

## 平成 24 年度吸入毒性試験の進捗状況について

カスガマイシン原体の吸入毒性試験の概要	.....	P2
エチプロール原体の吸入毒性試験の概要	.....	P4
フルトラニル原体の吸入毒性試験の概要	.....	P6
アゾキシストロビンの吸入毒性試験の概要	.....	P7

## カスガマイシン原体の吸入毒性試験の概要

### 1. テクニカルトリアル試験

ラットを用いた吸入毒性試験の実施にあたり、目標気中濃度である 0.2、0.7、2.0 及び 5.0 mg/L 及び適切な空気力学的質量中位径値 (MMAD) が得られる吸入暴露条件を設定するために、テクニカルトリアル試験 (予備試験) を行った。カスガマイシン原体は、その物理化学的性状を踏まえて、水 (純水) を媒体として 3.25 及び 10% の水溶液を調製し、ネブライザーを用いてチャンバー内にエアゾールとして発生させた。エアゾールの発生量はネブライザー1~3 台を用いることで調整した。

その結果、5.0 mg/L の目標気中濃度には到達しなかったが、2.0 mg/L 以下の目標気中濃度は得られ、この条件での MMAD は  $0.9 \mu\text{m}$ ~ $2.6 \mu\text{m}$  であり、OECD ガイドラインの規定値 (MMAD <  $4.0 \mu\text{m}$ ) の範囲内であった。

### 2. ラットを用いた 7 日間吸入予備試験

1 群雌雄各 3 匹の 4 群 (対照群、0.2 mg/L 群、0.7 mg/L 群、2.0 mg/L 群) を設定し、1 日 6 時間で 7 日間の反復吸入毒性試験を行った。0.2 mg/L 群は 3.25% 水溶液を 1 台のネブライザーを用い、0.7 及び 2.0 mg/L 群は 10% 水溶液をそれぞれ 1 台及び 3 台のネブライザーを用いて、チャンバー内にエアゾールを発生させ吸入暴露した。対照群は、水を 2.0 mg/L 群と同様に 3 台のネブライザーを用いて吸入暴露した。

気中濃度測定では、7 日間の吸入期間を通じて安定した結果が得られ、3 濃度群ともに設定濃度に近似した値 (0.219、0.659 及び 1.970 mg/L) であり、平均検体摂取量は雄でそれぞれ 48.0、144.0 及び 429.2 mg/kg/日、雌で 52.3、157.1 及び 469 mg/kg/日と算出された。粒子径分布の計測では、MMAD 値が  $1.0 \mu\text{m}$ ~ $2.4 \mu\text{m}$  であり、暴露エアゾールは OECD ガイドラインの規定値の範囲内であった。

0.7 mg/L 群の雄 1 例が投与開始 4 日目 (Day3) の暴露開始前に死亡した。また、同群の残り雄 2 例と雌 2 例及び 2.0 mg/L 群の雌雄各 3 例では全身状態の悪化を示す行動性の低下、背丸め姿勢、呼吸困難・促拍、立毛、閉眼などの症状が見られ、暴露を中止した。0.2 mg/L 群の雌雄各 3 例及び 0.7 mg/L 群の雌 1 例は 7 日間の吸入暴露を継続したが、これらの動物においても行動性の低下、背丸め姿勢、呼吸への影響、立毛などが散発的に発現し、体重は減少又は増加抑制傾向を示した。また、剖検では肺の暗赤色化、縦隔リンパ節と気管支リンパ節の肥大が見られ、臓器重量では肺重量の増加が認められた。

なお、対照群においても体重の減少又は増加抑制を示す個体が認められ、媒体である水が影響している可能性が考えられた。カスガマイシンの気中濃度及びエアゾール発生に用いた水溶液濃度などから算出した水の暴露用量は、ネブライザー1 台の場合に約 0.4 mL/ラット/日、3 台の場合に約 1.2 mL/ラット/日であった。したがって、本試験の対照群において、水が約 1.2 mL/ラット/日の用

量で暴露されたと推定された。

### 3. 7日間試験の結果に基づく水（純水）の媒体使用の検討

7日間吸入予備試験の結果において、約 1.2 mL/ラット/日で水を暴露した対照群でも体重の減少又は増加抑制が見られていることから、媒体に用いた水による毒性発現の可能性が示唆された。そこで、水の使用量を最低限とするため、噴霧可能な最小限の水溶液用量を検討したところ、0.4 mL/ラット/日であった。

また、媒体とする水の影響について確認するため、水の 28 日間吸入毒性試験（0.5 及び 1.5 mL/ラット/日暴露）を実施した。0.5 mL/ラット/日群及び 1.5 mL/ラット/日群は、各々ネブライザー1台及び3台を用いて水を吸入暴露した。

その結果、0.5 mL/ラット/日群では対照群と比べ 14%～19%の体重増加率の低下を示し、水の影響と考えられた。これに対し、1.5 mL/ラット/日群の体重増加率は対照群と同様で用量相関が見られなかった。この体重変化の用量相関性の欠如の理由の一つとして、0.5 mL/ラット/日群では MMAD が 4  $\mu$  m 以内で維持されて水粒子が気管支及び肺に暴露されているものの、1.5 mL/ラット/日では水粒子が結合して MMAD が 4  $\mu$  m 以上となって気管支以降に十分暴露されていないことが推察された。しかし、水の MMAD 値の測定はシステム上不可能であったため、その事実は明らかではない。

28 日間吸入毒性試験は約 0.4 mL/ラット/日暴露を設定する必要があるが、この場合、媒体（水）による影響として 14%～19%相当の体重増加率の低下が想定されることから、水を媒体として使用すべきではないと考えられた。なお、1.5 mL/ラット/日暴露において用量相関性が見られないことから、仮に当該影響が偶発的に現われるものであると仮定しても、このランダムに現われる体重低下が被験物質暴露による毒性作用と判断できず、その結果、無毒性量を設定するための NOAEL が得られるかどうかなどの毒性試験評価を正確に実施する障害になると考えられるとの結論となった。

### 4. 試験中止の判断

これらの結果から、水は適切な媒体としての要件を満たしていないと判断し、また、他の手法による試験の実施も困難であり、試験を中止することとした。

## エチプロール原体の吸入毒性試験の概要

### 1. テクニカルトライアル試験

ラットを用いた吸入毒性試験を実施するため、所定の気中濃度及び空気力学的質量中位径値 (MMAD) が得られるように、0.2、0.7、2.0 及び 5.0 mg/L で予備的に吸入装置の条件設定を行った。

その結果、MMAD は 0.2、0.7 及び 2.0 mg/L では  $1.7\mu\text{m}$ ~ $3.8\mu\text{m}$  であり、OECD ガイドラインの規定値 (MMAD <  $4.0\mu\text{m}$ ) の条件設定が可能であった。

### 2. ラットを用いた 7 日間吸入予備試験

1 群雌雄各 3 匹の 4 群 (対照群、0.2 mg/L 群、0.7 mg/L 群、2.0 mg/L 群) を設定し、1 日 6 時間で 7 日間の反復吸入毒性試験を実施した。しかし、投与開始日 (Day0) の吸入終了時に 2.0 mg/L 群の雌 1 例が死亡し、エチプロール投与各群で全身状態の悪化を示唆する行動性の低下、背丸め姿勢、震顫、発声、刺激に対する反応亢進、痙攣、腹臥姿勢、呼吸困難などの症状が見られたことから、0.7 mg/L 群及び 2.0 mg/L 群は投与開始 2 日目、0.2 mg/L 群は投与開始 3 日目にそれぞれ吸入を中止し、試験を終了した。

なお、当該試験における気中濃度測定では、3 用量群ともに設定濃度に比べ少し高い値 (0.225、0.827 及び 2.463 mg/L) であり、吸入用量はそれぞれ 53.1、193.5 及び 572.3 mg/kg/日であった。粒子径分布の計測では、MMAD 値は  $1.4\mu\text{m}$ ~ $2.2\mu\text{m}$  であり、暴露エアゾールは OECD ガイドラインの規定値の範囲内であった。

### 3. 7 日間試験の結果に基づく容量群の再検討

7 日間吸入予備試験の試験成績の結果を踏まえると、予備試験の最小用量の 10 分の 1 となる 0.02mg/L 程度まで毒性所見が観察される可能性が高いため、無毒性量を得ることのできる、より低い用量での試験を実施するため、さらに 4 群 (対照群、0.004 mg/L 群、0.02 mg/L 群、0.1 mg/L 群) を設定し、テクニカルトライアル試験として所定の気中濃度及び MMAD 値の検証を行った。

その結果、0.02 mg/L 及び 0.1 mg/L では気中濃度作製の条件設定は可能であったが、0.004 mg/L は低濃度のため吸入装置に充填する原体量が少なく、システムの精度により気中濃度を発生できなかった。

そのため、さらに媒体をホワイトカーボンと粉碎混合し、充填量を補い気中濃度が作製できないか検討を予定した。しかし、別途実施したホワイトカーボンの 14 日間吸入試験において 1 週間以内に複数例の死亡が発現したため、媒体混合物の反復吸入試験は不適切と判断された。

### 4. 試験中止の判断

これらの結果、農薬の大気経路による人の健康リスクへの適切な評価を行うための無毒性量を設

定するための吸入毒性試験を実施できないことから、試験を中止した。

## フルトラニル原体の吸入毒性試験の概要

### 1. 農薬開発企業からの事前情報

フルトラニル原体は、結晶性粉末で凝集性が強く、水溶解度が 6.63 mg/L である。過去、GLP に準拠して実施された急性吸入毒性試験において、原体そのものではダストが全く発生せず、原体の微粉砕も困難であること、また溶剤等を使わずに水懸濁又は水溶液を調製することも困難であることが明らかとなっている。6 種のダスト発生条件を検討したところ、安定して 4 時間のダスト発生が可能であり、OECD テストガイドラインが要求する「空気力学的質量中位径 (MMAD) 4.0  $\mu$  m 未満」を満たすためには、原体に化学合成された非結晶性のシリカであるホワイトカーボン (Carplex 80) を重量比 20% で加え、混合微粉砕したものを被験物質として用いることが必要とされた。また、5 mg/L の暴露濃度では MMAD が 4.0  $\mu$  m を上回ることから 2 mg/L に濃度を下げて動物の吸入試験は実施されている。

### 2. テクニカルトリアル試験 (Summary Table on Technical Vali. 参照)

1. の情報から、急性毒性試験に用いられた被験物質を用いて検討することが適当と考えられた。

このため、はじめにホワイトカーボン (Carplex 80) 20% 添加フルトラニル混合粉砕品について、再凝集性確認試験 (ITR Study No. MD-331) として、混合粉砕 3 週間後から 9 週間後の混合粉砕品を用いて、5.0 mg/L の濃度での気中濃度及び空気力学的質量中位径値 (MMAD) についての検証を行った。

その結果、気中濃度測定では 4.202 mg/L ~ 5.987 mg/L (5.0 mg/L に対して 84.0% ~ 119.7%)、MMAD は 1.0  $\mu$  m ~ 10.9  $\mu$  m、平均値は 3.6  $\mu$  m で OECD ガイドラインの規定値 (MMAD < 4.0  $\mu$  m) を満たし粉砕品の保管中に凝集性が強まる傾向は認められなかったものの、各測定時点及び各測定サンプルにおいて安定した値は得られず、ダスト発生中に吸入装置内で再凝集が生じていると考えられた。

### 3. 混合粉砕品を用いた吸入毒性試験の検討

混合粉砕したホワイトカーボンを混合することについて、ホワイトカーボンの媒体としての毒性影響の確認を並行して実施 (ITR Study No. MD-332) <sup>1)</sup> したところ、ホワイトカーボン単体での 14 日間反復吸入毒性試験によりラットの死亡が認められたことから、フルトラニル原体の媒体としてホワイトカーボン (Carplex 80) を用いることは不適切と判断された。また、ホワイトカーボン (Carplex 80) 以外の適切な条件を短期間で検討し見出すことも極めて困難と考えられた。

1) : 曝露濃度を 1 mg/L (MMAD : 2.4  $\mu$  m、215.0 mg/kg/day) として 6 時間/日で鼻部吸入したところ、投与 3 日から 8 日の間に 4 匹が死亡し (瀕死期屠殺例を含む)、試験を中止した。

### 4. 試験中止の判断

これらの結果から、目的とする農薬の大気経由による人の健康リスクへの適切な評価を行うための吸入毒性試験を実施できないことから、試験を中止した。

## アゾキシストロビンの吸入毒性試験の概要

アゾキシストロビンについては、農薬開発企業において亜急性吸入毒性を実施することとしており、本年3月より本試験が行われる予定。

この試験により得られた無毒性量に基づき、気中濃度評価値を算出し、農薬の大気経由に及ぶ人の健康リスクへの評価に活用することとしている。