± 37	185	± 38	207	± 27
T-CHO (mg/dL)	116	± 22	113	± 18	120	± 15
BUN (mg/dL)	21.3	± 2.1	20.4	± 4.0	19.8	± 3.2
AST (U/L)	77	± 28	75	± 41	79	± 22
ALT (U/L)	33	± 7	37	± 17	33	± 11
<i>Male Offspring</i>						
TP (g/dL)	4.3	± 0.2	4.2	± 0.3	4.2	± 0.2
A/G	2.2	± 0.2	2.3	± 0.2	2.3	± 0.3
GLU (mg/dL) ^a	217	± 34	204	± 29	181	± 43
T-CHO (mg/dL)	150	± 37	135	± 25	140	± 26
BUN (mg/dL)	28.4	± 2.5	28.2	± 2.6	29.2	± 6.4
AST (U/L)	69	± 18	77	± 26	82	± 26
ALT (U/L)	33	± 11	31	± 10	28	± 5
<i>Female Offspring</i>						
TP (g/dL)	4.4	± 0.3	4.2	± 0.3	4.3	± 0.1
A/G	2.9	± 0.3	3.2	± 0.6	2.9	± 0.3
GLU (mg/dL)	174	± 57	159	± 54	179	± 50
T-CHO (mg/dL)	102	± 24	102	± 13	112	± 23
BUN (mg/dL)	24.1	± 3.7	26.0	± 6.7	25.3	± 5.4
AST (U/L)	79	± 12	88	± 28	80	± 17
ALT (U/L)	28	± 6	29	± 5	28	± 8

Each value represents the mean \pm SD.

^aSignificantly different from controls ($p > 0.05$, Jonckheere test)

評価書におけるイヌの好中球減少についても関連する免疫組織の著変は認められないため⁸⁾, ジノテフランの血液

毒性あるいは免疫毒性を強く示唆するものではなく, 反復投与による何らかのストレスの結果として現れた可能性もある. イヌでは雌のみで好中球の減少が認められ, 我々の28日間のマウスへの経口投与の結果⁷⁾でも雌での好中球の減少が比較的強かったため, 性差も考えられる.

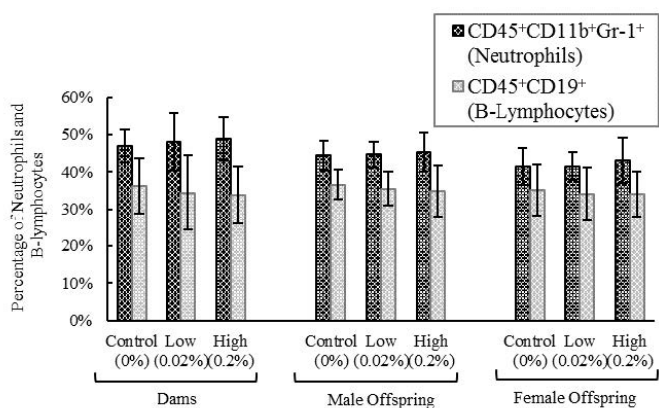


Fig.4. Percentages of Neutrophils and B-lymphocytes in the Bone Marrow Analyzes by Flow Cytometry in CD-1 Mice Administered with Dinotefuran.

6. 病理学的検索

絶対及び相対器官重量を, 最終体重とともにTable 4に示す. 解剖時に行った肉眼観察では, 親マウス及び雌雄の仔マウスとも, 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. ネオニコチノイド系農薬の一種であるクロチアニジンをラットに28日間強制経口投与した結果, 胸腺の重量減少や肝臓の重量増加が報告されている¹⁴⁾. 経口投与によるマウスのLD₅₀は, クロチアニジンにおいては雄で389 mg/kg体重, 雌で465 mg/kg体重, ジノテフランでは雄で2,450 mg/kg体重, 雌で2,280 mg/kg体重である.

Table 4-1. Absolute Organ Weight in CD-1 Mice Administered with Dinotefuran (mg)

Parameter	Dose Level of Dinotefuran (%)		
	0 (Control)	0.02 (Low)	0.2 (High)
Effective number of mice	8	10	10
<i>Dams</i>			
Final body weight(g)	35.0 ± 1.2	35.1 ± 1.6	35.9 ± 2.5
Adrenal gland	7.8 ± 0.7	7.2 ± 1.2	7.6 ± 1.1
Thymus	48 ± 13	39 ± 6	42 ± 5
Spleen	100 ± 10	101 ± 11	101 ± 17
Kidneys	439 ± 28	434 ± 36	430 ± 29
Liver	1562 ± 100	1585 ± 81	1585 ± 100
<i>Offspring Male</i>			
Final body weight(g)	34.3 ± 2.8	34.1 ± 3.4	33.2 ± 2.7
Adrenal gland	4.3 ± 0.5	4.5 ± 0.4	4.5 ± 0.8
Thymus	47 ± 10	46 ± 10	47 ± 14
Spleen	90 ± 13	85 ± 14	84 ± 18
Kidneys	511 ± 16	537 ± 71	523 ± 57
Liver	1452 ± 180	1439 ± 170	1388 ± 150
<i>Offspring Female</i>			
Final body weight(g)	26.1 ± 0.7	25.4 ± 3.5	25.7 ± 2.3
Adrenal gland	7.9 ± 2.1	8.4 ± 2.1	7.9 ± 1.4
Thymus	63 ± 14	51 ± 17	62 ± 12
Spleen	80 ± 20	80 ± 21	85 ± 18
Kidneys	343 ± 18	345 ± 43	347 ± 33
Liver	1051 ± 94	1047 ± 160	1061 ± 140

Each value represents the mean ± SD.

Table 4-2. Relative Organ Weight in CD-1 Mice Administered with Dinotefuran (mg/100g body weight)

Parameter	Dose Level of Dinotefuran (%)		
	0 (Control)	0.02 (Low)	0.2 (High)
Effective number of mice	8	10	10
<i>Dams</i>			
Adrenal gland	22.4 ± 2.1	20.6 ± 3.1	21.1 ± 2.0
Thymus	138 ± 37	113 ± 20	119 ± 14
Spleen	287 ± 27	288 ± 34	284 ± 54
Kidneys	1256 ± 95	1241 ± 120	1200 ± 80
Liver	4467 ± 360	4524 ± 210	4428 ± 350
<i>Male Offspring</i>			
Adrenal gland	12.5 ± 1.7	13.2 ± 1.8	13.4 ± 1.9
Thymus	139 ± 26	135 ± 31	142 ± 37
Spleen	261 ± 25	250 ± 33	252 ± 37
Kidneys	1498 ± 110	1577 ± 150	1583 ± 170
Liver	4237 ± 340	4218 ± 200	4181 ± 180
<i>Female Offspring</i>			
Adrenal gland	30.6 ± 7.3	33.7 ± 7.1	30.5 ± 6.0
Thymus	246 ± 55	204 ± 70	236 ± 34
Spleen	310 ± 69	319 ± 73	323 ± 50
Kidneys	1340 ± 60	1385 ± 150	1327 ± 81
Liver	4096 ± 220	4169 ± 250	4049 ± 260

Each value represents the mean ± SD.

Table 5. Histological Analysis of Major Organs of CD-1 Mice Administered with Dinotefuran

Parameter	Dam			Male Offspring			Female Offspring		
	0% (Control)	0.02% (Low)	0.2% (High)	0% (Control)	0.02% (Low)	0.2% (High)	0% (Control)	0.02% (Low)	0.2% (High)
Effective number of mice	8	10	10	8	10	10	8	10	10
Liver									
Inflammatory cell infiltration	6 ^a	7	7	5	7	6	5	6	8
Focal necrosis of hepatocytes	2	3	2	0	2	1	0	0	2
Kidney									
Inflammatory cell infiltration	0	1	2	1	2	2	0	0	1
Tubular atrophy	2	1	2	3	1	0	1	1	2
Tubular dilation	2	2	2	0	1	1	2	1	0
Tubular hypertrophy	1	1	1	0	1	0	2	1	0
Cyst	2	0	0	3	0	0	0	0	0
Tubular degeneration	1	0	2	1	0	0	2	2	3
Adrenal gland									
Subcapsular cell hyperplasia	3	3	7	0	0	0	0	0	0

^aNumber of mice with the lesion.

さらにADI値は、クロチアニジンは0.097 mg/kg体重/日、ジノテフランは0.22 mg/kg体重/日である。これらのことから、一般的にクロチアニジンの方がジノテフランより作用が強く、高濃度（30, 300 mg/kg体重/日）で一度に投与されていたため、影響が出たと考えられる。

顕微鏡による組織観察では、脾臓における白脾髄の割合、辺縁帯の増加あるいは減少、胸腺における皮質/髄質の構成及び細胞の壊死、パイエル板リンパ節の胚中心出現率、骨髄の骨髄球系細胞/赤芽球系細胞の割合等、免疫系器官の変化に着目したが、各投与群ともに、対照群と比較し変化は認められなかった。ジノテフランの代謝、排泄に関わりのある肝臓及び腎臓、副腎の組織観察では、Table 5に示した自然発生病変が散見されたが、それらの発現頻度にジノテフラン投与の影響は認められなかった。

ま と め

ネオニコチノイド系農薬ジノテフランを0.02%及び0.2%を含む飲水投与により（それぞれ約55及び550 mg/kg体重/日に相当）次世代影響試験をCD-1マウスを用いて実施した。

親マウス、仔マウスの体重及び飲水量にジノテフラン投与の影響は見られなかった。また、一腹の産仔数・性比も投与によると思われる影響は見られなかった。

既報の強制経口投与試験で認められた血液学的な変化は、今回、フローサイトメーターによる詳細な解析を併せて実施したものの、親仔共に確認されなかった。血液生化学的検査においては雄仔マウスで血漿中グルコースの用量依存的に有意な減少が見られた。病理学的検査においては、胸腺等の免疫臓器を含む主要臓器にジノテフラン投与の影響は認められなかった。今回の実験条件において仔マウスへの顕著な影響は確認されなかったが、ジノテフランのマウスの次世代影響を詳細に検討した報告はないため、本報は貴重な情報提供になると考えられる。

付 記

本研究の概要は第47回日本毒性学会学術年会、2020年6月、において発表した。

文 献

- 1) Li, P., Ann, J., Akk, G.: *J. Neurosci. Res.*, **89**, 1295, 2011.
- 2) 木村一黒田純子, 黒田洋一郎: *科学*, **83(7)**, 818-832, 2012.
- 3) Tanaka, T.: *Toxicol. Ind. Health*, **28(8)**, 697-707, 2012.
- 4) Sano, K., Inobe, T., Yang, J., et al.: *Front. Neurosci.*, **10**, 228-239, 2016.
- 5) Prisco, G. D., Cavaliere, V., Annoscia, D., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **110**, 18466-18471, 2013.
- 6) 川島紘一郎: *日薬理誌*, **127**, 368-374, 2006.
- 7) 多田幸恵, 田中豊人, 鈴木俊也, 他: *東京健安研七周年報*, **68**, 267-275, 2017.
- 8) 食品安全委員会農薬専門調査会: *農薬・動物用医薬品評価書ジノテフラン* (第6版), 2016年10月.
- 9) Osaka, A., Ueyama J., Kondo, T., et al.: *Environ. Res.*, **147**, 89-96, 2016.
- 10) 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.
- 11) 環境省 水・大気環境局 土壌環境課 農薬環境管理室: *水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準として環境大臣の定める基準の設定に関する資料*, 平成29年7月12日.
- 12) Gawade, L., Dadarkar, S. S., Husain, R., et al.: *Food Chem. Toxicol.*, **51**, 61-70, 2013.
- 13) Kim, J., Park, Y., Yoon, K. S., et al.: *J. Toxicol. Sci.*, **38**, 655-660, 2013.
- 14) Onaru, K., Ouno, S., Kubo, S., et al.: *J. Vet. Med. Sci.* **82(3)**, 360-372, 2020.

Two-Generation Toxicity Study of the Neonicotinoid Pesticide Dinotefuran in CD-1 Mice

Aya SAIGA^a, Yukie TADA^a, Mari NAKAMURA^a, Motoki HOJO^a, Kiyomi IKUSHIMA^a, Ai MAENO^a,
Katsuhiro YUZAWA^a, Akemichi NAGASAWA^a, Yoshikazu KUBO^a, Hiroshi ANDO^a, Kazuyoshi TANAKA^a,
Jin SUZUKI^a, Akiko INOMATA^a, and Takako MORIYASU^a

Neonicotinoid pesticides are used during the cultivation of rice and vegetables worldwide. Although there are some reports on the transfer of neonicotinoids to the fetus via the placenta or milk, little is known about neonicotinoid's transgenerational effects. We previously found a significant decrease in the number of neutrophils in the peripheral blood of mice after 28 days of oral gavage administration of dinotefuran, a neonicotinoid. In this study, we conducted a two-generation toxicity test with a focus on immunotoxicity. Twenty-eight pregnant, 9-week-old CD-1 mice were divided into 3 groups. They were given 0% (control), 0.02%, and 0.2% of dinotefuran in water during pregnancy, lactation, and offspring development. At birth, the offspring were counted and weighed. After the end of the dinotefuran administration, the dams and offspring were sacrificed. Their peripheral blood was cytologically and biochemically analyzed; the subsets of immune cells in their bone marrow were analyzed with flow cytometry. The main organs and immune organs underwent histopathological examination. No differences were observed in litter size, litter weight, or sex ratio in the treatment groups compared to the control. Also, the average body weight and organ weight of the dams and offspring in the treatment groups were not changed compared to the control group. There were no significant changes in the blood except for a decrease in the plasma level of glucose in the male offspring. In addition, histopathological tests revealed no significant immunotoxicity found in the blood of the mice treated with dinotefuran. This study is the first detailed evaluation of the effect of dinotefuran on the developmental immunotoxicity in mice.

Keywords: dinotefuran, neonicotinoid pesticide, two-generation toxicity, CD-1 mice

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan