２００４年１１月　８日

イソチオシアン酸メチルのラットを用いる急性経口投与毒性試験

厚生労働省医薬局審査管理課
化学物質安全対策室　委託

財団法人食品薬品安全センタ
秦　野　研　究　所

【目　　次】

要　約 …… 1
試験目的 …… 2
方　法 …… 3
1．被験物質 …… 3
2．使用動物および飼育方法 …… 3
3．投与検体の調製 …… 4
4．投与量の設定および投与方法 …… 5
5．観察および検査 …… 6
1）一般状態の観察 …… 6
2）体重測定 …… 6
3）病理学検査 …… 6
6．データ解析法 …… 7

結果および考察 …… 9
1．死亡動物 …… 9
2．一般状態 …… 9
3．体重推移 …… 9
4．病理学検査 …… 9

Tables　1～5

【要　　約】

イソチオシアン酸メチル（以下、ITCM と略記）の Sprague-Dawley 系ラットを用いる急性経口投与毒性試験を実施した。

投与開始の投与量を 300 mg/kg とし（第 1 段階）、投与動物の死亡動物数に基づき、第 2 および 3 段階と、段階毎に逐次投与を行った。第 2 および 3 段階は 50 mg/kg を投与し、各段階とも雌 3 匹を使用した。投与日（観察第 1 日）から 14 日間観察を行い、観察期間中に体重を測定し、観察第 15 日に屠殺して剖検した。

その結果、第 1 段階の 300 mg/kg 投与群の全例（3/3 例）が投与当日に死亡した。同群では、腹臥位、皮膚（耳介、四肢、鼻部、尾部）の蒼白化、流涎、不穏および一過性の間代性痙攣が観察され、投与後 1～3 時間に死亡した。死亡時の剖検では、口および鼻周囲の皮膚が濡れており、肺は赤色調で、一部に暗赤色域が認められた。また、1 例のみで前胃粘膜が顕著に水腫様を呈していた。

一方、50 mg/kg 投与群（第 2 および 3 段階）では死亡動物はみられなかった。同群では、体重は順調に増加し、一般状態に異常は認められなかったが、剖検時に 1 例で前胃粘膜に肥厚した白色調の硬化部が観察された。

従って、ITCM の Globally Harmonized Classification System (GHS) はクラス 3 に分類され、LD_{50} cut-off 値は 200 mg/kg b.w. であると判断された。

【試　験　目　的】

イソチオシアン酸メチル（別名 メチルイソチオシアネート）は、化学物質管理促進法（PRTR法）で第一種指定化学物質に指定される劇物（化審法：2-168-7）であり、農薬（殺虫剤）等として用いられている。

OECD 既存化学物質安全性点検等に係る毒性調査の一環として、イソチオシアン酸メチルの安全性確認の資料を得るために、ラットを用いる急性経口投与毒性試験を実施した。

本試験は、OECD 化学物質試験法ガイドライン「[423] Acute Oral Toxicity- Acute Toxic Class Method」（1996 年 3 月 22 日採択、2001 年 12 月 17 日改訂）に準拠し、「化学物質 GLP」（平成 12 年 3 月 1 日改正、環保安第 41 号、生衛発第 268 号、平成 12・02・14 基局第 1 号）を遵守して実施した。

【方　　法】

1．被験物質

被験物質として用いたイソチオシアン酸メチル（以下、ITCM と略記）の性状は以下の通りである。

化学名	イソチオシアン酸メチル	
別　名	メチルイソチオシアネート	
英　名	Methane, isothiocyanato-	
CAS No.	556-61-6	
分子式	C_2H_3NS	
分子量	73.12	
物理化学的性質	性　状	：　黄褐色澄明の液体（強い刺激臭）
	凝固点	：　34.4℃
	沸　点	：　119℃
	溶解性	：　水に不溶、エタノールおよびクロロホルムに混和
構造式	$CH_3-N=CS$	

本試験には、　　から購入した ITCM 〔ロット番号　　、含量 99.8%（GC)、Appendix A〕を用いた。被験物質は受領後（被験物質受領日：2002 年 10 月 8 日）から使用時まで、被験物質受領保管室において密閉して冷蔵下（実測値：2～7℃）で保管した。また、秦野研究所で実施する本被験物質の反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験（試験計画番号 R-02-006）の投与終了後に残余被験物質を被験物質購入先に送付し、購入先にて再度品質試験を実施し、試験期間中、安定であったことを確認した（Appendix B)。

2．使用動物および飼育方法

7 週齢の Sprague-Dawley(SD)系[Crj:CD(SD)IGS、SPF] の雌ラットを、日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センターから購入し、飼育環境への馴化と検疫を兼ねて入荷日を含めて 5 日間予備飼育した。検疫・馴化期間中、毎日外観および一般状態を観察し、入荷日および検疫終了日に体重を測定した。検疫・馴化期間中の個体識別は各飼育ケージに試験計画番号、性別、仮動物番号を記入した動物カードを掛けて行った。入荷当日に雌 1 例（仮動物番号 16）の鼻部がやや大きかったが、翌日には異常はみられなかった。同例以外の動物の検疫・馴化期間中の一般状態に異常は認められず、体重は全例で順調に増加した。群分けは仮動物番号 16 を除く動物で行い、検疫終了時の測定体重をもとに体重別層化無作為抽出法により、3 匹ずつから

なる6段階に分け、計18匹を試験に用いた。投与時の週齢は各段階とも8週齢であった。なお、群分け除外動物および余剰動物（雌3匹）は被験物質投与群の解剖終了日までに、採血練習に使用した。

動物入荷日：2003年1月15日
入荷匹数：雌21匹
入荷時体重：雌 149.8～168.7 g（平均 159.9 g）
投　与　日：2003年1月20日～2003年1月22日
投与時体重：雌 157.5～176.2 g（平均 167.1 g）

群分け後の個体識別は、各動物の尾にフェルトペンで一連の動物番号を付した。また、各飼育ケージには段階ごとに色彩で識別した動物カードに試験計画番号、性別、動物番号、投与量および投与年月日を記入した動物カードを掛けた。

全飼育期間を通じ、動物を金属製金網床ケージ（220w×270d×190h mm）に1匹ずつ収容し、許容温度21.0～25.0℃、許容湿度40.0～75.0%、換気回数約15回／時間、照明12時間（7時～19時点灯）に制御された飼育室（7号室）で、固形飼料（CE-2、日本クレア株式会社）および水道水（秦野市水道局給水）を自由に摂取させて飼育した。なお、飼育期間中、飼育室の温湿度の実測値は、それぞれ22.5～24.0℃、42.5～58.0%であった。また、供給した飼料および水には試験に支障を来す可能性のある混入物はなかった。

3．投与検体の調製

被験物質を約37℃の温水中で融解させた後、各固定用量ごとに秤量し、媒体を加え、所定濃度（%(w/v)）に調製した。被験物質が水に不溶で、油に溶解するため、媒体は corn oil（ロット番号 V2E7069、製造元：ナカライテスク株式会社）を選択した。投与検体は冷蔵下（実測値：3～6℃）に保管した。固定用量と被験物質濃度は以下の通り。

固定用量（mg/kg）	濃度（%(w/v)）
2000	40
300	6
50	1
5	0.1

秦野研究所で、投与に先立ち、被験物質の0.1および40%（w/v）溶液について、冷蔵条件下における調製後8日間の安定性を確認した（Appendix C）。また、2003年1月17日に調製した各濃度の調製検体中の被験物質含量を測定し、規定範囲内（平均含量が調製指示濃度の95.4～107%）にあることを確認した（Appendix D）。なお、投与検体は溶液のため均一性試験は実施しなかった。

調製検体中の被験物質濃度の測定は、各調製検体を1mLずつ採取し、ジクロロメタンで一定量とした後、ジクロロメタンで適宜希釈して試料溶液を調製した。別に、被験物質を必要量秤取し、ジクロロメタンに溶解して標準溶液（2、5、10 μg/mL）を調製した。試料溶液および標準溶液をガスクロマトグラフ（GC）法により測定し、標準溶液から作成した検量線を用いて濃度を求めた。GC条件を以下に示す。

分析カラム	:	Pora PLOT Q （内径0.53 mm、長さ10 m、膜厚20 μm、CHROMPACK）
昇温条件	:	80℃（1分間）→20℃／分→150℃→5℃／分→165℃→20℃／分→220℃
キャリアーガス	:	ヘリウム（50 kPa）
水素	:	60 kPa
空気	:	50 kPa
注入口温度	:	220℃
検出器温度	:	220℃
試料注入量	:	1μL（スプリットレス）

4．投与量の設定および投与方法

被験物質のラット経口投与時の50%致死量は97 mg/kgとの報告がある（製品安全データシート）。これをもとに投与開始の投与量は、投与した動物のうち何匹かに死亡がみられると予想される用量である300 mg/kgを選択した。投与は1日間隔で1段階ごとに逐次実施し、第2段階以降の投与群は、いずれも前日投与群の死亡動物数をもとに投与量を決定した。即ち、2003年1月20日に第1段階の投与を実施した結果、投与当日に全例（3/3例）が死亡した。この死亡数をもとに、2003年1月21日投与の第2段階は50 mg/kgを投与した。この結果、第2段階では投与翌日に死亡例がみられなかったため、2003年1月22日の第3段階は再度50 mg/kgを投与した。その後、観察期間中、第2および第3段階ともに死亡例がみられず、被験物質の毒性分類が確定したため、第4段階以降の動物は投与を実施しなかった。なお、第4段階以降の動物は被験物質投与群の解剖終了日までに、採血練習に使用した。

動物を投与前日の16時より絶食させた後、投与直前に測定した体重をもとに投与液量を算出し、ラット用胃管を用いて強制的に単回経口投与した。投与は9時13分～9時15分に行い、給餌は投与後約3時間に行った。

各群の投与物質、投与量、濃度、投与容量および動物番号は以下の通りである。

投与段階	投与物質	投与量 (mg/kg)	濃度 (%(w/v))	投与容量 a) (mL/kg)	動物番号 雌
1	ITCM	300	6	5	1～3
2	ITCM	50	1	5	4～6
3	ITCM	50	1	5	7～9
4	b)	b)	b)	b)	10～12
5	b)	b)	b)	b)	13～15
6	b)	b)	b)	b)	16～18

a) 投与直前の体重をもとに個体別の投与液量（mL）を算出した。
b) 動物への投与は実施しなかった。

5．観察および検査

1) 一般状態の観察

投与後の全例について、投与日（観察第1日）は投与後約1時間にわたり継続的に観察し、その後は約1時間毎に投与後6時間まで観察した。300 mg/kg 投与群の動物については、投与後1時間の時点でも、動物が死亡する等の急激な症状の推移が認められたため、全例の死亡まで継続的に一般状態の観察を継続した。観察第2日以降は、毎日1回観察した。

2) 体重測定

投与後の全例について、投与日の投与直前、観察第2、4、8、11および15日に測定した。また、死亡例は死亡確認後速やかに測定した。

3) 病理学検査

投与後の死亡例は死亡確認後速やかに、生存例は観察第15日に全例をペントバルビタール・ナトリウム麻酔下で放血屠殺して剖検した。剖検時に、脳、下垂体、眼球、甲状腺、心臓、気管、肺、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、消化管、生殖器、乳腺、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、大腿骨骨髄、膵臓、顎下腺、舌、食道、大動脈、ハーダー腺および皮膚の肉眼的観察を行った。これらのうち、死亡例の全例、生存例のうち各投与段階の最も動物番号が若い1例（動物番号4および7）の主要器官・組織（脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、消化管）を0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液で固定した。なお、組織学検査は実施しなかった。

6．データ解析法

体重について、固定用量ごとに平均値および標準偏差値を算出した。

【結果および考察】

1．死亡動物（Table 1）

300 mg/kg 投与群の全例（3/3 例）が投与当日に死亡した。50 mg/kg 投与群では第 2 および第 3 段階ともに死亡動物はみられなかった。

2．一般状態（Table 2）

300 mg/kg 投与群では、腹臥位、皮膚（耳介、四肢、鼻部、尾部）の蒼白化、流涎、不穏（ケージ内を落着きなく動き回る）あるいは自発運動の低下が動物番号 1（以下、No. 1 と略記）および No. 3 で投与後 7 分～14 分の間から、No. 2 で投与後 23 分～40 分の間から観察された。これらの所見が継続して認められる中、一過性の間代性痙攣が No. 1 で投与後 25 分、No. 3 で投与後 43 分、No. 2 で投与後 73 分に認められた。その後、No. 1 では投与後 57 分に横臥位となり自発運動は消失し、投与後 60 分に死亡が確認された。No. 3 では投与後 89 分に死亡が確認され、No. 2 では投与後 120 分に自発運動が消失し、投与後 126 分に死亡が確認された。

50 mg/kg 投与群では、全例で一般状態の異常は認められなかった。

3．体重推移（Table 3、4）

観察期間中、50 mg/kg 投与群では全例で順調な体重増加を示した。

4．病理学検査（Table 5）

300 mg/kg 投与群の死亡時剖検では、全例で口および鼻周囲の皮膚が濡れており、肺は赤色調で、一部に暗赤色域が認められた。また、1 例（No. 2）では前胃粘膜が顕著に水腫様を呈していた。観察第 15 日に剖検した 50 mg/kg 投与群では、1 例（No. 7）で前胃粘膜に肥厚した白色調の硬化部が観察された。これ以外の 50 mg/kg 投与例では、器官・組織に肉眼的異常所見は認められなかった。前胃粘膜の肉眼的変化は刺激性の強い被験物質を経口投与したために生じた変化と考えられた。また、死亡例のみで認められた肺の変化は迅急性に症状が悪化し、循環不全に陥ったために生じたと考えられたことから、組織学検査は実施しなかった。

以上の結果より、本試験条件下での ITCM 単回投与の結果、300 mg/kg 投与群の全例が死亡し、50 mg/kg 投与群では死亡は認められなかった。従って、ITCM の Globally Harmonized

Classification System (GHS)はクラス 3 に分類され、LD_{50} cut-off 値は 200 mg/kg b.w.であると判断された。

Table 1 Mortality in female rats after single oral administration of ITCM

Dose (mg/kg)	Step	Number of animals	Experimental days															Mortality
			1 [a)]	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
300	1	3	3															3/3
50	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3
50	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3

a) the day of administration

Table 2 Clinical signs in female rats after single oral administration of ITCM

Dose	Step	Animal	Clinical	Times after administration																	Experimental days
				1						2						3	4	5	6	hour	2～15
(mg/kg)		No.	signs	0～10	11～20	21～30	31～40	41～50	51～60	61～70	71～80	81～90	91～100	101～110	111～120 min						
300	1	1	Prone position	+	+	+	+	+	+												
			Pale skin	+	+	+	+	+	+												
			Salivation	+	+	+	+	+	+												
			Restlessness	-	+	+	+	+	+												
			Clonic convulsion	-	-	+	-	-	-												
			Lateral position	-	-	-	-	-	+												
			Loss of locomotor activity	-	-	-	-	-	+												
			Death	-	-	-	-	-	+												
		2	Decrease in locomotor activity	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-						
			Prone position	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
			Pale skin	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
			Salivation	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
			Restlessness	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
			Clonic convulsion	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-						
			Loss of locomotor activity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+						
			Death	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+					
		3	Prone position	-	+	+	+	+	+	+	+	+									
			Pale skin	-	+	+	+	+	+	+	+	+									
			Salivation	-	+	+	+	+	+	+	+	+									
			Restlessness	-	+	+	+	+	+	+	+	+									
			Clonic convulsion	-	-	-	-	+	-	-	-	-									
			Death	-	-	-	-	-	-	-	-	+									
50	2	4	Abnormality	-	-	-	-	-	-						-	-	-	-	-		-
		5	Abnormality	-	-	-	-	-	-						-	-	-	-	-		-
		6	Abnormality	-	-	-	-	-	-						-	-	-	-	-		-
	3	7	Abnormality	-	-	-	-	-	-						-	-	-	-	-		-
		8	Abnormality	-	-	-	-	-	-						-	-	-	-	-		-
		9	Abnormality	-	-	-	-	-	-						-	-	-	-	-		-

-, negative; +, positive

Table 3 Body weight changes in female rats after single oral administration of ITCM ; g

Dose (mg/kg)	Step	Animal No.	Experimental days 1 [a)]	2	4	8	11	15
300	1	1	164.8	(163.4) b)				
		2	165.9	(161.9)				
		3	157.5	(153.0)				
		N	3					
		Mean	162.7					
		S.D.	4.6					
50	2	4	171.0	186.8	199.8	229.8	243.8	248.6
		5	172.3	195.5	206.9	227.9	235.4	244.0
		6	160.4	175.6	189.7	209.3	220.9	233.4
	3	7	176.2	195.2	209.0	226.6	234.1	247.7
		8	171.7	185.9	196.4	220.9	227.9	248.9
		9	164.5	181.7	192.2	216.1	218.2	228.2
		N	6	6	6	6	6	6
		Mean	169.4	186.8	199.0	221.8	230.1	241.8
		S.D.	5.8	7.7	7.8	7.9	9.6	8.9

a) the day of administration

b) The values in parenthesis were body weight at the time of death.

Table 4 Body weight gain in female rats after single oral administration of ITCM ; g

Dose (mg/kg)	Step	Animal No.	Experimental days 1 [a)] - 2	2 - 4	4 - 8	8 - 11	11 - 15
300	1	1	Died				
		2	Died				
		3	Died				
50	2	4	15.8	13.0	30.0	14.0	4.8
		5	23.2	11.4	21.0	7.5	8.6
		6	15.2	14.1	19.6	11.6	12.5
	3	7	19.0	13.8	17.6	7.5	13.6
		8	14.2	10.5	24.5	7.0	21.0
		9	17.2	10.5	23.9	2.1	10.0
		N	6	6	6	6	6
		Mean	17.4	12.2	22.8	8.3	11.8
		S.D.	3.3	1.6	4.4	4.1	5.5

a) the day of administration

Table 5 Macroscopic findings in female rats after single oral administration of ITCM

Dose (mg/kg)	Step	Animal No.	Organs	Findings
300	1	1	Lung :	Reddish
				Area, dark red, focal
			Skin :	Wet, around mouth and nose
		2	Lung :	Reddish
				Area, dark red, focal
			Forestomach :	Edematous, mucosa
			Skin :	Wet, around mouth and nose
		3	Lung :	Reddish
				Area, dark red, focal
			Skin :	Wet, around mouth and nose
50	2	4		No abnormality
		5		No abnormality
		6		No abnormality
	3	7	Forestomach :	Area, whitish/thickening/hard, mucosa
		8		No abnormality
		9		No abnormality