

平成 21 年度農薬吸入毒性評価手法確立調査（試験実施業務） 農薬吸入毒性試験の結果について

1. イソキサチオンのラットを用いた吸入による 28 日間毒性試験

1-1. 試験方法

試験動物：CrI:CD(SD)系 SPF ラット、雌雄各 40 匹（10 匹/群×4 群）

投与濃度：0、1、3、10 mg/m³

投与経路及び期間：全身暴露による経気道投与、6 時間/日、5 日/週で 4 週間投与

詳細は「平成 21 年度農薬吸入毒性評価手法確立調査（試験実施業務）、イソキサチオンのラットを用いた吸入による 28 日間毒性試験計画書」（別添 1）参照。

1-2. 試験結果及びまとめ（別添 2 参照）

イソキサチオンの暴露の結果、動物の死亡はみられず、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、リンパ球サブセットの測定、剖検観察、臓器重量の測定及び病理組織学的検査では、イソキサチオンの毒性影響と思われる変化はみられなかった。

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では、統計学的に有意な活性の低下が、雄では赤血球と血漿で 10 mg/m³ 群に、雌では血漿で 3 mg/m³ 以上の群、赤血球で 10 mg/m³ 群にみられた。これらのうち、雌雄の 10 mg/m³ 群の赤血球アセチルコリンエステラーゼ活性では、統計学的に有意で、かつ 20%以上の阻害（雄：59%、雌：46%の活性低下）がみられた。この変化を WHO のガイドラインで示された毒性影響と考え、本試験におけるイソキサチオンのラットに対する 4 週間吸入暴露による無毒性量（NOAEL）は、赤血球のアセチルコリンエステラーゼ活性への影響をエンドポイントとして 3 mg/m³ であると判断した。

平成 21 年度

農薬吸入毒性評価手法確立調査（試験実施業務）計画書

〔 イソキサチオンのラットを用いた
吸入による 28 日間毒性試験 〕

試験番号 0752

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

標題：平成 21 年度農薬吸入毒性評価手法確立調査（試験実施業務）
（イソキサチオンのラットを用いた吸入による 28 日間毒性試験）

1. 試験目的

街路樹や公園等の市街地における使用実績が多いイソキサチオン（被験物質番号 1240）をラットに 28 日間全身暴露（経気道投与）して、その生体影響を検索する。

2. 試験法

本試験は OECD 化学品テストガイドライン 412 改定案（OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, DRAFT PROPOSAL FOR A REVISED GUIDELINE 412, Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study. 2008 年 9 月 30 日）を参考にして実施する。

3. GLP 対応

本試験は、平成 11 年 10 月 1 日付け、農林水産省農産園芸局長通知 11 農産第 6283 号「農薬の毒性及び残留性に関する試験の適正実施について(農薬 GLP)」（最終改正平成 20 年 3 月 31 日付け、19 消安第 14968 号）に準拠し実施する。

4. 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。

5. 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

6. 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

7. 運営管理者

副所長 長野 嘉介

8. 試験責任者

試験管理部 西沢 共司

9. 試験日程

試験開始日	2009年10月1日
動物導入予定日	2009年10月6日
群構成予定日	2009年10月20日
被験物質投与開始予定日	2009年10月21日
被験物質投与終了予定日	2009年11月17日
定期解剖予定日	2009年11月18、19日
試験終了予定日	2010年3月31日

10. 試験計画書作成者

試験責任者

署名 西沢 共司
日付 2009 年 10 月 1 日

11. 試験計画書の承認

環境省水・大気環境局土壌環境課
農薬環境管理室

署名 廣元 健一
日付 2009 年 10 月 2 日

運営管理者

署名 長野 嘉介
日付 2009 年 10 月 1 日

12. 試験材料

12-1 被験物質の性状等

12-1-1 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

12-1-2 化学式及び分子量 (文献 1, 2)

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

12-1-3 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 : 1.2×10^{-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

12-2 使用被験物質 (文献 3)

販 売 元 : 保土谷 UPL(株)
純 度 : 96.1% (HIKAL LTD 分析表)
ロット番号 : C34160209/005

12-3 被験物質の安定性 (SOP No. TES-0006)

被験物質の安定性は、使用開始前及び使用終了後に被験物質の赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計 ((株)島津製作所 FTIR-8200PC) にて測定し、それぞれのデータを比較することにより確認する。

12-4 試験動物

12-4-1 種、系統及び清浄度

種 : ラット

系 統 : CrI:CD(SD)

清浄度 : SPF

12-4-2 性及び導入予定匹数

雄 : 48 匹

雌 : 48 匹

12-4-3 週齢

導 入 時 週 齢 : 生後 6 週齢

投与開始時週齢 : 生後 8 週齢

12-4-4 導入時予定体重幅

雄 : 160g～200g

雌 : 130g～170g

12-4-5 供給業者

日本チャールス・リバー（株）神奈川県横浜市港北区新横浜 3-17-6
厚木飼育センター生産

12-4-6 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、動物を吸入チャンバーに移動し、1 週間の馴化を行う。

検疫期間 : 7 日間 (2009 年 10 月 6 日～2009 年 10 月 13 日)

馴化期間 : 7 日間 (2009 年 10 月 13 日～2009 年 10 月 20 日)

12-4-7 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。

13. 試験方法

13-1 投与

13-1-1 投与経路

投与経路は全身暴露による経気道投与とする。

13-1-2 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バー内に、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。

13-1-3 投与期間

投与期間は1日6時間、1週5日の暴露で、2009年10月21日～2009年11月17日までの28日間とする。

13-1-4 投与濃度

投与濃度は、1、3、10 mg/m³の3段階に設定する。なお、対照群 (0 mg/m³群) は清浄空気による換気のみとする。

13-1-5 投与濃度の設定理由

投与濃度は、当センターで実施した投与期間7日間の予備試験 (試験番号 4486) の結果をもとに決定した。

予備試験では、0、3、10、30 mg/m³の濃度のイソキサチオンを1日6時間で7日間に5日、ラット (1群雌雄各5匹) に暴露した。その結果、動物の死亡はみられず、一般状態、体重、血液学的検査及び剖検には暴露の影響はみられなかった。しかし、赤血球と血漿のアセチルコリンエステラーゼ活性の低下がイソキサチオン投与群に用量相関性をもってみられ、特に、対照群に比較して統計的に有意な低下が、10 mg/m³以上の群の雌雄にみられた。すなわち、対照群に対する活性の低下率は、10 mg/m³群の雄では赤血球 45%、血漿 28%、雌では赤血球 35%、血漿 60%、30 mg/m³群の雄では赤血球 51%、血漿 59%、雌では赤血球 41%、血漿 79%であった。また、臓器重量では胸腺の重量低下が 30 mg/m³群の雄でみられた。

以上の予備試験の結果から、本試験の投与濃度は雌雄ラットとも最高濃度を 10 mg/m³とし、以下 3、1 mg/m³と決定した。

13-1-6 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。

13-1-7 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。捕集後、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、秤量法とする）。

また、週1回、1日分のミストを捕集したフィルターをアセトニトリルで超音波抽出し、高速液体クロマトグラフ（アジレントテクノロジーズ、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、機器分析法とする）。

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。また、対照群についても同様な操作を行う。

13-1-8 チャンバー内ミストの粒子径の測定

投与期間中、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、ミストの空気動力学的質量中位径（MMAD）及び幾何標準偏差 σ_g を求める。

13-2 動物管理

13-2-1 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10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 (0 mg/m ³ 群)	10 匹 (1001~1010)	10 匹 (2001~2010)
1	1 mg/m ³ 群	10 匹 (1101~1110)	10 匹 (2101~2110)
2	3 mg/m ³ 群	10 匹 (1201~1210)	10 匹 (2201~2210)
3	10 mg/m ³ 群	10 匹 (1301~1310)	10 匹 (2301~2310)

13-2-2 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 40 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 10 月 20 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。

13-2-3 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 (518 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 ; $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$

吸入試験室 ; $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$

吸入チャンバー内 ; $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$

湿度 : 検疫室 ; $55 \pm 15\%$

吸入チャンバー内 ; $50 \pm 20\%$

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 ; $0 \sim -15 \times 10\text{Pa}$

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- γ 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。

なお、試験に使用した飼料中の栄養成分と夾雑物についてはオリエンタル酵母工業(株) から分析データを使用ロットごとに入手し、保管する。また、飼料中の夾雑物は本試験計画書に規定した許容基準 (別紙-1) と照合して異常のないことを確認する。

(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）をフィルターを通して、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。

なお、飲水は、試験施設として実施している定期サンプリングによる飲水を(財)食品薬品安全センター秦野研究所（神奈川県秦野市落合 729-5）に依頼して、水道法を参考にして規定した項目について分析し、結果を試験計画書に規定した許容基準（別紙-2）と照合して異常のないことを確認し、保管する。

13-3 観察・検査項目及び方法

13-3-1 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）に行う。

<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週 1 回行い、必要と認められた場合は随時観察を行う。

13-3-2 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、週 1 回、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。

13-3-3 摂餌量測定（SOP No. ANI-207, 0303, 0304）

測定時に生存する全動物について、週 1 回、給餌量及び残餌量を測定し、その値から 1 匹 1 日当たりの摂餌量を算出する。

13-3-4 血液学的検査（SOP No. PAT-0006, CLI-0002, 0006, 0010, 0024）

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-3 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、白血球分類

13-3-5 血液生化学的検査 (SOP No. PAT-0006, CLI-0002, 0007, 0013)

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、得られる血漿を用いて、下記の項目について検査を行う。検査方法は別紙-3に示す。

検査項目：総蛋白、アルブミン、A/G比、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、AST、ALT、LDH、ALP、 γ -GTP、CK、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン

13-3-6 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) 赤血球及び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、赤血球及び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)

定期解剖時に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。なお、もう一方は病理組織学的検査を行う。

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。

13-3-7 血液、胸腺及び脾臓のリンパ球サブセットの測定

(1) 血液のリンパ球サブセットの測定 (SOP No. PAT-0006, CLI-0002)

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 (3.6 mg) 入り採血管に採血し、全血を用いてリンパ球サブセットの測定を行う。

検査項目 全血 T細胞：CD4+、CD8+、CD4/CD8比

(2) 胸腺及び脾臓のリンパ球サブセットの測定 (SOP No. PAT-0004)

定期解剖時に生存している動物のうち、各群雌雄各5匹について、胸腺及び脾臓を摘出し重量測定後、胸腺の半分 (右側) 及び脾臓の三分の一について重量を測定した後、リンパ球サブセットの測定を行う。

各臓器は5%牛胎児血清 (Fetal bovine serum, Invitrogen Corporation., Carlsbad, CA, USA) 添加のリン酸緩衝液 (PBS; Phosphate Buffered Saline) に浸し、冷蔵保存する。

検査項目 胸腺 T細胞：CD4+、CD8+、
CD4+/CD8+(double positive)

CD4- / CD8- (double negative)

脾臓 T細胞 : CD4+, CD8+

なお、採取した血液、胸腺、脾臓は冷蔵状態にて(財)残留農薬研究所(茨城県常総市内守谷町 4321 番地)に輸送し、リンパ球サブセットの測定は、同研究所に依頼する。

13-3-8 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、卵巢、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。

皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺(左肺に固定液を注入する)、骨髓(大腿骨)、リンパ節(縦隔、顎下等)、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸(十二指腸を含む)、大腸、肝臓、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、卵巢、子宮、膣、乳腺、脳(嗅球を含む)、脊髓、末梢神経(坐骨神経)、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨(大腿骨)、肉眼的に変化のみられた器官及び組織

(4) 病理組織学的検査 (SOP No. PAT-0010, 0011, 0012, 0013, 0014, 0015, 0018)

全動物について、下記の器官、組織を切り出し、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、*を付した器官、組織を光学顕微鏡により検査する。

皮膚、鼻腔(4箇所を横断)*、鼻咽頭*、喉頭*、気管*、肺*、骨髓(大腿骨)*、リンパ節(縦隔、顎下等)*、胸腺*、脾臓*、心臓*、舌、唾液腺*、食道*、胃*、小腸(十二指腸を含む)、大腸、肝臓*、膵臓、腎臓*、膀胱*、下垂体、甲状腺*、上皮小体、副腎*、精巣*、精巣上体、精囊*、前立腺、卵巢*、子宮*、膣、乳腺、脳(嗅球を含む)*、脊髓(頸部、胸部、腰部)*、末梢神経(坐骨神経)、眼球*、ハーダー腺、筋肉、骨(大腿骨)、肉眼的に変化のみられた器官及び組織*

13-3-9 血液中の被験物質濃度(主要代謝物を含む)の測定 (SOP No. PAT-0006, CLI-0002, 0007)

定期解剖日初日(2009年11月18日)に解剖予定(各群雌雄各5匹)の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、得られる血漿中の被験物質濃度（主要代謝物を含む）の測定を行う。

なお、被験物質濃度（主要代謝物を含む）の測定は、(株)島津テクノリサーチ（京都市中京区西ノ京三条坊町2番地の13）に依頼する。

13-4 数値処理と統計方法

13-4-1 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、 mg/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 μm 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 g を単位とし、整数値の1の位まで測定し、表示する。

摂餌量は g を単位とし、給餌量及び残餌量を小数点以下第1位まで測定し、給餌量値から残餌量値を減じて摂餌量とする。この値を測定期間の日数で除し、1日当たりの平均摂餌量を算出し、小数点以下第2位を四捨五入して小数点以下第1位までを表示する。

臓器実重量は、 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、血液生化学的検査は、別紙-3に示す単位と桁数により表示する。

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。

13-4-2 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。

病理組織学的検査は、臓器ごとに検査不能臓器を除いた臓器数、その他の検査及び測定は、実施できた動物数を検査・（測定）数とする。

体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査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。

病理組織学的検査は、所見のみられなかった動物をグレード0、所見のみられた動物は、その所見の程度及び範囲などを基準にしてグレード1～4に分け、 χ^2 検定を行う。

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。

14. 試資料の保管 (SOP No. STR-0001)

試験計画書、標本、生データ、被験物質、記録文書、最終報告書、信頼性保証証明書、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。なお、被験物質は 50g を保管する。

保管期間は、最終報告書提出後、原則として 15 年間とする。なお、この期間にあっても被験物質及び標本については品質が評価に耐え得る期間保管する。

15. 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。

16. 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

飼料中の夾雑物の分析項目及び許容基準

分 析 項 目	許 容 基 準
水銀	100 ppb
カドミウム	160 ppb
鉛	1.5 ppm
ヒ素	1.0 ppm
DDT	100 ppb
デルドリン	20 ppb
馬拉チオン	2.5 ppm
総アフラトキシン(B ₁ ,B ₂ ,G ₁ ,G ₂)	5 ppb
PCB	50 ppb
エストロゲン活性物	10 ppb
ニトロソアミン類	10 ppb
ヘプタクロール	20 ppb
BHC	20 ppb

飲水の分析項目及び許容基準

分 析 項 目	許 容 基 準
一般細菌	1mL の検水で形成される集落数が 100 以下であること
大腸菌	検出されないこと
鉛及びその化合物	鉛の量に関して、0.01 mg/L 以下
シアン化物イオン及び塩化シアン	シアンの量に関して、0.01 mg/L 以下
硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素	10 mg/L 以下
クロロ酢酸	0.02 mg/L 以下
クロロホルム	0.06 mg/L 以下
ジクロロ酢酸	0.04 mg/L 以下
ジブロモクロロメタン	0.1 mg/L 以下
臭素酸	0.01 mg/L 以下
総トリハロメタン	0.1 mg/L 以下
トリクロロ酢酸	0.2 mg/L 以下
ブロモジクロロメタン	0.03 mg/L 以下
ブロモホルム	0.09 mg/L 以下
ホルムアルデヒド	0.08 mg/L 以下
塩素酸	0.6 mg/L 以下
亜鉛及びその化合物	亜鉛の量に関して、1.0 mg/L 以下
鉄及びその化合物	鉄の量に関して、0.3 mg/L 以下
銅及びその化合物	銅の量に関して、1.0 mg/L 以下
塩化物イオン	200 mg/L 以下
カルシウム、マグネシウム等 (硬度)	300 mg/L 以下
蒸発残留物	500 mg/L 以下
有機物 (全有機炭素(TOC)の量)	5 mg/L 以下
pH 値	5.8 以上 8.6 以下
味	異常でないこと
臭気	異常でないこと
色度	5 度以下
濁度	2 度以下

別紙-3

血液学的検査及び血液生化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 ¹⁾	$\times 10^6/\mu\text{L}$	2
ヘモグロビン濃度(Hgb)	シアンメトヘミアン法 ¹⁾	g/dL	1
ヘマトクリット値(Hct)	計算法($\text{RBC} \times \text{MCV}/10$) ¹⁾	%	1
平均赤血球容積(MCV)	光学的散乱法 ¹⁾	fL	1
平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)	計算法($\text{Hgb}/\text{RBC} \times 10$) ¹⁾	pg	1
平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)	計算法($\text{Hgb}/\text{Hct} \times 100$) ¹⁾	g/dL	1
血小板数	光学的散乱法 ¹⁾	$\times 10^3/\mu\text{L}$	0
網赤血球比	光学的散乱法 ¹⁾	%	1
白血球数	光学的散乱法 ¹⁾	$\times 10^3/\mu\text{L}$	2
白血球分類	光学的散乱法 ¹⁾	%	0
血液生化学的検査			
総蛋白(TP)	ビュレット法 ²⁾	g/dL	1
アルブミン(Alb)	BCG 法 ²⁾	g/dL	1
A/G 比	計算法($\text{Alb}/(\text{TP}-\text{Alb})$) ²⁾	—	1
総ビリルビン	アザビリルビン法 ²⁾	mg/dL	2
グルコース	GlcK・G-6-PDH 法 ²⁾	mg/dL	0
総コレステロール	CE・COD・POD 法 ²⁾	mg/dL	0
トリグリセライド	MGLP・GK・GPO・POD 法 ²⁾	mg/dL	0
リン脂質	PLD・ChOD・POD 法 ²⁾	mg/dL	0
AST	JSCC 法 ²⁾	IU/L	0
ALT	JSCC 法 ²⁾	IU/L	0
LDH	JSCC 法 ²⁾	IU/L	0
ALP	JSCC 法 ²⁾	IU/L	0
γ -GTP	JSCC 法 ²⁾	IU/L	0
CK	JSCC 法 ²⁾	IU/L	0
尿素窒素	カルアゼ・GLDH 法 ²⁾	mg/dL	1
クレアチニン	Jaffe 法 ²⁾	mg/dL	1
ナトリウム	イオン選択電極法 ²⁾	mEq/L	0
カリウム	イオン選択電極法 ²⁾	mEq/L	1
クロール	イオン選択電極法 ²⁾	mEq/L	0
カルシウム	OCPC 法 ²⁾	mg/dL	1
無機リン	PNP・XOD・POD 法 ²⁾	mg/dL	1

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)

2) 自動分析装置 (日立 7080: (株)日立製作所)

試験結果

	頁
吸入チャンバー内イソキサチオン濃度	1
吸入チャンバー内ミストの粒子径	1
生存動物数（雄）	2
生存動物数（雌）	3
一般状態（雄）	4
一般状態（雌）	5
体重（雄）	6
体重（雌）	7
摂餌量（雄）	8
摂餌量（雌）	9
血液学的検査（雄）	10～12
血液学的検査（雌）	13～15
血液生化学的検査（雄）	16～18
血液生化学的検査（雌）	19～21
アセチルコリンエステラーゼ活性（雄雌）	22
アセチルコリンエステラーゼ活性：個体表（雄）	23～24
アセチルコリンエステラーゼ活性：個体表（雌）	25～26
剖検所見（雌）	27
臓器重量：実重量（雄）	28～29
臓器重量：体重比（雄）	30～31
臓器重量：実重量（雌）	32～33
臓器重量：体重比（雌）	34～35
血液のリンパ球サブセット（雄）	36
血液のリンパ球サブセット（雌）	37
胸腺のリンパ球サブセット（雄）	38
胸腺のリンパ球サブセット（雌）	39
脾臓のリンパ球サブセット（雄）	40
脾臓のリンパ球サブセット（雌）	41
病理組織学的検査（雄）	42
病理組織学的検査（雌）	43
血液(血漿)中のイソキサチオン、代謝物濃度（雄雌）	44

吸入チャンバー内イソキサチオン濃度

濃度測定結果 (mg/m³)

群 名 称	秤量法	機器分析法
対 照 群	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
1 mg/m ³ 群	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
3 mg/m ³ 群	3.0 ± 0.1	3.1 ± 0.1
10 mg/m ³ 群	10.1 ± 0.3	10.5 ± 0.6

平均値±標準偏差

吸入チャンバー内ミストの粒子径

粒子径測定結果

群 名 称 測 定 週	1 mg/m ³ 群		3 mg/m ³ 群		10 mg/m ³ 群	
	MMAD (μm)	σ _g	MMAD (μm)	σ _g	MMAD (μm)	σ _g
1 週 目	2.1	1.9	2.0	2.2	2.0	2.2
2 週 目	2.0	2.0	1.9	1.9	2.0	2.0
3 週 目	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
4 週 目	2.0	2.0	1.9	2.1	1.9	2.1

各測定データは OECD 化学品テストガイドライン 412 改定案 (2008 年 9 月 30 日) の基準値 (MMAD: 1~3μm、σ_g: 1.5~3.0) 内であった。

試験番号 : 0752
 動物種・系統 : RAT Cr1:CD(SD) [Crj:CD(SD) IGS]
 報告書種別 : AI 4
 性別 : 雄性

生存動物数表
 頁 : 1

群 名 称	動物数	投与 (週)				
		0	1	2	3	4
Control	10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
1mg/m3	10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
3mg/m3	10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
10mg/m3	10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

生存動物数/有効動物数
 生存率 (%)

試験番号 : 0752
 動物種・系統 : RAT CrI:CD(SD) [CrI:CD(SD) IGS]
 報告書種別 : A1 4
 性別 : 雌性

生存動物数表

頁 : 2

群 名 称	動 物 数	投 与 (週)				
		0	1	2	3	4
Control	10	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0
1mg/m3	10	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0
3mg/m3	10	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0
10mg/m3	10	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0

生存動物数/有効動物数 生存率 (%)	
(HAN360)	BA1S4

一般状態総括表
全動物 (1)

試験番号 : 0752
動物種・系統 : RAT Cr1:CD(SD) [Crj:CD(SD) IGS]
報告書種別 : A1 4

性別 : 雄性

投与 週一日

状態所見	群 名 称	1-7	2-7	3-7	4-7
所見なし	Control	10	10	10	10
	1mg/m3	10	10	10	10
	3mg/m3	10	10	10	10
	10mg/m3	10	10	10	10

(HAN190)

BALS 4

一般状態総括表
全動物 (1)

試験番号 : 0752
動物種・系統 : RAT Cr1:CD(SD) [Crj:CD(SD)IGS]
報告書種別 : A1 4

頁: 2

性別	群 名 称	投与 週一日			
		1-7	2-7	3-7	4-7
状態所見					
所見なし	Control	10	10	10	10
	1mg/m3	10	10	10	10
	3mg/m3	10	10	10	10
	10mg/m3	10	10	10	10

(HAN190) RAIS 4

試験番号 : 0752
 動物種・系統 : RAT Cr1:CD(SD) [CrJ:CD(SD) ICS]
 単位 : g
 報告書種別 : A1 4
 性別 : 雄性

体重 報告書 (総括表)
 全動物 (1)

頁: 1

群 名 称	投与 週一日				
	0-0	1-7	2-7	3-7	4-7
Control	305± 10	351± 15	387± 15	423± 17	450± 19
1mg/m3	305± 10	342± 14	374± 20	404± 22	426± 22
3mg/m3	305± 10	352± 16	389± 18	418± 24	442± 28
10mg/m3	305± 10	349± 12	385± 17	416± 20	440± 20

平均±標準偏差 有意差 : * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$ Dunnett検定
 (HAN260)

BAIS 4

試験番号 : 0752
 動物種・系統 : RAT Cr1:CD(SD) [Crj:CD(SD) IGS]
 単位 : g
 報告書種別 : A1 4
 性別 : 雌性

体重 報告書 (総括表)
 全動物 (1)

頁 : 2

群 名 称	投与 週一日				
	0-0	1-7	2-7	3-7	4-7
Control	215± 8	237± 14	254± 16	266± 17	274± 19
1mg/m3	215± 9	236± 15	248± 14	263± 18	275± 17
3mg/m3	215± 9	238± 11	253± 12	266± 11	278± 15
10mg/m3	215± 9	237± 13	246± 16	258± 17	266± 18

平均±標準偏差
 有意差 :
 *:P≤0.05
 **:P≤0.01
 Dunnett検定

(HAN260)
 BAIS 4

摂餌量 報告書 (総括表)
全動物 (1)

一頁

群 名 称	投与 週一日 (有効日数)			
	1-7 (7)	2-7 (7)	3-7 (7)	4-7 (7)
Control	26.9± 2.3	26.4± 1.7	26.5± 1.7	26.6± 2.0
1mg/m3	24.9± 1.9	24.9± 2.4	25.0± 1.7	25.1± 1.8
3mg/m3	26.4± 2.1	26.2± 1.9	25.7± 2.4	26.0± 3.0
10mg/m3	26.7± 1.9	26.5± 1.5	26.1± 1.8	26.1± 1.4
平均±標準偏差	有意差: *	P≤0.05	**:	P≤0.01
	Dunnnett検定			

(HAN260)

BALIS 4

試験番号 : 0752

動物種・系統 : RAT Cr1:CD(SD) [Cr1:CD(SD) IGS]

単位 : g

報告書種別 : A1

性別 : 雌性

摂餌量 報告書 (総括表)

全動物 (1)

頁 : 2

群 名 称	投与 週一日 (有効日数)			
	1-7(7)	2-7(7)	3-7(7)	4-7(7)
Control	18.6± 1.5	18.7± 1.9	18.7± 1.7	18.2± 1.9
1mg/m3	18.7± 1.6	18.3± 3.0	19.2± 2.3	18.7± 1.8
3mg/m3	18.7± 1.8	19.1± 2.6	19.7± 1.4	18.8± 2.8
10mg/m3	18.4± 2.0	17.1± 1.8	18.5± 1.8	16.9± 1.3
平均±標準偏差	有意差 : *	P≤0.05	** : P≤0.01	Dunnett検定
(HAN260)				
BALS 4				

血液学的検査 (総括表)
全動物 (5週)

試験番号 : 0752
動物種・系統 : DAT Cr1:CD(SD) [Crj:CD(SD)IGS]
測定回数 : 1
性別 : 雄性
報告書種別 : A1

頁 : 1

群 名 称	群 内 動物数	赤血球数 10 ⁶ /μl	ヘモグロビン濃度 g/dl	ヘマトクリット値 %	MCV f l	MCH p g	MCHC g/dl	血小板数 10 ³ /μl
Control	10	8.41± 0.26	15.6± 0.5	45.0±	1.4	18.6± 0.5	34.8± 0.3	1170± 130
1mg/m3	10	8.62± 0.42	15.8± 0.5	45.7±	1.6	18.4± 0.6	34.7± 0.4	1216± 97
3mg/m3	10	8.55± 0.34	15.6± 0.5	45.3±	1.3	18.3± 0.6	34.5± 0.6	1246± 126
10mg/m3	10	8.60± 0.34	15.8± 0.5	45.7±	1.4	18.3± 0.7	34.5± 0.5	1162± 110

平均±標準偏差 有意差 : *:P≤0.05 **:P≤0.01 Dunnett検定

(HCL070)

BAIS 4

試験番号 : 0752
 動物種・系統 : RAT Cr1:CD(SD) [Crj:CD(SD) IGS]
 測定回数 : 1
 性別 : 雄性

血液学的検査 (総括表)
 全動物 (5週)

報告書種別 : A1

頁 : 2

群 名 称	群 内 動物数	網赤血球比 %
Control	10	2.1± 0.2
1mg/m3	10	2.0± 0.3
3mg/m3	10	2.0± 0.3
10mg/m3	10	1.9± 0.3

平均±標準偏差

有意差 : *:P≤0.05 **:P≤0.01 Dunnett検定

(HCL070)

BALS 4

試験番号 : 0752
 動物種・系統 : RAT Cr1:CD(SD) [Crj:CD(SD) IGS]
 測定回数 : 1
 性別 : 雄性
 報告書種別 : A1

血液学的検査 (総括表)
 全動物 (5週)

頁 : 3

群 名 称	群 内 動物数	白血球数 10 ³ /μl	白血球分類 好中球 (%)	リンパ球	単球	好酸球	好塩基球	その他
Control	10	10.73 ± 3.20	16 ± 5	79 ± 5	3 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 0
1mg/m3	10	11.26 ± 2.12	18 ± 5	77 ± 6	3 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 0
3mg/m3	10	12.86 ± 4.17	15 ± 5	80 ± 5	2 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 0
10mg/m3	10	12.24 ± 4.40	18 ± 6	77 ± 6	2 ± 0	2 ± 1	0 ± 0	1 ± 1

平均 ± 標準偏差 有意差 : * : P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01 Dunnett検定

(HCL070)

BAIS 4