

Eurofins ・ Product Safety Laboratories

製品

EasyDECON 200-531X

研究タイトル

ラットを用いた急性吸入毒性試験-限界試験

データ要件

米国 EPA 健康影響試験ガイドライン、OPPTS 870.1300 (1998)

著者

ジェニファー・デュランド、理学士

調査終了日

2008年6月4日

試験場所

Eurofins ・ Product Safety Laboratories

試験所研究番号

24401

p2

データの非機密性の告知

本研究に含まれるいかなる情報について、FIFRA 10 (d)(1)(A)、(B)または(C)の範囲ではないと理由で、機密保持を主張することはない。

会社名： EFT HOLDINGS, INC.

会社の代理人： 氏名、役職名、署名、日付

p3

優良試験所基準の遵守の告知

EasyDECON 200-531X

この研究は、40 CFR Part 160： 米国 EPA (FIFRA) の要件を満たしている。受領および試

験をした被験物質の特性に関する特定の情報は、試験のスポンサーの責任である（被験物質の項を参照）。

試験責任者：ジェニファー・デュランド、理学士

日付

提出者：署名、日付

スポンサー：署名、日付

p4

品質保証の告知

Eurofins ・ Product Safety Laboratories の品質保証部門は、本試験が EPSL の標準運用手順、試験プロトコル、および該当するすべての GLP 基準を遵守しているかどうかを審査した。この最終報告書は、実施された作業を正確に反映したものであることが確認された。品質保証所見の記録はファイルに保管されている。以下の要約は、最終報告書の記載された品質保証監査に関する記述の検証を提供するものである。

本研究の品質保証作業

品質保証作業	実施日	試験責任者および管理者への結果の報告日
プロトコルレビュー	2007/3/7, 2008/5/30	2007/3/7, 2008/5/30
工程内検査：6 日目の観察	2008/5/8	2008/5/30
生データ監査	2008/5/30	2008/5/30
報告書案レビュー	2008/5/30	2008/5/30

Rhonda S. Krick, 理学士 2008/6/3 品質保証部長

本試験に使用された EPSL の「一般的な」プロトコルは、この日付に品質保証グループにより審査された。

p5

目次

データの非機密性の告知・・・2

優良試験所基準の遵守の告知・・・3

品質保証の告知・・・4

目次・・・5

ラットを用いた急性吸入毒性試験-限界試験・・・6

趣旨	・・・6
摘要	・・・6
資材	・・・7
方法	・・・8
手順	・・・9
試験の実施	・・・11
品質保証	・・・11
プロトコルの改正	・・・11
最終プロトコルからの逸脱	・・・12
最終報告書と継続すべき記録	・・・12
結果	・・・12
結論	・・・12
署名	・・・13
表 1：事前試験の準備と生成システム	・・・14
表 2：事前曝露試験	・・・15
表 3：事前曝露試験の概要	・・・16
表 4：重量測定室の濃度	・・・17
表 5：粒度分布	・・・18
表 6：粒度分布の概要	・・・19
表 7：個々の重量	・・・20
表 8：個々のケージサイドでの観察	・・・21
表 9：個々の剖検の観察	・・・23

## P6

ラットを用いた急性吸入毒性試験-限界試験

プロトコル番号：P330

機関：EPA (FIFRA)

試験番号：24401

スポンサー：EFT HOLDINGS, INC.

1012 Oster Drive, Suite A

Huntsville, AL 35816

被験物質の特定： EasyDECON 200-531X

ロット # T-1003

- 1) 浸透剤
- 2) 強化剤
- 3) ブースター

受領日：2008 年 2 月 25 日

EPSL 参照番号：

- 1) 080225-6D
- 2) 080225-7D
- 3) 080225-8D

試験開始日：2008 年 2 月 26 日

試験日：2008 年 5 月 2 日～16 日

ノート番号： 08-101： p 164-164B, 165-203

## 1. 趣旨

吸入経路による、EasyDECON 200-531X への短期曝露により発生する可能性のある健康被害に関する情報を提供するため。

## 2. 摘要

ラットを用いた急性吸入毒性試験を実施し、EasyDECON 200-531X の一回の吸入（鼻からの曝露）による毒性の可能性を調べた。本試験の条件は、被験物質の単一曝露急性吸入の  $LC_{50}$  は、雄ラット及び雌ラットにおいて 2.09mg/L 以上であった。

所望の生成手順を事前試験中に確立した後、10 匹の健康なラット（男女ともに 5 匹）を試験環境に 4 時間曝露した。被験物質のチャンバー濃度および粒度分布を、曝露期間中に定期的に測定した。

## P7

曝露後 14 日間、ラットの死亡率、総毒性の徴候、行動の変化を少なくとも 1 日 1 回観察した。体重は曝露前に記録し、7 日目と 14 日目（試験終了）に再度記録した。剖検は死亡時にすべてのラットに対して実施した。

すべてのラットは試験環境での曝露を生き延び、2匹のラットは7日目までに体重を減らしたが、すべてのラットは14日間の観察期間を通じて体重が増加した。チャンバーの重力室濃度は2.09 mg/Lであった。アンダーセンカスケードサンプラーで測定した粒度分布の図式解析に基づき、空気動力学的中央粒子径は2.35 μmと推定された。

曝露後、すべてのラットは活動性が低下し、一部のラットは異常な呼吸、脱毛（目や鼻の周り）、または顔面の染みを示した。しかし、すべての雌ラットは7日目までに、雄ラットは12日目までに回復し、残りの14日間の観察期間中は活発かつ健康であった。14日間の観察期間終了時に剖検したところ、重大な異常は認められなかった。

### 3. 資材

#### A. 被験物質

2008年2月25日に EasyDECON 200-531X ロット # T-1003 として、被験物質の3つの成分がスポンサーから受領され、以下の通り識別された。

名前とパーツ番号	EPSL 参照番号
浸透剤 (パーツ 1)	080225-6D
強化剤 (パーツ 2)	080225-7D
ブースター (パーツ 3)	080225-8D

被験物質成分は室温で保存した。塗布の直前に、スポンサーの指示に従い、重量比49%のパーツ1、重量比49%のパーツ2及び重量比2%のパーツ3をEPSLで混合した(修正案#1参照)。調製された試験用混合物は、試験物質とみなされ、混合から8時間以内に使用し、試験物質の合成、作製、または誘導の方法の文書は、Baum's Castorine, P.O. Box 230, 200 Mathew Street, Rome, NY 13442 によって保持される。

被験物質の特性化に関連する以下の情報は、スポンサーから提供されたものである。

組成：アキルジメチルベンジルアンモニウムクロリド - 2%。

過酸化水素 - 3.9%

ジアセチン-2%

その他の成分 - 92.1%

物理的な記述： 透明な液体

pH： 9.8

溶解度：水、メタノール、エタノール、アセトンに溶ける。

P8

安定性：被験物質は試験期間中、安定していることが予想された。調製したサンプルは、混合後 8 時間以内に使用しなければならない。

#### B. ラット

3.B.1 ラットの数： 10 匹

3.B.2 性別： 男性 5 名、女性 5 名。試験に割り当てられた雌は多胎性で妊娠していなかった。

3.B.3 種・系統。ラット。Sprague-Dawley 由来、アルビノ

3.B.4 年齢・体重：若年成人（8～9 週）／オス 234～277g、メス 196～223g（実験開始時）。

3.B.5. 仕入先：2008 年 4 月 22 日に Ace Animals, Inc., Boyertown, PA より受領。

#### 4. 方法：

##### A. 飼育方法

4.A.1 飼育スペース：ラットは、最新の Guide for the latest the Care and Use of Laboratory Animals DHEW (NIH)の推奨サイズに適合した、メッシュ床の吊り下げ式ステンレススチールのケージに一匹ずつ収容した。床材紙はケージの下に敷き、少なくとも週 3 回交換した。

4.A.2 部屋の温度と相対湿度の範囲：20-23°Cと 51-68%。

4.A.3 光周期：12 時間の明暗サイクル

4.A.4 順応期間：10 日間

4.A.5 食品：Purina Rodent Chow # 5012

4.A.6 水：曝露中を除き、水道水は自動給水システムにより随時供給。

4.A.7 汚染物質：食品または水には、本調査の結果を妨げるようなレベルの予想される既知の汚染物質はなかった。食品及び水の分析は定期的実施され、その記録は Eurofins ・ Product Safety Laboratories のファイルに保管されている。

##### B. 識別

4.B.1 ケージ：各ケージは、少なくとも研究番号とラットの識別と性別が記載されたケージカードで識別された。

4.B.2 動物：受領時に各ラットに番号が割り当てられ、この番号が記載されたステンレス製の耳札がラットに取り付けられた。この番号は、試験番号 24401 に割り当てられた連番と合わせて、固有の識別を構成している。

## 5. 手順

### A. 事前試験

実際の吸入試験の開始に先立ち、可能な所望のチャンバー濃度 (2.0 mg/L) と所望の粒子径分布 (空気動学的中央粒子径 1~4  $\mu\text{m}$ ) を達成するための生成手順を確立するために、事前試験が実施された。これらの試験では、前途の目的を達成するために以下の調整を行った。

空気圧：一定

圧縮発電機の風量：一定

圧縮混合気流：一定

全風量：一定

ポンプ設定：変化

ポンプ型式：一定

チューブサイズ：一定

噴霧システム：一定

液体キャップ：一定

エアキャップ：一定

本試験で使用された手順およびエアロゾル化装置は、2.07mg/L の重量濃度および 2.5  $\mu\text{m}$  の空気動学的中央粒子径を提供した事前試験番号 3 の結果に基づく。

### B. 吸入の手順

チャンバー、空気供給、そして粒子径分布、気流、チャンバー濃度の測定に使用した装置は、事前試験で使用したものと同一ものを使用し、以下に説明する。

5.B.1 鼻のみの曝露チャンバー：約 6.7 リットル (ミニ鼻のみの吸入チャンバー、ADG Developments LTD) の内容積を持つ、鼻のみの吸入チャンバーを曝露に使用した。ラットは露光中、O 型リングでチャンバーに密封されるポリカーボネート製のチューブに收容された。ベースユニットは、排出された空気用に 0.5 インチ径のチューブでチャンバーを遮っている。

5.B.2 空気供給：空気圧縮機 (JUN-AIR, モデル # 6-15) を使い、約 23.4 リットル/分 (l.p.m) の除菌空気を噴霧ノズルに供給した。圧縮空気タンク (Airgas) の乾燥した除菌空気を使用して供給する追加の圧縮混合空気 2.3 l.p.m は、チャンバー入口で渦を作成することにより均一に最適な環境になるようにチャンバーに導入された。圧縮空気

流量は、質量流量計（オメガ、モデル# FMA-5613）で測定した。チャンバーの気流は、曝露期間を通してモニターされ、定期的に記録された。総気流は、平均 25.7 l.pm で 25.6 から 26.0 の範囲であった。吸入チャンバーの容積に基づき、研究期間中、この気流は 1 時間あたり約 230 回の換気を提供した。

## P10

5.B.3. 環境条件：曝露時の曝露チューブの温度は 21~22°C、相対湿度は 55~60%であった。曝露時の室温は 21°C、相対湿度は 54~56%であった。曝露チューブ内の測定は、湿度温度計（テイラー社製、モデル# 5502）を用いて行い、室内の状態は温湿度モニター（ディクソン社製、モデル# TH550）を用いて測定した。温度および相対湿度の値は、曝露開始後 1 時間は 15 分毎、それ以降は 30 分毎に記録した。

5.B.4. 環境生成：1/4 インチの JCO 噴霧器（Spraying Systems 社）、FC3 液体キャップ（Robert Miller Associates 社）及び 70SS エアキャップ（Spraying Systems 社）を使用して試験環境を生成した。圧縮空気は 30psi で供給された。被験物質は、蠕動ポンプ（マスターフレックス、モデル# 7520-35）を使用し、サイズ 14 のタイゴンチューブ（マスターフレックス）を通して霧化ノズルに計量した。

5.B.5 チャンバー濃度測定：重量測定サンプルは、ラットの呼吸ゾーンから 6 回の間隔で収集された。サンプルは、真空ポンプ（Reliance Electric、モデル# G557X）に 1/4 タイゴンチューブで取り付けられたフィルターホルダー内の 25mm ガラス繊維フィルター（GF/B Whatman）を使用して収集した。濾紙を回収前と回収後に計量し、回収された質量を測定した。この値は、チャンバー濃度を決定するためにサンプリングした空気の総量で割った。収集は、4L.pm の風量で 3 分間実施した。サンプルの気流は、質量流量計（オメガ、モデル# FMA-5610）を用いて測定した。

5.B.6 粒度分布：試験環境の粒度分布を評価するために、8 段式アンダーセンカスケードインパクトターを使用した。ラットの呼吸ゾーンから 2 回の間隔でサンプルを採取した。濾紙回収は、サンプリングの前後で重量を測定し、各ステージで回収された質量を測定した。空気動力学的中央粒子径および幾何標準偏差は、2 サイクル対数プロビット軸を用いて測定した。

5.B.7 曝露期間：ラットは、試験環境に 4 時間 1 分曝露した。曝露期間は、チャンバーは均衡状態に達することができるように 4 時間を超えて延長された ( $T_{99}$ )。チャンバー環境の 90% 及び 99% 均衡化のための時間は、それぞれ 0.6 及び 1.2 分であった。曝露期間の終了時に生成を終了し、チャンバーを清潔な空気ですらに 15 分間作動させた。曝露期間終了時に、ラットを曝露チューブから取り出した。ケージに戻す前に、余分な被験物質を各ラットの毛皮から除去した。

## C. ラットの選択



曝露の当日およびその前に、ナイーブなラット（以前に試験に使用していない）のグループの健康状態を調べ、体重を測定した。10匹の健康なラット（5匹の雄と5匹の雌）を試験のために選択した。

P11

#### D. 体重

被験物質曝露前（初期）と7日目と14日目（試験終了時）にラットの個体体重を記録した。

#### E. ケージサイドでの観察

すべてのラットについて、曝露期間中の死亡率を観察した。曝露チューブからラットを取り出し、その後少なくとも1日1回、14日間、総毒性の徴候、行動の変化を調べた。観察には、皮膚や被毛、目や粘膜、呼吸器系、循環器系、自律神経系、中枢神経系、体性運動、行動パターンなどの総合的な評価が含まれた。特に、震え、痙攣、唾液分泌、下痢、昏睡などの観察に注意を払った。

#### F. 剖検

すべてのラットを14日目にCO<sub>2</sub>吸入により安楽死させた。全ラットの総剖検を行った。胸腔と腹腔の組織と臓器を検査した。

### 6. 試験の実施

本試験は、Eurofins・Product Safety Laboratories, 2394 US Highway 130, Dayton, New Jersey 08810で実施された。この研究の主担当者は、Jasbir Bawa, B.S.である。この研究は、以下に定義されているGLP（優良試験所基準）規則に準拠して実施された。

- 40 CFR 160: U.S. EPA GLP 基準: 農薬プログラム(FIFRA)

そして、以下の試験ガイドラインに基づいている。

- 米国 EPA 健康影響試験ガイドライン、OPPTS 870.1300 (1998)

### 7. 品質保証

最終報告書は、生データ記録との整合性、プロトコル、Eurofins・Product Safety Laboratoriesの標準作業手順書、及び適切な優良試験所基準に準拠しているかどうかについて監査された。試験中に実施された検査及び監査の日付、及び検査及び監査の結果を試験責任者及び施設管理者に報告した日付は、品質保証書に記載されている。

### 8. プロトコルの改正

1. 試験開始前のスポンサーの指示に従い、塗布用サンプルは Eurofins・Product Safety

Laboratories が調製した。サンプルは、浸透剤（49%）、強化剤（49%）およびブースター（2%）の混合物であった。この混合物は、調製から 8 時間以内に塗布することとした。

## P12

2. ジョージ・E・ムーアが 2008 年 5 月 30 日から 2008 年 6 月 22 日まで不在（休暇）のため、本試験の試験責任者はジェニファー・デュランドが代わりに務めることになった。この変更は、本報告書を適切な時に完成させるために必要とされたものである。

### 9. 最終プロトコルからの逸脱

なし。

### 10. 最終報告書と継続すべき記録

署名入りの最終報告書の原本は、スポンサーに送付される。署名された本報告書のコピーは、プロトコル及び Eurofins・Product Safety Laboratories で作成されたすべての生データとともに、Eurofins・Product Safety Laboratories のアーカイブに保管される。EPSL はこれらの記録を少なくとも 5 年間維持する。この期間が経過した後は、スポンサーは、記録の所有権を取得する機会が与えられる、または EPSL による継続的な保存を要求することができる。

### 11. 結果

すべての事前曝露試験の詳細は、表 1 から表 3 に記載されている。曝露試験情報の要約を表 4~6 に示す。個々の体重、ケージサイドおよび剖検での観察結果を表 7~9 に示す。

すべてのラットは試験環境での曝露を生き延び、2 匹のラットは 7 日目までに体重を減らしたが、すべてのラットは 14 日間の観察期間を通じて体重が増加した。アンデルセンカスケードインパクトで測定した粒度分布のグラフィック分析に基づき、空気動力学的中央粒子径は  $2.35\ \mu\text{m}$  であると推定された。

曝露後、すべてのラットは活動性が低下し、一部のラットは呼吸異常、目や鼻の周りの脱毛、顔面の染みを示した。しかし、すべての雌ラット 8 日目までに、雄ラットは 12 日目までに回復し、残りの 14 日間の観察期間中は活発かつ健康であった。14 日間の観察期間終了時に剖検したところ、動物に重大な異常は認められなかった。

### 12. 結論

本試験の条件では、EasyDECON 200-531X の単一曝露急性吸入の LC<sub>50</sub> は、雄ラット及び雌ラットにおいて 2.09mg/L 以上であった。

P13

署名

EasyDECON 200-531X

本報告書に記載の方法、結果およびデータは、研究中に使用された手順および収集されたデータを忠実に反映していることを、下記に署名した者が宣言する。

ジェニファー・デュランド、理学士

試験責任者

P14

表 1：事前試験の準備と生成システム

1. ポンプモデル：蠕動ポンプ（マスターフレックス、モデル # 7520-35）
2. ポンプのチューブ：サイズ 14 のタイゴンチューブ（マスターフレックス）
3. 空気供給：空気圧縮機（JUN-AIR モデル、# 6-15）  
圧縮空気（Airgas）
4. 噴霧：1/4 インチの JCO 噴霧器（Spraying Systems 社）
5. 液体キャップ：FC3 (Robert Miller Associates)
6. 空気キャップ：70 SS (Spraying System, Co.)
7. チャンバー：6.7 リットル（ミニ鼻のみの吸入チャンバー、ADG Developments LTD）
8. 混合気流測定：質量流量計（オメガ、モデル # FMA-5613）

P15

表 2：事前曝露試験

トライアル No.	圧縮空気圧 (psi)	圧縮発電機の空気 (Lpm)	圧縮混合気流 (Lpm)	総空気量 (Lpm)	ポンプ設定	チャンバー濃度 (mg/L)	サンプリングされた粒子径
1	30	23.5	2.3	25.8	4.0	0.57	なし
2	30	23.4	2.3	25.7	10.0	2.72	なし
3	30	23.4	2.3	25.7	8.0	2.07	あり

P16

表 3：事前曝露試験の概要

トライアル No.	チャンバー濃度 (mg/L)	空気動力的中央粒子径 ( $\mu\text{m}$ ) <sup>2</sup>
3	2.07	2.5

P17

表 4：重量測定室の濃度

サンプル No.	サンプル時間 (時間)	集積された質量 (mg)	サンプリングされた風量 (Lpm)	集積の時間 (分)	チャンバー濃度 (mg/L)
1	0.5	24.6	4.	3	2.05
2	1	27.6	4.	3	2.30
3	2	24.7	4.	3	2.06
4	2.5	26.0	4.	3	2.17
5	3.5	23.0	4.	3	1.92
6	3.75	24.6	4.	3	2.05
平均 ± 標準偏差					2.09 ± 0.13

P18

表 5：粒度分布

ステージ	有効切断径 ( $\mu\text{m}$ )	全粒子の捕捉率 (重量別)	累積 (%) <sup>1</sup>
サンプル 1			
0	9.0	4.5	95.5
1	5.8	7.3	88.1
2	4.7	5.9	82.2
3	3.3	15.0	67.2
4	2.1	16.7	50.6
5	1.1	35.9	14.7
6	0.7	10.7	4.0
7	0.4	3.1	0.8
F	0	0.8	0.0
サンプル 2			
0	9.0	2.9	97.1

1	5.8	7.6	89.5
2	4.7	6.3	83.2
3	3.3	14.9	68.3
4	2.1	17.3	51.0
5	1.1	34.8	16.2
6	0.7	11.5	4.7
7	0.4	3.7	1.0
F	0	1.0	0,0

P19

表 6：粒度分布の概要

サンプル No.	サンプル時間 (時間)	集積の時間 (分)	空気動力的中 央粒子径 ( $\mu\text{m}$ ) <sup>2</sup>	幾何標準偏差
1	1.5	2	2.4	2.11
2	3	2	2.3	2.07

P20

表 7：個々の重量

ラット No.	性別	体重 (g)		
		最初	7 日目	14 日目
3301	M	277	291	361
3302	M	268	285	354
3303	M	263	236	305
3304	M	234	249	297
3305	M	258	267	330
3306	F	209	208	245
3307	F	196	213	241
3308	F	196	200	228
3309	F	200	201	215
3310	F	223	234	258

P21

表 8：個々のケージサイドでの観察

所見      発生日

活動低下 CR<sup>1</sup>-6

活発かつ健康 7-14

活動低下 CR-6

乾性ラ音 3-4

活発かつ健康 7-14

活動低下 CR-9

呼吸不整 3-10

乾性ラ音 3-11

顔面の染み 3-6, 8-10

活発かつ健康 12-14

活動低下 CR-6

乾性ラ音 3-5

顔面の染み 8-11

活発かつ健康 7, 12-14

活動低下 CR-6

呼吸不整 3-6

湿性ラ音 3-10

顔面の染み 3-6, 8-11

脱毛症（目と鼻の周り） 9-14

活発かつ健康 12-14

P22

表 8：個々のケージサイドでの観察（続き）

所見      発生日

活動低下 CR<sup>1</sup>-6

呼吸不整、湿性ラ音、顔面の染み 3-5

活発かつ健康 7-14

活動低下 CR-5

湿性ラ音 3-5

活発かつ健康 6-14

活動低下 CR-5

湿性ラ音 3-4

呼吸不整、顔面の染み 3-5

活発かつ健康 6-14

活動低下 CR-5

顔面の染み 3-5

活発かつ健康 6-14

活動低下 CR-5

顔面の染み 3-5

呼吸不整、湿性ラ音 3-6

活発かつ健康 7-14

## P23

表 9：個々の解剖の観察

<u>ラット No.</u>	<u>組織</u>	<u>所見</u>
<u>雄</u>		
3301-3305	全組織および臓器	全体的な異常を示さず
<u>雌</u>		
3306-3310	全組織および臓器	全体的な異常を示さず