

イソキサチオンのラットを用いた吸入による1週間毒性試験（予備試験）

試験番号 4486

標題：イソキサチオンのラットを用いた吸入による1週間毒性試験（予備試験）

1. 試験目的

イソキサチオンのラットを用いた吸入による4週間毒性試験の投与濃度を定める予備試験として、イソキサチオン（被験物質番号1240）をラットに1週間全身暴露（経気道投与）して、その生体影響を検索する。

2. 動物福祉

本試験は、平成18年4月28日付け、環境省告示第88号「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、平成18年6月1日付け、厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」及び平成18年11月27日付け、日本バイオアッセイ研究センター制定「動物実験に関する指針」を遵守する。また、本試験計画書は日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会で承認された。

3. 試験委託者

環境省水・大気環境局土壌環境課農薬環境管理室  
東京都千代田区霞ヶ関1-2-2

4. 試験施設

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター  
神奈川県秦野市平沢2445

5. 運営管理者

副所長 長野 嘉介

6. 試験責任者

試験管理部 西沢 共司

7. 試験日程

試験開始日	2009年9月2日
動物導入予定日	2009年9月8日
群構成予定日	2009年9月22日
被験物質投与開始予定日	2009年9月23日
被験物質投与終了予定日	2009年9月29日
定期解剖予定日	2009年9月30日
試験終了予定日	2010年3月31日

8. 試験計画書作成者

試験責任者

署名 西沢 共司  
日付 2009 年 9 月 2 日

9. 試験計画書の承認

運営管理者

署名 長野 嘉介  
日付 2009 年 9 月 2 日

## 10. 試験材料

### 10-1 被験物質の性状等

#### 10-1-1 名称等 (文献 1)

名 称 : イソキサチオン  
別 名 : *O,O*-ジエチル-*O*-(5-フェニル-3-イソキサゾリル)ホスホロ  
          チオエート  
C A S N o. : 18854-01-8

#### 10-1-2 構造式及び分子量 (文献 1、2)

化 学 式 :  $C_{13}H_{16}NO_4PS$   
分 子 量 : 313.3

#### 10-1-3 物理化学的性状等 (文献 1、2)

性 状 : 微黄色の液体  
沸 点 : 160°C (0.15 mmHg)  
蒸 気 圧 :  $1.2 \times 10^{-6}$  mmHg (25°C)  
溶 解 性 : 有機溶媒に易溶、水に難溶 (1.9 ppm、25°C)  
保 管 条 件 : 室温、暗所に保管

#### 10-2 使用被験物質 (文献 3)

販 売 元 : 保土ヶ谷 UPL(株)  
純 度 : 96.3% (HiKAL LTD 分析表)

### 10-3 試験動物

#### 10-3-1 種、系統及び清浄度

種 : ラット  
系 統 : CrI:CD(SD)  
清浄度 : SPF

#### 10-3-2 性及び導入予定匹数

雄 : 24 匹  
雌 : 24 匹

#### 10-3-3 週齢

導入時週齢 : 生後 6 週齢  
投与開始時週齢 : 生後 8 週齢

10-3-4 導入時予定体重幅

雄： 160g～200g

雌： 130g～170g

10-3-5 供給業者

日本チャールス・リバー（株）厚木飼育センター  
神奈川県厚木市下古沢 795

10-3-6 検疫及び馴化 (SOP No. ANI-0201, 0202, 0203, 0211)

動物導入後、1週間の検疫を行う。

検疫期間後、動物を吸入チャンパーに移動し、1週間の馴化を行う。

検疫期間： 7日間（2009年9月8日～2009年9月15日）

馴化期間： 7日間（2009年9月15日～2009年9月22日）

10-3-7 動物選択理由

一般毒性試験をはじめとした各種毒性試験に多く使用されており、毒物反応及び自然発生病変等のバックグラウンドデータが豊富である。

11. 試験方法

11-1 投与

11-1-1 投与経路

投与経路は全身暴露による経気道投与とする。

11-1-2 被験物質の投与方法 (SOP No. INH-0001)

投与は、試験動物を収容した吸入チャンパー内に、被験物質のミストを送り込み、動物に全身暴露することにより行う。

11-1-3 投与期間

投与期間は1日6時間、1週5日の暴露で、2009年9月23日～2009年9月29日までの1週間とする。

11-1-4 投与濃度

投与濃度は、3 mg/m<sup>3</sup>、10 mg/m<sup>3</sup>及び30 mg/m<sup>3</sup>の3段階に設定する。なお、対照群は清浄空気による換気のみとする。

## 11-1-5 被験物質の発生方法と濃度調整

恒温槽 (いすず(株)、SNS - 112S) 内に密閉式ミスト発生器 (柴田科学(株)特注) を収納し、圧縮空気をミスト発生器内のノズル部に供給しイソキサチオンのミストを発生する。この発生ミストを一定量の希釈空気と混合し、吸入チャンバーに導入する。

吸入チャンバー内ミスト濃度はデジタル粉塵計 (柴田科学(株) AP638) で計測し、同機器の上下限設定信号によりミスト発生空気量を制御することで、吸入チャンバー内被験物質濃度を一定に維持する。

## 11-1-6 被験物質濃度の測定

投与日は1日3回 (暴露開始 1、3、5 時間後) 各投与群について、吸入チャンバー内のミストをダストサンプラーを用いて、ガラス繊維フィルター (47 mmφ) に捕集する。捕集したフィルターを電子天秤で秤量し、捕集前後のフィルター重量の差 (捕集量) を捕集空気量で除し、チャンバー内濃度を算出する (以下、秤量法)。

また、週1回、1日分のミストを捕集したフィルターを高速液体クロマトグラフィーの移動相溶液で超音波抽出し、高速液体クロマトグラフ (アジレントテクノロジー、1090) を用いて、イソキサチオン量を測定する。定量結果と捕集空気量からイソキサチオン濃度を算出する (以下、機器分析法)。

秤量法と機器分析法で、吸入チャンバー内イソキサチオン濃度を確認する。

## 11-1-7 チャンバー内ミストの粒子径の測定

週1回、アンダーセンサンプラー (柴田科学(株) AN-200) を用いて、吸入チャンバー内のミストをテフロンバインダーフィルター (80 mmφ) に捕集し、ミストの空気力学的質量中位径 (MMAD) 及び幾何標準偏差  $\sigma_g$  を求める。

## 11-2 動物管理

## 11-2-1 各群の使用動物数

投与群3群及び対照群1群の計4群を設け、各群雌雄各5匹の動物を用いる。

各群の使用動物数と動物番号

群番号	群名称	雄 使用動物数(動物番号)	雌 使用動物数(動物番号)
0	対照群	5匹 (1001~1005)	5匹 (2001~2005)
1	3 mg/m <sup>3</sup> 群	5匹 (1101~1105)	5匹 (2101~2105)
2	10 mg/m <sup>3</sup> 群	5匹 (1201~1205)	5匹 (2201~2205)
3	30 mg/m <sup>3</sup> 群	5匹 (1301~1305)	5匹 (2301~2305)

## 11-2-2 群分け及び個体識別方法 (SOP No. ANI-0204, 0205, 0211)

供試動物の各群への割り当ては、一般状態及び体重の推移に異常を認めない動物から体重の中央値に近い雌雄各 20 匹を選別し、体重の重い順より各群に 1 匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法 (適正層別方式) により実施する (文献 4)。群分けは、被験物質投与開始日の前日 (2009 年 9 月 22 日) に行う。

動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間では尾に油性マーカーによる色素塗布、投与期間では耳パンチにより行う。また、ケージには個体識別番号を記したラベルを付す。

なお、動物はバリア区域内の独立した室 (516 室) に収容し、室の扉に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他試験及び異種動物と区別する。

## 11-2-3 飼育条件 (SOP No. ANI-0001, 0101, 0104, 0206, 0210, 0302, 0303, 0304, 0401)

## (1) 飼育環境

検疫期間中は検疫室 (517 室)、馴化期間及び投与期間中は、吸入試験室 (516 室) の吸入チャンバー内で動物を飼育する。

検疫室、吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境条件及び使用するケージを以下に示す。

温度	: 検疫室; 22±3℃
	吸入試験室; 22±3℃
	吸入チャンバー内; 22±3℃
湿度	: 検疫室; 55±15%
	吸入チャンバー内; 50±20%
明暗サイクル	: 12 時間点灯 (8:00~20:00) / 12 時間消灯 (20:00~8:00)
換気回数	: 検疫室; 15~17 回/時
	吸入試験室; 7~9 回/時
	吸入チャンバー内; 12±1 回/時
圧力	: 吸入チャンバー内; 0~-15×10Pa
ケージへの動物の収容方法	: 単飼
ケージの材質・形状・寸法等	:
	検疫期間; ステンレス製 2 連網ケージ (170(W)×294(D)×176(H) mm/匹)
	馴化期間; ステンレス製 6 連網ケージ (125(W)×216(D)×176(H) mm/匹)
	投与期間; ステンレス製 5 連網ケージ (150(W)×216(D)×176(H) mm/匹)

## (2) 飼料

飼料は、全飼育期間を通して、オリエンタル酵母工業(株) (千葉工場: 千葉県千葉市美浜区新港 8-2) の CRF-1 固型飼料 (30kGy- $\gamma$ 線照射滅菌飼料) を固型飼料給餌器により自由摂取させる。ただし、被験物質暴露中及び定期解剖前日の夕方からは飼料を摂取させない。

### (3) 飲水

飲水は、全飼育期間を通して、市水（神奈川県秦野市水道局供給）をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水装置により自由摂取させる。ただし、被験物質暴露中は給水しない。

## 11-3 観察・検査項目及び方法

### 11-3-1 動物の生死及び一般状態の観察 (SOP No. ANI-0207, 0208)

#### <検査及び馴化期間>

生死及び瀕死の確認を毎日1回行う。一般状態の詳細な観察は、検査開始日（導入時）、検査終了・馴化開始日及び馴化最終日（群構成時）を行う。

#### <投与期間>

生死及び瀕死の確認を毎日1回行う。一般状態の詳細な観察は投与2日目と7日目に行い、必要と認められた場合は随時観察を行う。

### 11-3-2 体重測定 (SOP No. ANI-0207, 0208, 0209)

#### <検査及び馴化期間>

測定時に生存する全動物について、検査開始日（導入時）、検査終了・馴化開始日及び馴化最終日（群構成時）に体重を測定する。

#### <投与期間>

測定時に生存する全動物について、投与2日目と7日目に体重測定を行う。また、動物の死亡発見時、切迫屠殺時及び定期解剖動物の搬出時にも体重（搬出時体重）を測定する。

### 11-3-3 血液学的検査 (SOP No. PAT-0006, CLI-0002, 0010)

定期解剖時に生存している採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より EDTA-2 カリウム入り採血管に採血し、下記の項目について検査を行う。検査方法は別紙-1 に示す。

検査項目：赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、血小板数、網赤血球比、白血球数

### 11-3-4 赤血球、血漿中及び脳のアセチルコリンエステラーゼ活性の測定

#### (1) 赤血球、血漿中のアセチルコリンエステラーゼ活性の測定 (SOP No. PAT-0006, CLI-0002, 0007, 0008, 0013, 0014)

定期解剖時に生存している採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血した血液を遠心分離し、得られる赤血球及び血漿を用いて、赤血球、血漿中のアセチルコリンエステラーゼ活性の測定を行う。



(2) 脳のアセチルコリンエステラーゼ活性の測定 (SOP No. PAT-0004, CLI-0009, 0013, 0014)

定期解剖時まで生存している動物について、脳を摘出し重量測定後、正中線で2分割し、一方の重量測定後、脳組織液を作製し、アセチルコリンエステラーゼ活性の測定を行う。

アセチルコリンエステラーゼ活性の測定は自動分析装置 (株)日立製作所、日立 7080) を用いて、アセチルチオコリン・DTNB 法により測定する。

11-3-5 病理学的検査 (SOP No. PAT-0001)

(1) 剖検 (SOP No. PAT-0005)

全動物について肉眼的に観察を行う。

(2) 臓器重量 (SOP No. PAT-0008)

定期解剖時まで生存している動物について、下記に示す臓器の湿重量 (臓器実重量) を測定する。また、各臓器の湿重量の搬出時体重に対する百分率 (臓器重量体重比) を算出する。

測定臓器：胸腺、副腎、精巣、卵巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳

(3) 臓器の採取保存 (SOP No. PAT-0004)

全動物について、下記の器官、組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定する。

鼻腔、肺 (左肺に固定液を注入する)、胸腺、脾臓、心臓、肝臓、腎臓、副腎、精巣、卵巣、脳

11-4 数値処理と統計方法

11-4-1 数値の取扱いと表示

各数値データは、測定機器の精度に合わせて表示する。

吸入チャンバー内の被験物質濃度は、 $\text{mg}/\text{m}^3$  を単位とし、小数点以下第1位までを表示する。ミスト粒子径は単位を  $\mu\text{m}$  とし、平均粒径等は小数点以下第1位まで表示する。

体重は  $\text{g}$  を単位とし、整数値の1の位まで測定し、表示する。

臓器実重量は、 $\text{g}$  を単位とし、小数点以下第3位まで測定し、表示する。臓器重量体重比は、臓器実重量値を搬出時体重で除し、パーセント単位で小数点以下第4位を四捨五入し、小数点以下第3位までを表示する。

血液学的検査は、別紙-1 に示す単位と精度により表示する。

なお、各数値データの平均値及び標準偏差は、上記に示す桁数と同様になるよう四捨五入を行い表示する。

#### 11-4-2 統計処理

各群の有効動物数は、供試動物より事故等の理由で外された動物数を減じた動物数とする。

各検査及び測定は、実施できた動物数を検査（測定）数とする。

体重、血液学的検査、アセチルコリンエステラーゼ活性及び臓器重量の測定値は、対照群を基準群として、まず Bartlett 法により等分散の予備検定を行い、その結果が等分散の場合には一元配置分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合は、Dunnett の多重比較により平均値の検定を行う。また、分散の等しくない場合には、各群を通して測定値を順位化して、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合には、Dunnett 型の多重比較を行う。

各群雌雄ごとに検査数が 2 以下の項目については検定より除外する。また、各検定は 5% の有意水準で両側検定を行い、検定結果を表示する場合には 5% 及び 1% の有意水準の表示を行う。

なお、状況に応じて適宜、適切な検定法を用いて統計処理を行う。

#### 12. 試資料の保管 (SOP No. STR-0001)

試験計画書、標本、生データ、記録文書、その他本試験に係る試資料は、試資料保管施設に保管する。

保管期間は、試験終了後、原則として 10 年間とする。なお、この期間にあっても標本については品質が評価に耐え得る期間保管する。

#### 13. 試験計画書の変更 (SOP No. STU-0003)

試験計画書を変更する場合は、変更事項、その理由及び日付を明記し、本試験計画書に添付する。

14. 文献

- 1) 製品安全データシート. 2008. イソキサチオン原体. 保土谷 UPL(株).
- 2) U.S. National Library of Medicine. 2009. Isoxathion, Chemical/Physical Properties. Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Available: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search>. [accessed 4 August 2009].
- 3) 被験物質添付資料. 2009. 分析表. HiKAL LTD.
- 4) 阿部正信. 1986. 長期毒性試験に用いるラット、マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立. 薬理と治療 14 : 7285-7302.

## 別紙-1

## 血液学的検査の検査方法・単位・小数点以下桁数

項 目	検 査 方 法	単 位	小数点 以下桁数
血液学的検査			
赤血球数(RBC)	光学的散乱法 <sup>1)</sup>	$\times 10^6/\mu\text{L}$	2
ヘモグロビン濃度(Hgb)	シアンメチン法 <sup>1)</sup>	g/dL	1
ヘマトクリット値(Hct)	計算法( $\text{RBC} \times \text{MCV}/10$ ) <sup>1)</sup>	%	1
平均赤血球容積(MCV)	光学的散乱法 <sup>1)</sup>	fL	1
平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)	計算法( $\text{Hgb}/\text{RBC} \times 10$ ) <sup>1)</sup>	pg	1
平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)	計算法( $\text{Hgb}/\text{Hct} \times 100$ ) <sup>1)</sup>	g/dL	1
血小板数	光学的散乱法 <sup>1)</sup>	$\times 10^3/\mu\text{L}$	0
網赤血球比	光学的散乱法 <sup>1)</sup>	%	1
白血球数	光学的散乱法 <sup>1)</sup>	$\times 10^3/\mu\text{L}$	2

1) 総合血液学検査装置 (ADVIA 120 : シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス社)