

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）報告書

〔 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

2010年3月12日

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

目次

標題	i
試験目的	i
試験法	i
GLP 対応	i
動物福祉	i
試験委託者	ii
試験施設及び運営管理者	ii
試験日程	ii
試験関係者一覧	iii
試資料の保管	iii
試験責任者（最終報告書作成者）の署名、捺印及び日付	iii
陳述書	iv
信頼性保証証明書	v
本文	vi
TABLES	A~N	
FIGURES	1~14	
APPENDICES	1~26	

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）

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した。

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）を参考にして実施した。

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) に準拠し実施した。

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」を遵守した。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。

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

試験施設及び運営管理者

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
副所長 長野 嘉介
神奈川県秦野市平沢 2445

試験日程

試験開始日	2009年10月1日
動物導入日	2009年10月6日
群構成日	2009年10月20日
被験物質投与開始日	2009年10月21日
被験物質投与終了日	2009年11月17日
定期解剖日	2009年11月18、19日
試験終了日	2010年3月12日

試験関係者一覧

試験責任者	: 西沢 共司	(試験管理部 吸入試験室)
被験物質の分析・ 投与・管理	: 西沢 共司 後藤 薫 笠井 辰也 齋藤 新 佐々木俊明 大西 誠 武 信	(試験管理部 吸入試験室) (試験管理部) (試験管理部 吸入試験室) (試験管理部 吸入試験室) (試験管理部 吸入試験室) (試験管理部 分析室) (試験管理部 分析室)
動物管理	: 奥田 裕計 片桐 卓 高信 健司	(試験管理部 動物管理室) (試験管理部 動物管理室) (試験管理部 動物管理室)
病理検査	: 相磯 成敏 妹尾 英樹 梅田 ゆみ 齋藤美佐江 野口 孝義 近藤ひとみ	(病理検査部 病理検査室) (病理検査部 病理検査室) (病理検査部 病理検査室) (病理検査部 病理検査室) (病理検査部 血液・生化学検査室) (病理検査部 血液・生化学検査室)
データ処理及び統計	: 伊川 直樹 石川 寛明 峯 多加志	(企画調整部 情報管理室) (企画調整部 情報管理室) (企画調整部 情報管理室)


試資料の保管

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。被験物質は 50g を保管した。

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。

試験責任者（最終報告書作成者）の署名、捺印及び日付

試験管理部 吸入試験室

西沢共司 
2010年3月12日


陳 述 書


試験名：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）

本試験は、試験計画書に基づき、また、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）に準拠し実施された。

本報告書はその試験結果に基づいてまとめられたものに相違ありません。

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

試験責任者 西沢 共司 
2010 年 3 月 12 日

運営管理者 長野 嘉介 
2010 年 3 月 12 日

信 頼 性 保 証 証 明 書

表題 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）

試験番号 0752

被験物質の名称 イソキサチオン

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）に準拠し実施された。

最終報告書には、試験で使用した方法及び手順が正確に記載されており、報告結果は、試験の生データを正確に反映していることを認める。

なお、監査・査察の実施日及び報告日は、以下のとおりである。


対 象	監査・査察実施日	運営管理者及び試験責任者への報告日
試験計画書	2009 年 10 月 1 日	2009 年 10 月 5 日
試験動物の受け入れ・検疫	2009 年 10 月 6 日	2009 年 10 月 6 日
馴化・群構成	2009 年 10 月 20 日	2009 年 10 月 20 日
動物飼育管理操作		
吸入試験システム	2009 年 10 月 21 日	2009 年 10 月 21 日
病理解剖	2009 年 11 月 18 日	2009 年 11 月 19 日
血液・生化学的検査	2009 年 11 月 18, 19 日	2009 年 11 月 19 日
被験物質の管理	2009 年 10 月 21 日	2009 年 10 月 21 日
	2010 年 2 月 25 日	2010 年 2 月 25 日
データの取り扱い管理	2010 年 2 月 16～25 日	2010 年 2 月 25 日
最終報告書	2010 年 3 月 12 日	2010 年 3 月 12 日

2010 年 3 月 12 日

信頼性保証責任者

所 属 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

職 名 信頼性保証主管

氏 名 松本道治 

イソキサチオンのラットを用いた
吸入による28日間毒性試験報告書

試験番号：0752

本文

本文目次

	頁
要約	1
I 試験材料	4
I-1 被験物質の性状等	4
I-1-1 名称等	4
I-1-2 化学式及び分子量	4
I-1-3 物理化学的性状等	4
I-2 使用被験物質	4
I-3 被験物質の安定性	4
I-4 試験動物	5
II 試験方法	6
II-1 投与	6
II-1-1 投与経路	6
II-1-2 被験物質の投与方法	6
II-1-3 投与期間	6
II-1-4 投与濃度	6
II-1-5 投与濃度の設定理由	6
II-1-6 被験物質の発生方法と濃度調整	7
II-1-7 被験物質濃度の測定	7
II-1-8 吸入チャンバー内ミストの粒子径の測定	8
II-2 動物管理	8
II-2-1 各群の使用動物数	8
II-2-2 群分け及び個体識別方法	9
II-2-3 飼育条件	9
(1) 飼育環境	9
(2) 飼料	10
(3) 飲水	10
II-3 観察・検査項目及び方法	10
II-3-1 動物の生死及び一般状態の観察	10
II-3-2 体重測定	10

II-3-3	摂餌量測定	10
II-3-4	血液学的検査	11
II-3-5	血液生化学的検査	11
II-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	11
	(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	11
	(2) 脳のアセチルコリンエステラーゼ活性の測定	11
II-3-7	血液、胸腺及び脾臓のリンパ球サブセットの測定	12
	(1) 血液のリンパ球サブセットの測定	12
	(2) 胸腺及び脾臓のリンパ球サブセットの測定	12
II-3-8	病理学的検査	12
	(1) 剖検	12
	(2) 臓器重量	12
	(3) 病理組織学的検査	12
II-3-9	血液中の被験物質濃度（主要代謝物を含む）の測定	13
II-4	数値処理と統計方法	13
II-4-1	数値の取り扱いと表示	13
II-4-2	統計処理	14
III	試験成績	15
III-1	生死状況	15
III-2	一般状態	15
III-3	体重	15
III-4	摂餌量	15
III-5	血液学的検査	16
III-6	血液生化学的検査	16
III-7	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	16
III-8	血液、胸腺及び脾臓のリンパ球サブセットの測定	17
III-9	病理学的検査	17
	III-9-1 剖検	17
	III-9-2 臓器重量	17
	III-9-3 病理組織学的検査	17
III-10	血液中の被験物質濃度（主要代謝物を含む）の測定	18
IV	考察及びまとめ	19

V	文献	21
VI	予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び 試験計画書に従わなかつたこと	22

要約

環境省が平成 17 年度に実施した「自治体における街路樹、公園緑地等での防除実態調査」の結果、街路樹や公園等の市街地における使用実績が多い農薬として、本年度においては、イソキサチオンのラットを用いた 28 日間全身ばく露吸入毒性試験を実施し、その生体影響を調査した。

本試験は、OECD テストガイドライン 412 に準拠し、被験物質投与群 3 群と対照群 1 群の計 4 群で、各群雌雄とも 10 匹とし、合計 80 匹を用いた。被験物質の投与は、イソキサチオンのミストを 1 日 6 時間、1 週 5 日間で 28 日間（4 週間）、動物に全身ばく露条件下で吸入ばく露することにより行った。投与濃度は、雌雄とも 0（対照群）、1、3、10 mg/m³ とした。観察、検査として、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、アセチルコリンエステラーゼ活性の測定、リンパ球サブセットの測定、剖検、臓器重量測定、病理組織学的検査及び血液中のイソキサチオン濃度（主要代謝物を含む）の測定を行った。

投与群（1 mg/m³ 群、3 mg/m³ 群、10 mg/m³ 群）の吸入チャンバー内イソキサチオン濃度の実測値は、1.0、3.0、10.1 mg/m³、ミスト粒子の空気動学的質量中位径（MMAD）と幾何標準偏差 σ_g は、1.9~2.1 μm 、1.9~2.2 であり、OECD テストガイドライン 412 の基準値（MMAD：1~3 μm 、 σ_g ：1.5~3.0）内であった。

イソキサチオンのばく露の結果、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 週間吸入ばく露による無毒性量（NOAEC）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。

なお、血漿中において、イソキサチオンは雌雄とも 10 mg/m³ 群の全動物から検出され、他の投与群からは検出されなかった。また、主要代謝物であるヒドロキシイソキサゾールは雌雄ともいずれの投与群からも検出されなかった。

Summary of the 4-week inhalation exposure study of isoxathion in rats

Male and female Crl:CD(SD) rats (10 rats/sex per group) were exposed to isoxathion mist at a target concentration of 0 (control group), 1, 3 or 10 mg/m³ for 6 hrs/day, 5 days/week for 4 weeks, using whole-body inhalation chambers. The animals were observed for clinical signs, and body weight and food consumption once a week. All animals underwent necropsy, and blood was collected for hematology and blood biochemistry at the end of the 4-week exposure period. Organs were removed, weighed and examined for macroscopic and microscopic lesions. Additionally, plasma, erythrocyte and brain acetylcholinesterase activities, blood, thymus and spleen lymphocyte subsets, and concentrations of isoxathion and its major plasma metabolite were measured. The present studies were conducted in accordance with the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Guideline for the Testing of Chemicals 412 "Subacute Inhalation Toxicity: 28-day Study".

Mean actual concentrations of isoxathion in the exposed groups were 1.0, 3.0 and 10.1 mg/m³, and mass median aerodynamic diameters : MMAD (geometric standard deviation: σ g) were 1.9-2.1 μ m (1.9-2.2). Those values were within the range of the standard value (MMAD : 1-3 μ m, σ g : 1.5-3.0) of OECD Guideline for the Testing of Chemicals 412.

No death occurred in any isoxathion-exposed group of either sex. There was no compound-related clinical sign throughout the exposure period. No compound-related effect on body weight, food consumption, hematology, blood biochemistry, lymphocyte subsets or organ weights was found in any exposed group of either sex. No compound-related, macroscopic and microscopic changes were observed in any organ or tissue. In males, statistically significant reduction in acetylcholinesterase activity was found in the erythrocytes and plasma of 10 mg/m³ isoxathion-exposed group. Erythrocyte acetylcholinesterase activity in the 10 mg/m³-exposed males was 41% of control value. Plasma acetylcholinesterase activity in the 10 mg/m³-exposed males was 56% of control value. In females, acetylcholinesterase activity was significantly decreased in the plasma of 3 and 10 mg/m³ isoxathion-exposed groups, and in the erythrocytes of 10 mg/m³ isoxathion-exposed group. Plasma acetylcholinesterase activity in the 3 and 10 mg/m³-exposed females was 76 and 35% of control value, respectively. Erythrocyte acetylcholinesterase activity in the 10 mg/m³-exposed females was 54 % of control value. Of those effects, the reduction in erythrocyte acetylcholinesterase activity observed in the males and females exposed to 10 mg/m³ isoxathion was judged to be toxicological effect, since that was statistically significant

inhibition by 20% or more.

It was concluded from the above results that a no-observed-adverse-effect concentration (NOAEC) for the endpoint of inhibitory effect on erythrocyte acetylcholinesterase activity resulting from the 4-week inhalation exposure to isoxathion is 3 mg/m³.

Isoxathion was detected in the plasma of all rats exposed to 10 mg/m³ isoxathion. Hydroxy isoxazole, a major metabolite of isoxathion, was not detected in any isoxathion-exposed group of either sex.

I 試験材料

I-1 被験物質の性状等

I-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

I-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

I-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

I-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

I-3 被験物質の安定性

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した。

その結果、使用開始前と使用終了後の測定結果に差はみられず、使用期間中の被験物質は

安定であることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 1 に示した。

I-4 試験動物

動物は、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) の厚木飼育センター生産の CrI:CD(SD)ラット (SPF) の雌雄を使用した。

雌雄各 48 匹を 6 週齢で導入し、検疫、馴化を各 1 週間実施した後、発育順調で一般状態に異常を認めなかった動物から、体重値の中央値に近い雌雄各 40 匹 (群構成時体重範囲、雄: 287~320g、雌: 198~232g) を選別し、試験に用いた。

なお、CrI:CD(SD)ラット (SPF) を選択した理由は、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ことによる。

II 試験方法

II-1 投与

II-1-1 投与経路

投与経路は全身ばく露による経気道投与とした。

II-1-2 被験物質の投与方法

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、動物に全身ばく露することにより行った。

II-1-3 投与期間

投与期間は1日6時間、1週5日のばく露で28日間（4週間）とし、計20回のばく露を行った。

II-1-4 投与濃度

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

II-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（対照群）、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）にばく露した。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ばく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/m^3 とし、以下 $3, 1 \text{ mg/m}^3$ と決定した。

II-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した。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した。

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した。

II-1-7 被験物質濃度の測定

投与日は1日3回（ばく露開始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（ $47 \text{ mm}\phi$ ）に捕集した。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した（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した。定量結果と捕集空気量からイソキサチオン濃度を算出した（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した。また、対照群についても同様な操作を行った。

秤量法と機器分析法の測定結果（平均値 \pm 標準偏差、単位 mg/m^3 ）を TABLE A と下記に示した。ほぼ、設定どおりのばく露が行えた。

群名称	秤量法	機器分析法
対照群(0 mg/m^3 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

II-1-8 吸入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、ミストの粒子径測定を行った。

アンダーセンサンプラーの各ステージの被験物質捕集量及び捕集量累積率を APPENDIX 2 に示した。また、その結果を対数正規確率紙に粒径累積頻度分布図としてプロットし、FIGURE 3~14 に示し、各図より空気動力学的質量中位径（MMAD）及び幾何標準偏差 σ_g を求め下記に示した。各測定データは OECD 化学品テストガイドライン 412 の基準値（MMAD：1~3 μm 、 σ_g ：1.5~3.0）内であった。

群名称	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

II-2 動物管理

II-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 匹の動物を用いた。

各群の使用動物数と動物番号

群番号	群名称	雄		雌	
		使用動物数(動物番号)		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)	

II-2-2 群分け及び個体識別方法

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かった動物を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）により実施した（文献 4）。

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った。また、ケージには個体識別番号を記したラベルを付した。

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した。

II-2-3 飼育条件

(1) 飼育環境

検疫期間中は検疫室（518 室）で、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した。

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したケージを以下に示した。検疫室、吸入試験室の温度、湿度は実測値（平均値±標準偏差）を<>内に、また、吸入チャンバー内環境の測定結果は APPENDIX 3 に示した。検疫室、吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境には、動物の健康状態に影響を与えるような大きな変化は認められなかった。

温 度 : 検疫室 ; $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ <518 室 ; $23.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ >
吸入試験室 ; $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ <516 室 ; $20.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ >
吸入チャンバー内 ; $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$

湿 度 : 検疫室 ; $55 \pm 15\%$ <518 室 ; $53 \pm 1\%$ >
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た。ただし、被験物質ばく露中及び定期解剖前日の夕方からは飼料を摂取させなかった。

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、保管した。また、飼料中の夾雑物は試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認し、保管した。

(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た。ただし、被験物質ばく露中は給水しなかった。

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と照合して異常のないことを確認し、保管した。

II-3 観察・検査項目及び方法

II-3-1 動物の生死及び一般状態の観察

動物の生死及び瀕死の確認を、ばく露を行った日はばく露前とばく露後の 2 回、ばく露を行わなかった日は午前中に 1 回行った。また、一般状態の詳細な観察は週 1 回行った。

II-3-2 体重測定

体重測定は週 1 回行った。また、定期解剖動物の搬出時にも体重 (搬出時体重) を測定した。

II-3-3 摂餌量測定

摂餌量は週 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した。

II-3-4 血液学的検査

定期解剖時に生存していた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った。検査方法は APPENDIX 4 に示した。

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(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、血小板数、網赤血球比、白血球数、白血球分類

II-3-5 血液生化学的検査

定期解剖時に生存していた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、得られた血漿を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX 4 に示した。

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

II-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

定期解剖時に生存していた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、得られた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った。

(2) 脳のアセチルコリンエステラーゼ活性の測定

定期解剖時に生存していた動物について、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った。なお、もう一方は病理組織学的検査を行った。

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 法により測定した。

II-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

定期解剖時に生存していた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った。

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

定期解剖時に生存していた動物のうち、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った。

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、冷蔵保存した。

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、同研究所に依頼した。

II-3-8 病理学的検査

(1) 剖検

全動物について肉眼的に観察を行った。

(2) 臓器重量

全動物について、下記に示した臓器の湿重量 (臓器実重量) を測定した。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) を算出した。

測定臓器：胸腺、副腎、精巣、卵巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳

(3) 病理組織学的検査

全動物について下記に示した器官、組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で

固定後、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、*を付した器官、組織を光学顕微鏡で病理組織学的に検査した。

なお、鼻腔については切歯の後端（レベル1）、切歯乳頭（レベル2）、第一臼歯の前端（レベル3）の3ヶ所（文献5）に加えて鼻前庭部の1ヶ所で切り出し（横断）、検査した。
 検査器官・組織：皮膚、鼻腔（4箇所を横断）*、鼻咽頭*、喉頭*、気管*、肺*、骨髄（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、卵巣*、子宮*、膣、乳腺、脳（嗅球を含む）*、脊髄（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）

II-3-9 血液中の被験物質濃度（主要代謝物を含む）の測定

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、得られた血漿中の被験物質濃度（主要代謝物を含む）の測定をLC-MS/MSを用いて行った。

なお、被験物質濃度（主要代謝物を含む）の測定は、(株)島津テクニクス（京都市中京区西ノ京三条坊町2番地の13）に依頼した。

II-4 数値処理と統計方法

II-4-1 数値の取り扱いと表示

各数値データは測定機器の精度に合わせて表示した。

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位までを表示した。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位まで表示した。

体重はgを単位とし、整数値の1の位まで測定し、表示した。

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した。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位までを表示した。

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、表示した。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位までを表示した。

血液学的検査、血液生化学的検査はAPPENDIX 4に示した単位と桁数により表示した。

なお、各数値データの平均値及び標準偏差は、上記に示した桁数と同様になるよう四捨五

入を行い表示した。

II-4-2 統計処理

各検査及び測定は、実施できた動物数を検査（測定）数とした。

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った。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 型の多重比較を行った。

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 検定を行った。

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った。

Ⅲ 試験成績

Ⅲ-1 生死状況

生死状況を TABLE B 1, 2 に示した。

—雌雄—

動物の死亡はみられなかった。

Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE C 1, 2 及び APPENDIX 5, 6 に示した。

—雌雄—

特記すべき所見はみられなかった。

Ⅲ-3 体重

体重の推移を TABLE D 1~4、FIGURE 1, 2 及び APPENDIX 7, 8 に示した。

—雄—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

投与群の最終体重は対照群に対し、1 mg/m³群：95%、3 mg/m³群：98%、10 mg/m³群：98%であった。

—雌—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

投与群の最終体重は対照群に対し、1 mg/m³群：100%、3 mg/m³群：101%、10 mg/m³群：97%であった。

Ⅲ-4 摂餌量

摂餌量を TABLE E 1, 2 及び APPENDIX 9, 10 に示した。

—雌雄—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

Ⅲ-5 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE F 1, 2 及び APPENDIX 11, 12 に示した。

—雌雄—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

Ⅲ-6 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE G 1, 2 及び APPENDIX 13, 14 に示した。

—雄—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

—雌—

カリウムにおいて、統計学的に有意な高値が 10 mg/m³ 群でみられた。

Ⅲ-7 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

アセチルコリンエステラーゼ活性の測定の結果を TABLE H 1, 2 及び APPENDIX 15, 16 に示した。

—雄—

赤血球と血漿のアセチルコリンエステラーゼ活性において、統計学的に有意な低下が 10 mg/m³ 群でみられた。

投与群のアセチルコリンエステラーゼ活性値は対照群の値に対し、脳は 1 mg/m³ 群：95%、3 mg/m³ 群：98%、10 mg/m³ 群：97%、赤血球は 1 mg/m³ 群：83%、3 mg/m³ 群：83%、10 mg/m³ 群：41%、血漿は 1 mg/m³ 群：84%、3 mg/m³ 群：88%、10 mg/m³ 群：56%であった。

—雌—

血漿のアセチルコリンエステラーゼ活性において、統計学的に有意な低下が 3 mg/m³ 以上の群で、赤血球のアセチルコリンエステラーゼ活性において、統計学的に有意な低下が 10 mg/m³ 群でみられた。

投与群のアセチルコリンエステラーゼ活性値は対照群の値に対し、脳は 1 mg/m³ 群：105%、3 mg/m³ 群：100%、10 mg/m³ 群：104%、赤血球は 1 mg/m³ 群：93%、3 mg/m³ 群：79%、10 mg/m³ 群：54%、血漿は 1 mg/m³ 群：91%、3 mg/m³ 群：76%、10 mg/m³ 群：35%であった。

Ⅲ-8 血液、胸腺及び脾臓のリンパ球サブセットの測定

リンパ球サブセットの測定結果を TABLE I 1, 2 及び APPENDIX 17, 18 に示した。なお、測定結果の表記において、胸腺と脾臓では CD4+、CD8+はそれぞれ、CD4+CD8-、CD4-CD8+と表記した。また、血液と脾臓においては T 細胞検出のために行った CD3+（汎 T 細胞）の測定結果も合わせて記した。

—雄—

血液、胸腺及び脾臓のリンパ球サブセットの測定結果に被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

なお、胸腺のリンパ球サブセットの測定において、未成熟 T 細胞のダブルネガティブ細胞（CD4-CD8-）の統計学的に有意な増加が 3 mg/m³群にみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

—雌—

血液、胸腺及び脾臓のリンパ球サブセットの測定結果に被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

Ⅲ-9 病理学的検査

Ⅲ-9-1 剖検

剖検所見を TABLE J 及び APPENDIX 19, 20 に示した。

—雌雄—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

Ⅲ-9-2 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量と体重比を TABLE K 1, 2 と TABLE L 1, 2 及び APPENDIX 21, 22 と APPENDIX 23, 24 に示した。

—雌雄—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

Ⅲ-9-3 病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を TABLE M 1, 2 及び APPENDIX 25, 26 に示した。

—雌雄—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

Ⅲ-10 血液中の被験物質濃度（主要代謝物を含む）の測定

血液中（血漿中）のイソキサチオンと主要代謝物であるヒドロキシイソキサゾール（文献6）の濃度測定結果をTABLE Nに示した。

—雄—

血漿中のイソキサチオンは10 mg/m³群の全動物から検出され、その他の投与群と対照群からは検出されなかった。10 mg/m³群の検出濃度は3.92～5.61 ng/mLであった。

代謝物、ヒドロキシイソキサゾールはいずれの群からも検出されなかった。

—雌—

血漿中のイソキサチオンは10 mg/m³群の全動物から検出され、その他の投与群と対照群からは検出されなかった。10 mg/m³群の検出濃度は3.61～5.85 ng/mLであった。

代謝物、ヒドロキシイソキサゾールはいずれの群からも検出されなかった。

IV 考察及びまとめ

環境省が平成 17 年度に実施した「自治体における街路樹、公園緑地等での防除実態調査」の結果、街路樹や公園等の市街地における使用実績が多い農薬として、本年度においては、イソキサチオンのラットを用いた 28 日間全身ばく露吸入毒性試験を実施し、その生体影響を調査した。

本試験は、OECD テストガイドライン 412 に準拠し、被験物質投与群 3 群と対照群 1 群の計 4 群で、各群雌雄とも 10 匹とし、合計 80 匹を用いた。被験物質の投与は、イソキサチオンのミストを 1 日 6 時間、1 週 5 日間で 28 日間（4 週間）、動物に全身ばく露条件下で吸入ばく露することにより行った。投与濃度は、雌雄とも 0（対照群）、1、3、10 mg/m³ とした。観察、検査として、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、アセチルコリンエステラーゼ活性の測定、リンパ球サブセットの測定、剖検、臓器重量測定、病理組織学的検査及び血液中のイソキサチオン濃度（主要代謝物を含む）の測定を行った。

イソキサチオンのばく露の結果、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、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影響と思われる変化はみられなかった。

血液生化学的検査では、雌の 10 mg/m³ 群でカリウムが統計学的有意に高値を示しているが、神経症状に異常が認められなかったこと等から、イソキサチオンによる影響ではないと考えられた。

リンパ球サブセットの測定では、雄の 3 mg/m³ 群で胸腺リンパ球数が統計学的有意に高値を示しているが、10 mg/m³ 群で有意差がなかったことから、イソキサチオンによる影響ではないと考えられた。

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。「Guidelines for the preparation of toxicological working papers for the WHO Core Assessment Group of the Joint Meeting on Pesticide Residues」では、農薬によるコリンエステラーゼ活性の低下について、統計学的に有意、かつ、20%以上の阻害が、脳又は赤血球のコリンエステラーゼ活性に認められる場合を毒性影響としている（文献 7）。本試験では、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が、統計学的に有意、かつ、20%以上の阻害（雄：59%、雌：46%の活性低下）が認められた。3 mg/m³ 以下の群では、雌雄とも脳及び赤血球に統計学的に有意で 20%以上の活性阻害は認められなかった。上記基準に基づき、本試験におけるイソキサチオンのラットに対する 28 日間吸入ばく露による無毒性量（NOAEC）は、赤血球のアセチルコリンエステラーゼ活性の阻害をエンドポイントとして 3 mg/m³ であると考えられる。

また、投与期間終了後の定期解剖時に採血し、血漿中のイソキサチオンと主要代謝物であ

るヒドロキシイソキサゾールの濃度を測定した。その結果、イソキサチオンは雌雄の 10 mg/m³ 群の全動物から検出され、その他の投与群と対照群からは検出されなかった。10 mg/m³ 群の検出濃度は雄：3.92～5.61 ng/mL、雌：3.61～5.85 ng/mL であり、雌雄は同様な値であった。代謝物、ヒドロキシイソキサゾールは雌雄とも、いずれの群からも検出されなかった。

以上のように、イソキサチオンを雌雄のラットに 0 (対照群)、1、3、10 mg/m³ の濃度で 28 日間全身ばく露吸入毒性試験を実施した結果、毒性影響として雌雄の 10 mg/m³ 群で赤血球のアセチルコリンエステラーゼ活性の低下が認められたことから、これをエンドポイントとして、無毒性量 (NOAEC) は 3 mg/m³ であると判断した。

V 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.
5. Nagano K, Katagiri T, Aiso S, Senoh H, Sakura Y, Takeuchi T. 1997. Spontaneous lesions of nasal cavity in aging F344 rats and BDF1 mice. *Exp Toxic Pathol.* 49:97-104.
6. 農薬情報. 2009. カルホス. グリーンジャパン (三共アグロ (株))
<http://www.greenjapan.co.jp/karuhos.htm>. [accessed 12 November 2009].
7. WHO. 2000. Pesticide residues. Guidelines for the preparation of toxicological working papers for the WHO Core Assessment Group of the Joint Meeting on Pesticide Residues. Geneva: World Health Organization.

VI 予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたこと

予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたことはなかつた。