

Table 4 *gpt*遺伝子突然変異頻度【実験2】

Treatment	Animal No.	Cm <sup>R</sup> colonies (x 10 <sup>5</sup> )	6-TG <sup>R</sup> and Cm <sup>R</sup> colonies	Mutant frequency (x 10 <sup>-5</sup> )	Mean ± SD
Control	101	4.18	3	0.72	0.41 ± 0.26
	102	7.61	2	0.26	
	103	7.74	2	0.26	
ES	201	8.69	12	1.38	1.65 ± 0.26
	202	6.66	11	1.65	
	203	7.88	15	1.90	
ES+β-NF+TBZ	301	3.24	6	1.85	1.86 ± 0.63
	302	7.25	18	2.48	
	303	9.77	12	1.23	
ES+β-NF	401	5.85	11	1.88	2.02 ± 0.90
	402	7.38	22	2.98	
	403	4.19	5	1.19	
ES+TBZ	501	6.93	17	2.45	1.83 ± 0.87
	502	5.45	12	2.20	
	503	6.03	5	0.83	

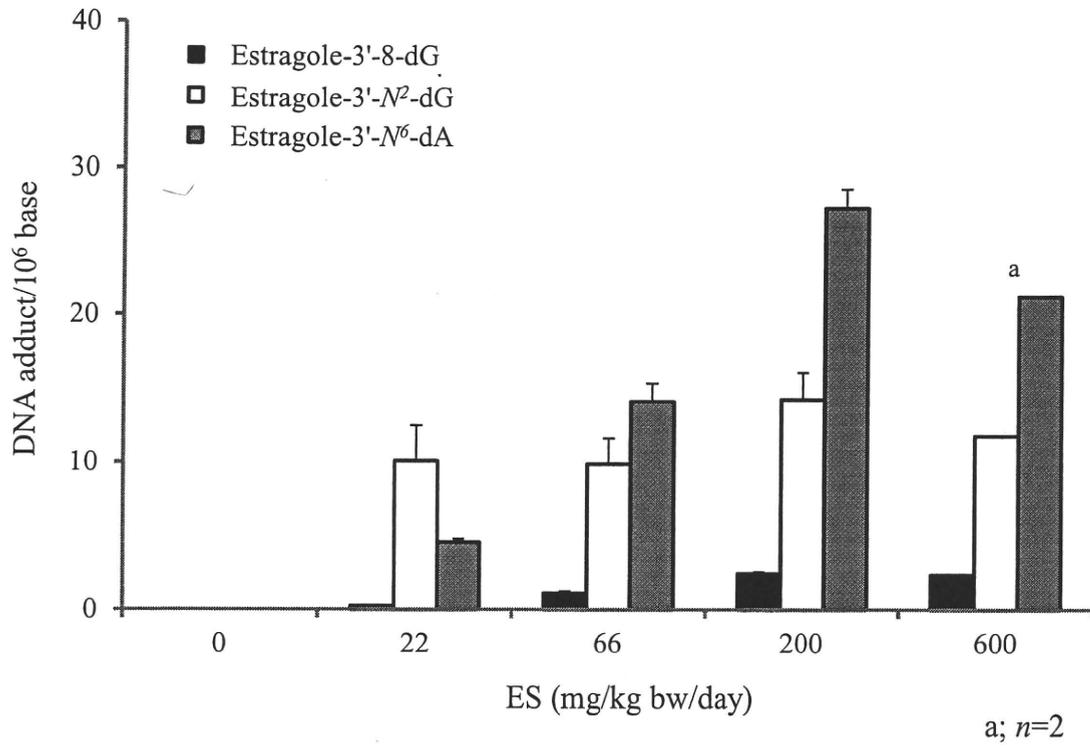


Fig. 1 ES特異的DNA付加体レベル

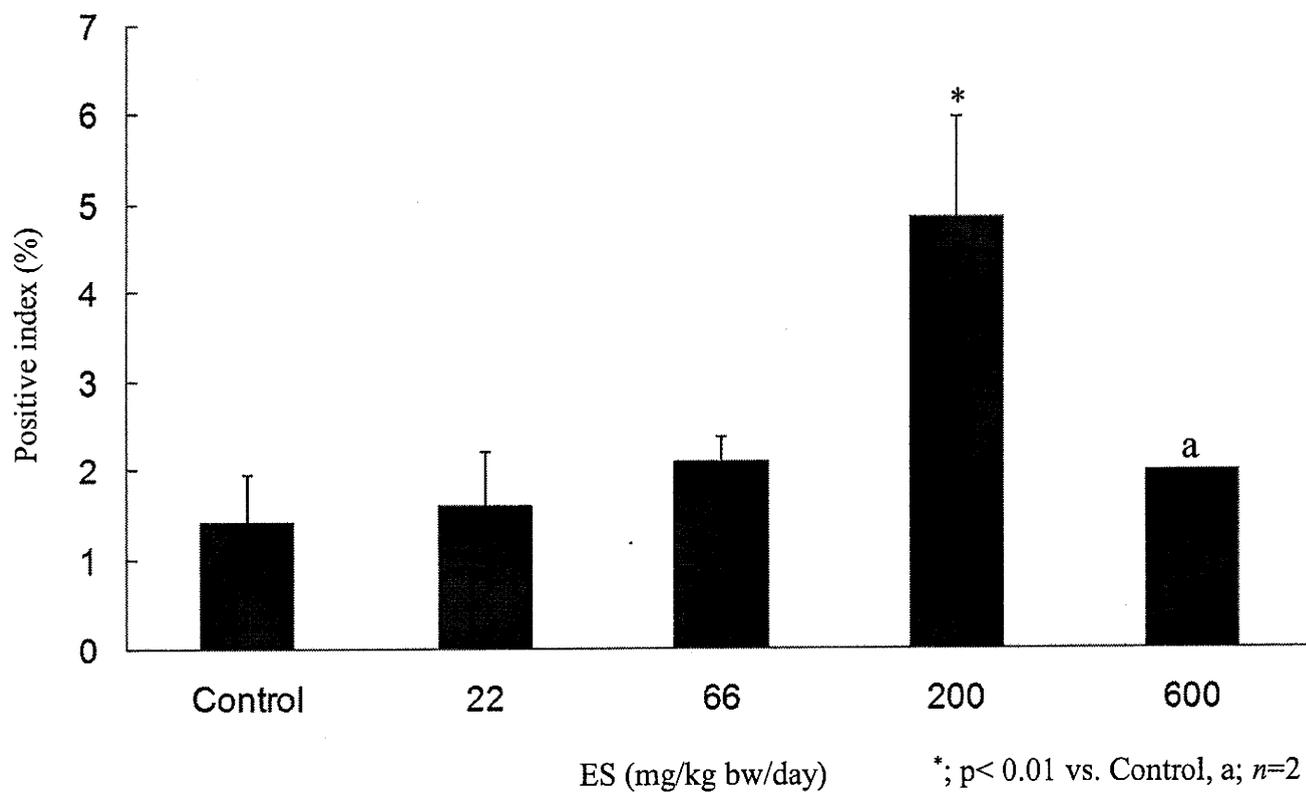


Fig. 2 PCNA陽性細胞率

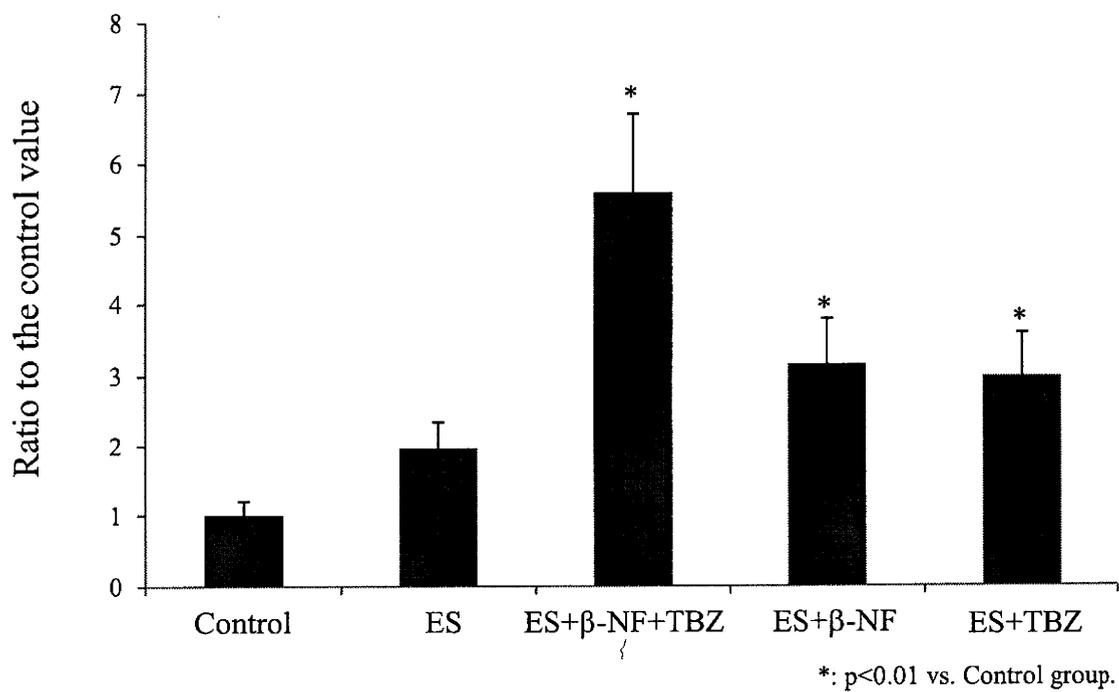
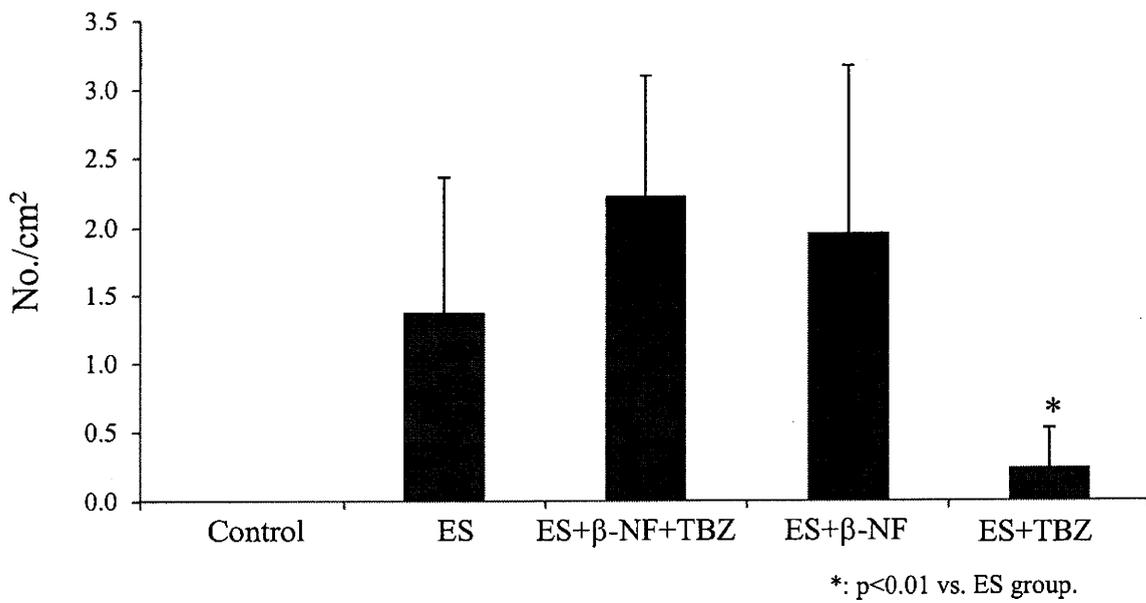


Fig. 3 *CYP1A2* mRNA発現レベル

## Number



## Area

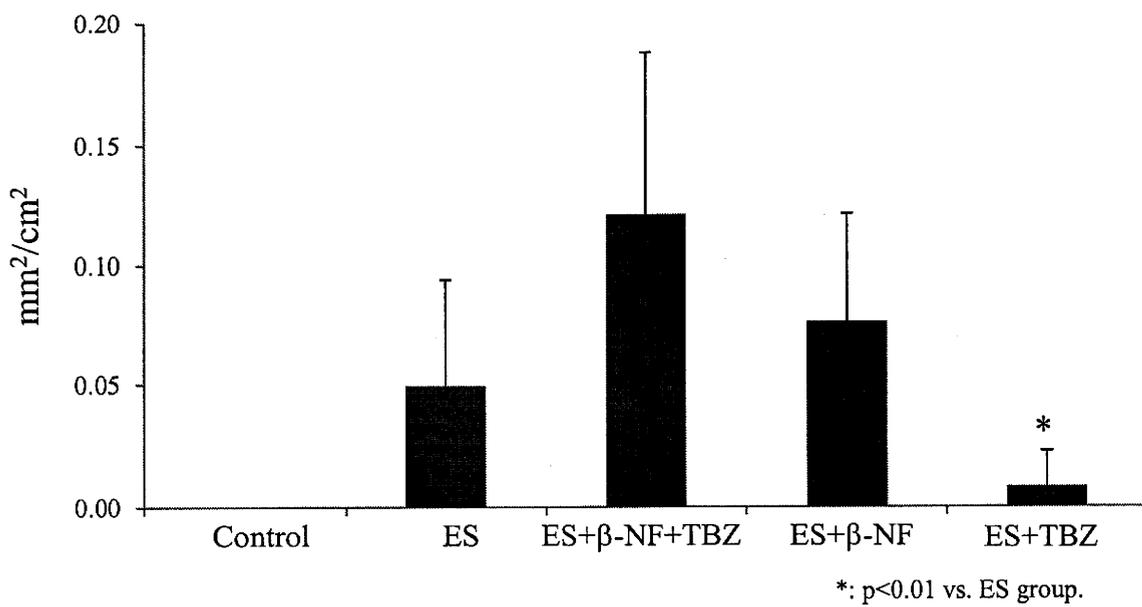


Fig. 4 GST-P陽性細胞巢の数及び面積

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

分担研究報告書

食品中の複数の化学物質による健康影響に関する調査研究

分担研究課題：食品中化学物質の発がん修飾に関する複合影響

研究分担者	西川 秋佳	国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験 研究センター長
研究協力者	石井 雄二	国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

コーヒーなどに含まれるカフェイン酸 (CA) は、強力な抗酸化力を有し、本剤及びその誘導体はがんに対する化学予防効果も期待されている。しかし、本研究班では CA と亜硝酸ナトリウム ( $\text{NaNO}_2$ ) を酸性条件下で反応させると活性酸素種 (ROS) が生成することを明らかにしている。本研究では、*in vivo* における CA と  $\text{NaNO}_2$  の酸化的ストレスを介した複合影響を検討した。6 週齢の雄性 F344 ラット 35 匹を、0.6% と 2.0% CA 及び 0.1% と 0.3%  $\text{NaNO}_2$  をそれぞれ組みあわせた併用投与群の 4 群、2.0% CA 及び 0.3%  $\text{NaNO}_2$  単独群ならびに対照群を合わせた計 7 群に配し、CA は粉末飼料に、 $\text{NaNO}_2$  は飲水に混じり、4 週間自由に摂取させた。病理組織学的検索の結果、肝臓において変化は認められなかったものの、前胃では過角化を伴う粘膜上皮の過形成が軽度に認められた。肝臓では CA と  $\text{NaNO}_2$  の複合反応で生成するベンゾキサジン誘導体が検出されたが、前胃粘膜及び肝臓 DNA 中の 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルならびに肝臓のチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) レベルに変化は認められなかった。これらの結果から、*in vivo* における CA と  $\text{NaNO}_2$  の複合反応の進行が明らかになったが、ROS 生成を介した複合影響は認められなかった。

A. 研究目的

食品中には、食品添加物、残留農薬、加熱調理過程で生成される発がん物質（ヘテロサイクリックアミンなど）、食品加工中に生じる非意図的生成物（アクリルアミドなど）など様々な化学物質が含まれており、ヒトはそれを長期的に摂取することから、化学物質の複合摂取を想定した毒性評価は急務である。これまで、本研究班では様々

な複合影響について *in vivo* 及び *in vitro* 試験系で評価を行ってきたが、*in vitro* における試験結果をそのままヒトに外挿することは困難であり、*in vivo* での再評価が必要である。本研究では、これまで「食品中の複数の化学物質による健康影響に関する調査研究」において報告された *in vitro* 試験系における複合影響について、*in vivo* 試験系で評価することを目的とし、平成 21

年度に中澤らが報告したカフェイン酸 (CA) と亜硝酸ナトリウム ( $\text{NaNO}_2$ ) の複合影響に注目した。

コーヒーなどに含まれる CA は、強力な抗酸化力を有し、本剤及びその誘導体はがんに対する化学予防効果も期待されている。しかし、CA と  $\text{NaNO}_2$  の併用は *in vitro* において弱いながらも変異原性を示すことが報告されており、酸性条件下において二剤の反応で生成する 1, 2-(4H)-benzoxazin-4-one (以下 BZX 誘導体) 及び 2-oxy-3-(3, 4-dihydroxyphenyl)-1, 2, 5-oxadiazole (以下 OXZ 誘導体) の関与が疑われている。さらに中澤らは、CA と  $\text{NaNO}_2$  を酸性条件下で反応させると活性酸素種 (ROS) が生成し、さらに反応生成物である BZX 及び OXZ 誘導体もそれぞれ ROS 生成能を有することを報告している。また、二剤を併用投与したラット肝臓で BZX 誘導体が検出されていることから、*in vivo* でも 2 剤の複合反応が進行すると考えられる。本研究では F344 ラットに種々の濃度の CA 及び  $\text{NaNO}_2$  を併用投与し、種々のフェノール性化合物と  $\text{NaNO}_2$  の併用投与によって粘膜の肥厚や潰瘍性病変が報告されている前胃と、BZX 誘導体が検出された肝臓において、酸化ストレスを介した複合影響の有無を検討した。

## B. 研究方法

【実験 1】動物は日本 SLC 社から 6 週齢の雄性 F344 ラット、35 匹を購入し実験に供した。

動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時 (オール

フレッシュ)、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 または 3 匹ずつ収納し、床敷は三共ラボサービス社 (東京) のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。

実験プロトコルを Fig. 1 に示す。CA は 0.6 及び 2.0% の濃度で粉末飼料に、 $\text{NaNO}_2$  は 0.1 及び 0.3% の濃度で飲水に混じ、それぞれを組み合わせた併用投与群の計 4 群と、2.0% CA 及び 0.3%  $\text{NaNO}_2$  単独群ならびに対照群を合わせた計 7 群に配し、4 週間自由に摂取させた。

試験期間中、飲水の交換は週 1 回、一般状態観察を連日実施した。また、体重および飲水量の測定は週 1 回行った。

4 週間の投与後、動物はイソフルラン麻酔下にて放血致死させ、肝臓および胃を採取し、肝重量を測定した。各動物の肝臓の一部は 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し、残りを酸化的 DNA 損傷の指標である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 測定と、脂質過酸化測定用サンプルとした。前胃は各群 5 匹中 2 匹を 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し、残り 3 匹については粘膜を回収し、8-OHdG 測定用のサンプルとした。これら解析用のサンプルについては液体窒素により凍結し、測定まで  $-80^\circ\text{C}$  で保存した。

前胃粘膜および肝臓の DNA 中 8-OHdG レベルの測定では、DNA を DNA エキストラクター WB キット (和光純薬社製) で抽出し、nuclease P1 と alkaline phosphatase により消化した。得られた試料は HPLC/ECD 法を用いて測定し、8-OHdG 値は  $8\text{-OHdG}/10^5\text{dG}$  量として算出した。

脂質過酸化はマロンジアルデヒド等のチ

オバルピツール酸反応性物質 (TBARS) を指標とし、高温、酸性条件下において生成するマロンジアルデヒド - チオバルピツール酸付加物を UV プレートリーダーによる 530 nm の吸光度測定により検出した。

CA と  $\text{NaNO}_2$  の反応で生成する BZX 及び OXZ 誘導体の分析は以下の条件で行った。肝臓 200 mg を 1.0 mM EDTA でホモジナイズした後、等量のアセトニトリルで除タンパクし、遠心分離 (10,000 rpm, 4°C, 10 min) 後の上清を測定試料とした。測定は JASCO 社製 HPLC システム (PU-2080 Plus Intelligent HPLC Pump, AS-2057 plus Intelligent Sampler, CO-966 Intelligent Column Thermostat 及び UV-970 Intelligent UV/Vis Detector) により実施した。カラムは逆相系 ODS カラム (Mightysil RP-18 GP, 20 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 関東化学社製) を用い、移動相には 1.0% 酢酸/メタノール=95/5 (v/v) を用い、20  $\mu\text{L}$  のサンプルを注入後、グラジエントシステムにより 20 分間で 1.0% 酢酸/メタノール=10/90 (v/v) とし、CA、BZX 及び OXZ 誘導体をカラムから溶出させた。各物質の定量値は、それぞれの標準品を用いて作成した検量線から算出した。

(統計学的処理方法)

最終体重、臓器重量、8-OHdG レベル及び TBARS レベルについては、一元配置の分散分析と Turkey の多重比較検定により行った。

### C. 研究結果

試験期間中の一般状態観察では、各群において投与に起因する変化は認められなかった。また試験期間中の体重推移は、有意な変化ではなかったものの 0.03%  $\text{NaNO}_2$  を投

与した群のラットにおいていずれも対照群に比して低値を示した。

試験期間中の摂餌量、飲水量ならびに CA 及び  $\text{NaNO}_2$  の暴露量を Table 1 に示す。CA 単独群では変化は認められなかったが、 $\text{NaNO}_2$  単独群とすべての併用群において、対照群に比べ摂餌量の低値が認められた。飲水量は  $\text{NaNO}_2$  を投与した群において低値が認められ、0.1% よりも 0.3%  $\text{NaNO}_2$  投与群でより低い値を示した。また、摂餌量及び飲水量から算出した CA 及び  $\text{NaNO}_2$  暴露量は、同じ濃度を投与した群間では同程度の暴露量が認められ、異なる濃度を投与した群間では投与濃度に応じた暴露量の差が認められた。

最終体重及び臓器重量を Table 2 に示す。肝臓絶対重量において有意な変化は認められなかったが、相対重量では 2.0% CA+0.1%  $\text{NaNO}_2$  及び 2.0% CA+0.3%  $\text{NaNO}_2$  群で対照群に比べ有意な上昇が認められた。

病理組織学的検索の結果、肝臓で変化は認められなかったが、前胃では CA と  $\text{NaNO}_2$  の併用投与群において過角化を伴う粘膜上皮の過形成が軽度認められた (Fig. 2)。肝臓における CA、BZX 及び OXZ 誘導体の分析の結果を Table 3 に示す。CA は CA を投与したすべての群の動物で検出された。BZX 誘導体は CA と  $\text{NaNO}_2$  の併用投与群のラット肝臓において 9.4 から 12.9 nmol/mg protein の濃度で検出されたが、群間での差は認められなかった。また、OXZ 誘導体はいずれの群のラットでも検出されなかった。

ラット前胃粘膜 DNA 中の 8-OHdG レベルを Fig. 3 に示す。いずれの併用投与群においても対照群に比べ変化は認められなかった。

また、肝臓における TBARS 及び 8-OHdG レベルも対照群に比べ変化は認められなかった (Fig. 4 及び 5)。

#### D. 考察

本研究では、*in vitro* 試験系において報告された CA と  $\text{NaNO}_2$  併用による酸化ストレスを介した複合影響について、F344 ラットを用いた *in vivo* での評価をおこなった。*in vitro* では、酸性条件下 CA と  $\text{NaNO}_2$  の反応により ROS 生成が報告されている。また、ROS 生成能を有する複合反応生成物 BZX 誘導体が、CA と  $\text{NaNO}_2$  を併用投与したラット肝臓で検出されることが明らかにされている。それ故、ラットへのこれら 2 剤の併用投与により、胃内および BZX 誘導体が行った肝臓で ROS 生成を介した複合影響が生じると考えられた。しかしながら、本研究結果において前胃と肝臓の酸化的 DNA 損傷レベル及び肝臓の脂質過酸化レベルの変化は認められなかった。一方、酸性条件下 CA と  $\text{NaNO}_2$  の反応で生成する BZX 誘導体は、本実験条件下においてもラット肝臓から検出されており、*in vivo* における 2 剤の複合反応の進行が確認されたことから、反応過程で生成したと考えられる ROS 量は生体内の抗酸化システムにより抑制可能なレベルであったと考えられた。

また、CA と  $\text{NaNO}_2$  併用投与群において認められた前胃粘膜の過角化を伴う軽度の過

形成については、前胃粘膜の酸化的 DNA 損傷が認められていないことから、BZX 誘導体等の複合反応生成物による刺激に起因する可能性が示唆された。

#### E. 結論

CA と  $\text{NaNO}_2$  の併用投与はラット胃内において複合反応を引き起こすことが明らかになったが、反応過程および反応生成物による ROS 生成を介した *in vivo* での複合影響は認められなかった。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究成果

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

石井雄二、岩崎雄介、鈴木裕太、日比大介、金 美蘭、北澤隆宏、梅村隆志、中澤裕之、西川秋佳：カフェイン酸と亜硝酸ナトリウムの *in vitro* 及び *in vivo* における複合影響 第 27 回日本毒性病理学会及び学術集会 (大阪、2010、1月)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 試験期間中の摂餌量及び飲水量と被験物質の暴露量

Group	Food consumption (mg/animal/day)	CA intake (mg/kg/day)	Water consumption (ml/animal/day)	NaNO <sub>2</sub> intake (mg/kg/day)
Control	14.3	-	23.6	-
2.0% CA	14.2	1.68	24.9	-
0.3 % NaNO <sub>2</sub>	13.0	-	16.3	0.31
0.6% CA + 0.1% NaNO <sub>2</sub>	13.6	0.48	21.6	0.13
0.6% CA + 0.3% NaNO <sub>2</sub>	12.6	0.47	17.7	0.33
2.0% CA + 0.1% NaNO <sub>2</sub>	13.0	1.52	19.6	0.11
2.0% CA + 0.3% NaNO <sub>2</sub>	12.9	1.63	16.9	0.32

Table 2 最終体重と絶対及び相対肝重量

Group	No. of animals	Body weight (g)	Liver	
			Absolute (g)	Relative (g%)
Control	5	215.1 ± 19.7	8.02 ± 0.99	3.72 ± 0.14
2.0% CA	5	219.5 ± 16.7	8.85 ± 0.73	4.03 ± 0.08
0.3% NaNO <sub>2</sub>	5	197.1 ± 6.7	6.90 ± 0.39	3.50 ± 0.15
0.6% CA + 0.1% NaNO <sub>2</sub>	5	217.0 ± 7.9	8.87 ± 0.57	4.09 ± 0.20
0.6% CA + 0.3% NaNO <sub>2</sub>	5	201.4 ± 14.4	7.81 ± 0.81	3.88 ± 0.29
2.0% CA + 0.1% NaNO <sub>2</sub>	5	219.0 ± 7.3	9.24 ± 0.59	4.22 ± 0.22 *
2.0% CA + 0.3% NaNO <sub>2</sub>	5	200.9 ± 9.0	8.86 ± 0.17	4.42 ± 0.23 *

\*: p<0.01 vs. Control group.

Table 3 肝臓中CA、BZX及びOXZ誘導体の測定結果

Group	Concentration (nmol/mg protein)		
	CA	BZX	OXZ
Control	N.D.	N.D.	N.D.
2.0% CA	23.5 ± 6.9	N.D.	N.D.
0.3 % NaNO <sub>2</sub>	N.D.	N.D.	N.D.
0.6% CA + 0.1% NaNO <sub>2</sub>	12.8 ± 9.9	9.9 ± 1.0	N.D.
0.6% CA + 0.3% NaNO <sub>2</sub>	12.6 ± 10.1	10.1 ± 0.4	N.D.
2.0% CA + 0.1% NaNO <sub>2</sub>	20.9 ± 11.2	11.2 ± 1.0	N.D.
2.0% CA + 0.3% NaNO <sub>2</sub>	24.2 ± 11.1	11.1 ± 1.3	N.D.

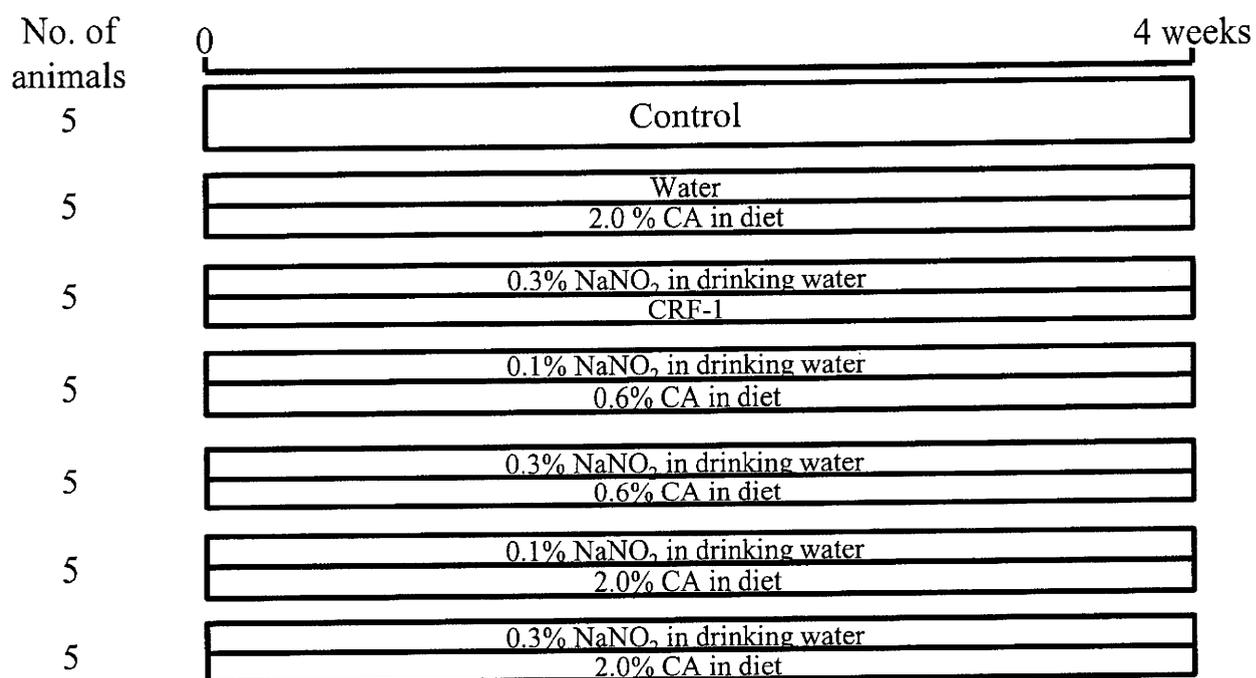
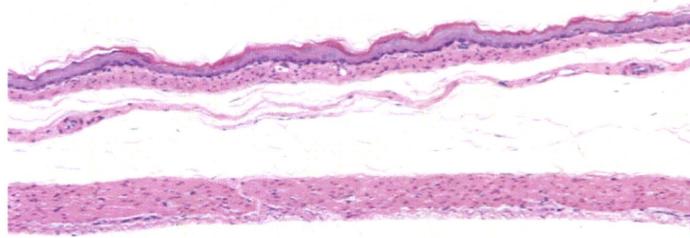


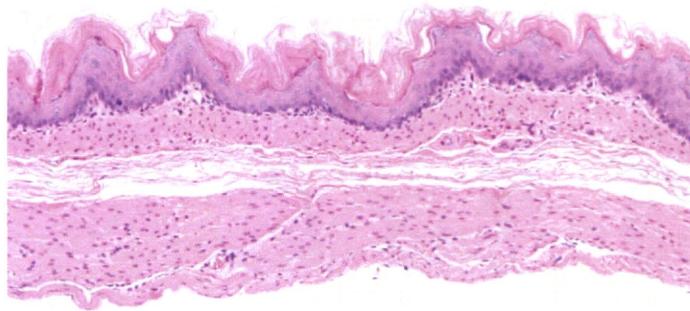
Fig. 1 実験プロトコール

**Control**



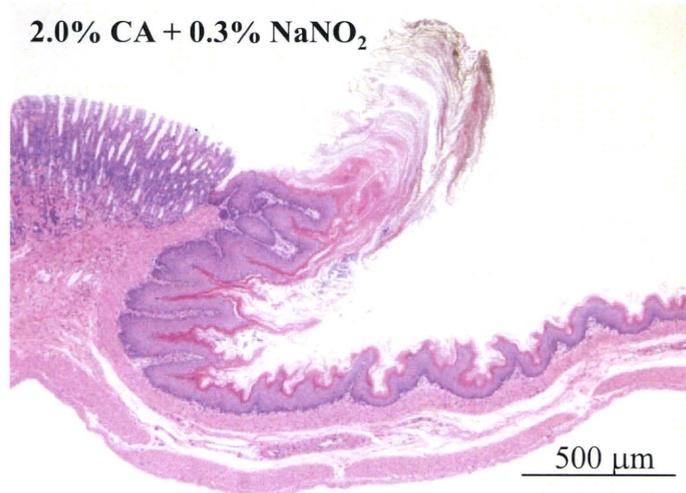
200  $\mu$ m

**2.0% CA + 0.3% NaNO<sub>2</sub>**



200  $\mu$ m

**2.0% CA + 0.3% NaNO<sub>2</sub>**



500  $\mu$ m

Fig. 2 CAとNaNO<sub>2</sub>併用投与で認められた前胃における病理組織学的変化

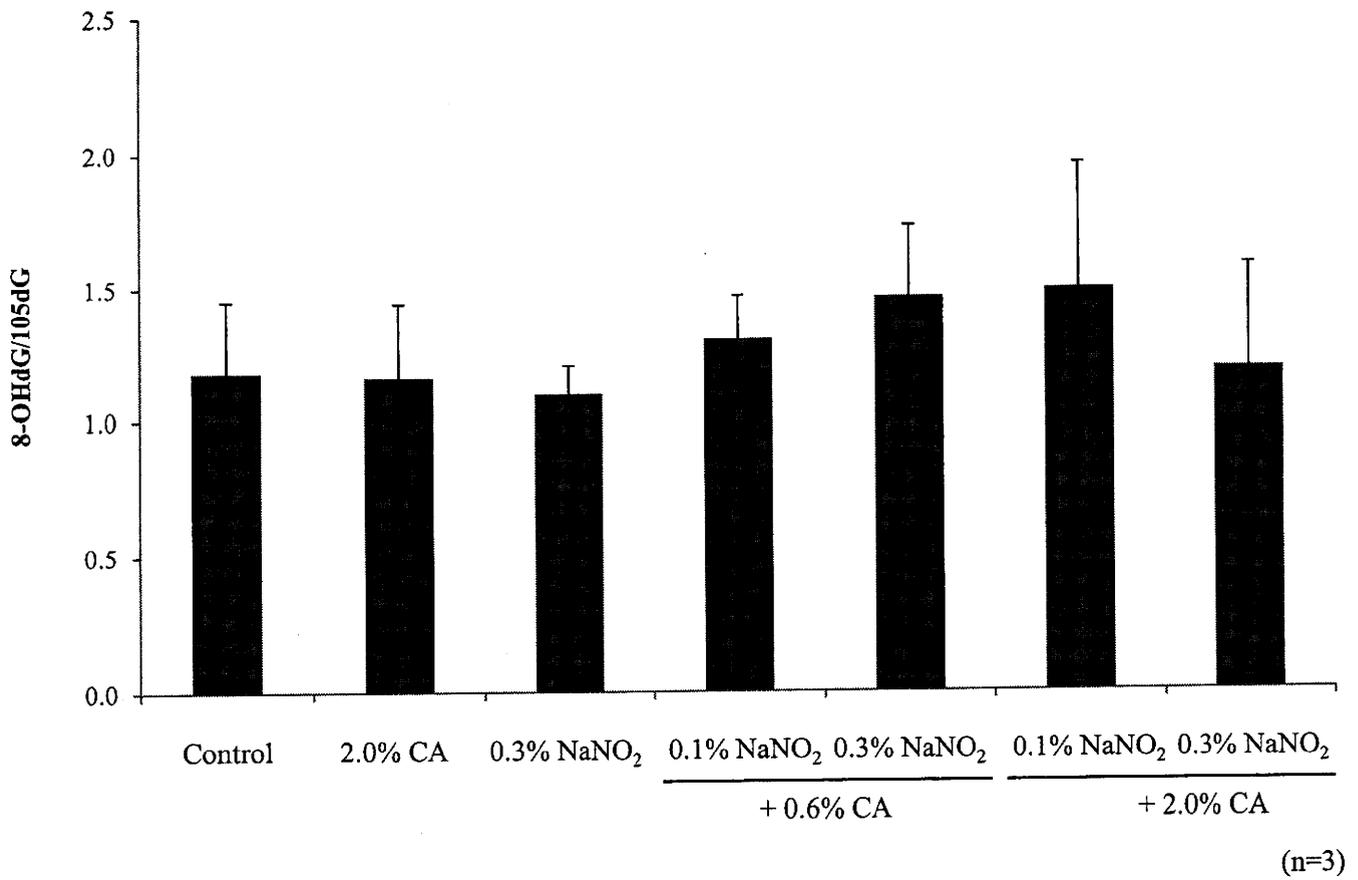


Fig. 3 ラット前胃粘膜DNA中の8-OHdGレベル

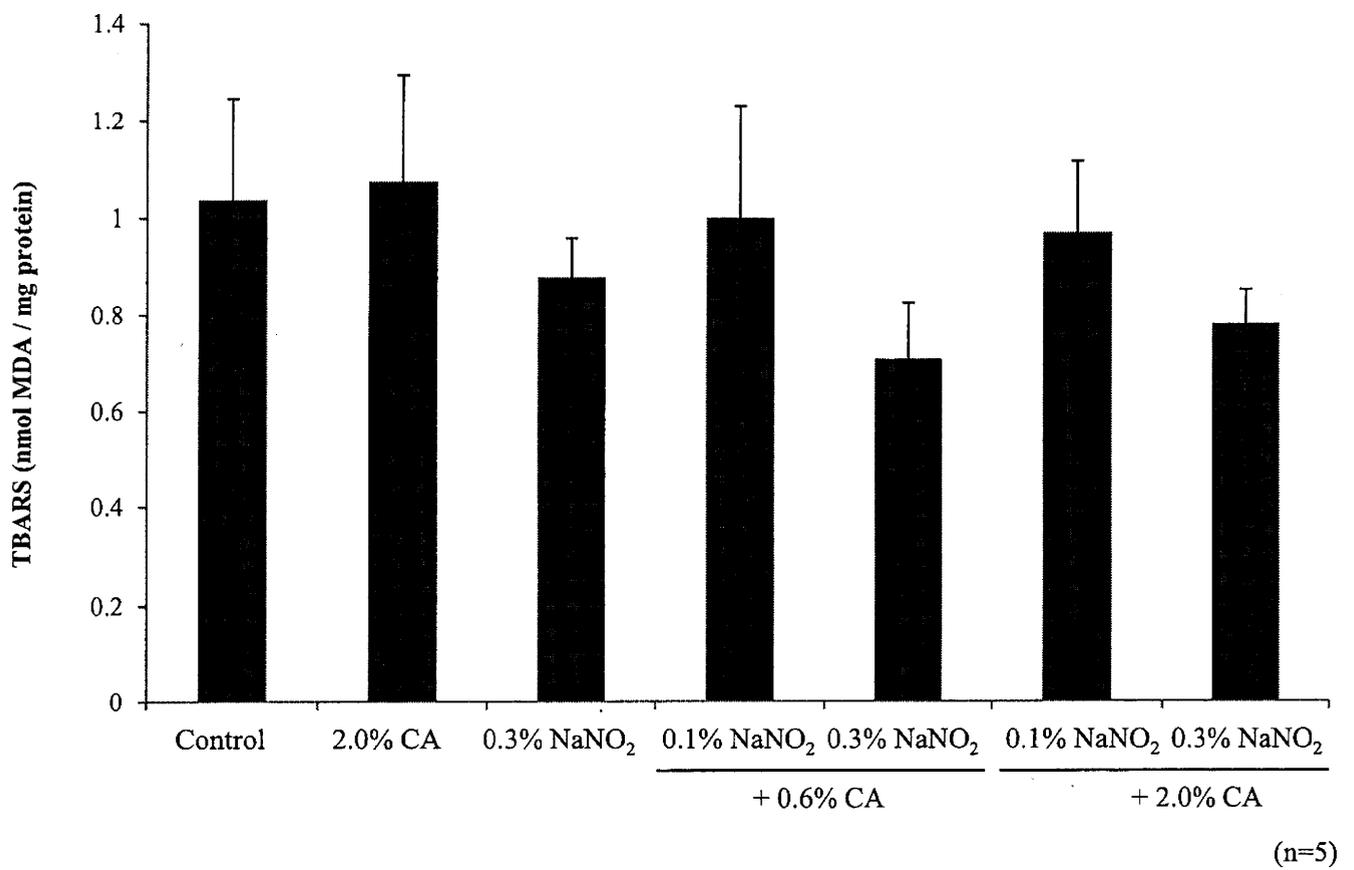


Fig. 4 ラット肝臓の脂質過酸化レベル

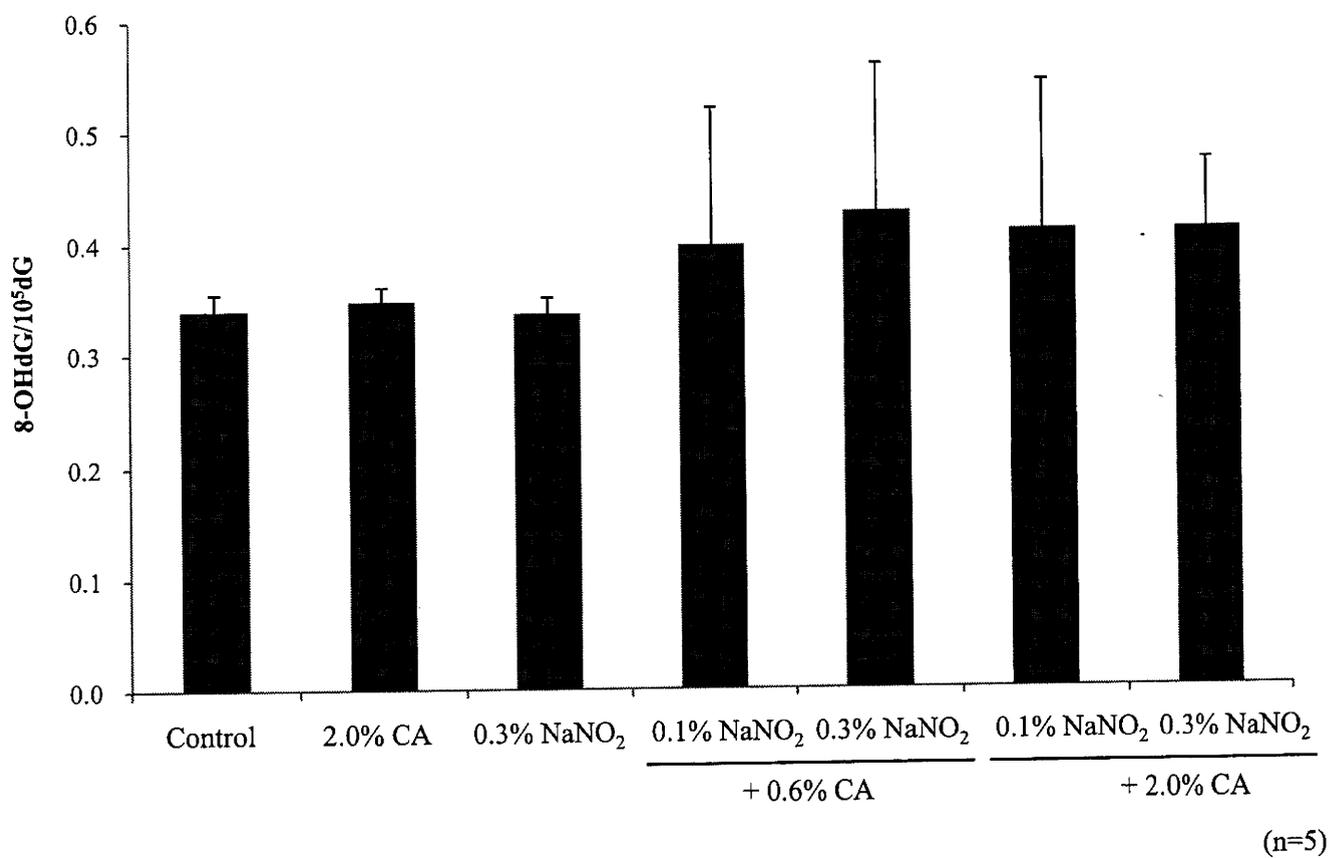


Fig. 5 ラット肝DNA中の8-OHdGレベル

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

食品中の複数の複数の化学物質による健康影響に関する調査研究

分担研究課題：食品中残留農薬の複合暴露影響に関する研究

1. 急性神経毒性に関する研究

有機リン剤（メタミドホス、パラチオン）とカーバメート剤（キシリルカルブ）あるいはニコチン製剤（硫酸ニコチン）との組合せによる単回複合投与の影響

研究分担者	原田孝則	（財）残留農薬研究所	毒性部
研究協力者	首藤康文	（財）残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	齧島淳子	（財）残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	藤江秀彰	（財）残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	小松豊	（財）残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	小坂忠司	（財）残留農薬研究所	毒性部

研究要旨

類似の作用機序を持つ農薬群の単回複合経口投与による急性毒性影響を検索するため、有機リン剤（メタミドホス、パラチオン）、カーバメート剤（キシリルカルブ）、ニコチン製剤（50%硫酸ニコチン水溶液）を8週齢の雌性ラット(BrlHan:WIST@Jcl(GALAS))に単剤あるいは複合投与した。

単剤投与試験でそれぞれの剤のLD<sub>50</sub>値を求めた後、Duboisらの方法を参考にして、2剤を組合せて単回強制経口投与する複合投与試験を行い、単剤投与の結果から求めた推定半数致死量（LD<sub>50</sub>期待値）と複合投与の半数致死量（LD<sub>50</sub>実測値）を比較することによって複合暴露による毒性効果を確認した(複合毒性強度；LD<sub>50</sub>期待値/LD<sub>50</sub>実測値)。

その結果、同一の主作用（アセチルコリンエステラーゼ阻害）を有する有機リン剤とカーバメート剤の複合投与による影響は拮抗的であった（複合毒性強度 0.47～0.83）が、カーバメート剤とニコチン製剤との組合せでは相乗効果が認められた。ただし、その相乗効果は軽度であり、複合毒性強度値は1.21であった。一方、ニコチン製剤と有機リン剤の組合せでは、メタミドホスでは相乗的（複合毒性強度 1.13）、パラチオンでは拮抗的（複合毒性強度 0.59）と組合せによって逆の効果が認められた。これは、複合毒性の予測の困難さを示すものであり、複数の農薬の複合暴露影響あるいは累積毒性の評価は、実験的な検証を重ねた上で慎重に行う必要があることが示唆された。

## A. 研究目的

食品中に残留する農薬は個々のレベルでは微量で安全性に問題はないが、類似の作用機序を有する複数の農薬に複合的に暴露された場合での影響が懸念されている。この問題を解決するため、米国 EPA や欧州食品安全機関では、ある特定の農薬群を対象に累積リスク評価法を導入し、検討が進められている。この点を考慮し、本研究ではヒト健康影響へのリスク評価に必要な基礎的毒性情報を収集することを目的として、米国 EPA における累積リスク評価法の基盤農薬のひとつであるメタミドホスと同一あるいは類似の作用機序を有する農薬を組合せて雌性ラットの成獣に複合投与し、その毒性効果を検索した。

平成 22 年度は有機リン剤のメタミドホス及びパラチオン、カーバメート剤のキシリルカルブ、ニコチン製剤である 50%硫酸ニコチン水溶液から 2 剤を組合せて単回強制経口投与し、Dubois らの方法を参考にし、単剤投与と複合投与の半数致死量(LD<sub>50</sub> 値)を比較することによって複合暴露による毒性効果を確認した。

## B. 研究方法

### 1. 被験物質

本試験の被験物質として以下の剤を使用した。

有機リン剤：

メタミドホス (Methamidophos、*O,S*-Dimethyl Phosphoramidothioate、99.7%、和光純薬工業株式会社)

パラチオン (Parathion、*O,O*-Diethyl *O*-4-Nitrophenyl Phosphorothioate、99.6%、和光純薬工業株式会社)

カーバメート剤：

キシリルカルブ (Xylylcarb、3-4-Xylyl Methylcarbamate、98%、和光純薬工業株式会社)

ニコチン製剤：

50%硫酸ニコチン水溶液 (50%Nicotine sulfate WS、関東化学株式会社)

メタミドホスは冷凍庫 (-20°C) で、パラチオン及びキシリルカルブは冷蔵庫 (1-10°C) で、50%硫酸ニコチン水溶液は室温 (23°C) でそれぞれ保管した。

### 2. 被験物質投与液の調製及び投与方法

投与実施の直前に、所定量の被験物質を秤量した後、1%Tween80 水溶液(Tween80、和光純薬工業株式会社)にて溶解、懸濁あるいは希釈して被験物質投与液を調製した。投与容量は 20 mL/kg とした。

投与方法は胃ゾンデを用いた強制経口投与とした。経口投与は毒性試験で汎用されている方法であり、また人の暴露経路に一致することから、この方法を採用した。

### 3. 試験動物

日本クレア株式会社富士生育場(静岡県)で生産された、7 週齢の Wistar Hannover 系 SPF 雌性ラット (BrlHan:WIST@Jcl [GALAS])を購入した。動物は温度 22 ± 2°C、湿度 50 ± 20%、換気回数 10 回以上/時間(オールフレッシュエアー方式)、照明時間 12 時間/日(午前 7 時点灯、午後 7 時消灯)に設定された動物飼育室で飼育した。試験環境に 7 日間馴化させた後に体重を測定し、5 匹/用量で被験物質混合液を投与した。基礎飼料には保証飼料 MF 固形(オリエンタル酵母工業株式会社)を用い、前日

の夕方から投与 3 時間後の絶食期間を除いて、ステンレス鋼製給餌器に入れて動物に自由に摂取させた。飲料水は、市上水（常総市）をプラスチック製給水びんに入れて動物に自由に摂取させた。

なお、動物の取り扱いに関しては残留農薬研究所で定める倫理規定に従い実施した。

#### 4. 観察方法

全生存動物について、瀕死状態及び死亡の確認に加え、以下の項目について神経毒性症状を観察しスコア化して記録した。

観察項目：攣縮、振戦、痙攣、縮瞳、  
流涎、筋緊張、体温下降

これらの観察は、投与日は投与 1、3、6 時間後に、翌日から投与 7 日後までは少なくとも 1 日 1 回、実施した。

また、投与直前及び観察期間終了時あるいは死亡発見時に、体重を測定した。

観察期間終了時の生存動物は、エーテル麻酔により安楽殺した。

#### 5. 半数致死量(LD<sub>50</sub> 値)の算出

半数致死量は、Moving Average 法を用いて算出した。

### C. 研究結果

#### 1. 単剤投与試験

##### 1.1. 試験群

各被験物質の単回投与による毒性症状と半数致死量を検索するために、以下の試験群を設けた。

単剤投与 (被験物質略号)

メタミドホス投与群(M)

用量 7.0、11、16 mg/kg

パラチオン投与群(P)

用量 1.0、1.3 mg/kg

キシリルカルブ投与群(X)

用量 50、63、79、98、122、154、192 mg/kg

50%硫酸ニコチン水溶液投与群(N)

用量 50、63、79、98、122、154、192 mg/kg

#### 1.2. 死亡率及び LD<sub>50</sub> 値 (表 1)

各試験群における死亡率(死亡数/投与数)及び LD<sub>50</sub> 値を以下に示す。

メタミドホス

用量 (mg/kg)	死亡率	LD <sub>50</sub> 値 (95%信頼限界)
7.0	0%	10 mg/kg (8.2-13 mg/kg)
11	60%	
16	100%	

パラチオン

用量 (mg/kg)	死亡率	LD <sub>50</sub> 値 (95%信頼限界)
1.0	40%	1.1 mg/kg (0.9-1.3 mg/kg)
1.3	100%	

キシリルカルブ

用量 (mg/kg)	死亡率	LD <sub>50</sub> 値 (95%信頼限界)
50	0%	101 mg/kg (80-126 mg/kg)
63	20%	
79	20%	
98	60%	
122	80%	
154	60%	
192	100%	

50%硫酸ニコチン水溶液

用量 (mg/kg)	死亡率	LD <sub>50</sub> 値 (95%信頼限界)
64	0%	107 mg/kg (92-124 mg/kg)
80	0%	
100	40%	
125	80%	
156	100%	

#### 1.3. 神経毒性症状 (表 1)

メタミドホス投与群(M)

投与 1 時間から 4 日後にかけて、攣縮、