

木酢液のラットにおける急性経口毒性試験
報告書

目 次

	頁
1 クヌギを原料とする木酢液のラットにおける急性経口毒性試験	1
報告書 (表紙)	
陳述書	2
試験施設、毒性試験指針 (ガイドライン) の適用、記録等の保管、.	3
試験従事者	
目次	4
1. 要約	6
2. 試験目的	7
3. 被験物質	7
4. 試験方法	7
5. 試験成績	11
6. 考察および結論	12
7. 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑い	13
のある事態および試験計画書に従わなかつたこと	
TABLES	14
APPENDICES	18
2 スギを原料とする木酢液のラットにおける急性経口毒性試験	24
報告書 (表紙)	
陳述書	25
試験施設、毒性試験指針 (ガイドライン) の適用、記録等の保管、.	26
試験従事者	
目次	27
1. 要約	29
2. 試験目的	30
3. 被験物質	30
4. 試験方法	30
5. 試験成績	34
6. 考察および結論	35
7. 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑い	36
のある事態および試験計画書に従わなかつたこと	
TABLES	37
APPENDICES	41

平成 15 年度農林水産省補助事業 環境負荷低減農業技術確立実証事業

クヌギを原料とする木酢液のラットにおける急性経口毒性試験

(試験番号 IET 03-0086)

最終報告書

平成 16 年 3 月 31 日

茨城県水海道市内守谷町 4321
財団法人 残留農薬研究所

陳述書

試験名称：クヌギを原料とする木酢液のラットにおける急性経口毒性試験

当該試験は、急性毒性試験の実施能力に関して次に示す試験の適正実施に係る基準（GLP）に適合することが確認された試験施設において実施された。

農林水産省、農薬の毒性に関する試験の適正実施に係る基準，11 農産第 6283 号，
1999 年

本報告書の試験方法には当該試験で使用した方法・手順が忠実に記述され、試験成績には当該試験の実施過程において得られた生データが正確に反映されている。

試験施設

名称： 財団法人 残留農薬研究所
所在地： 茨城県水海道市内守谷町 4321 (〒303-0043)
運営管理者： 理事長 岩本 毅

毒性試験指針（ガイドライン）の適用

農林水産省，農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針
(12 農産第 8147 号 2-1-1, 2000 年)

記録等の保管

当該試験中に作出されたすべての生データ，試験計画書，被験物質のサンプル，最終報告書および記録は，財団法人残留農薬研究所の資料保管施設で保管する。

試験従事者

試験責任者 小坂忠司

試験担当者

投与液調製，投与，臨床症状観察，剖検および動物飼育管理：

石嶺さやか 田島由香里 藤江秀彰 首藤康文 松本力 林宏一 林豊

目次

	頁
表紙	1
陳述書	2
試験施設	3
毒性試験指針（ガイドライン）の適用	3
試験期間	3
記録等の保管	3
試験従事者	3
目次	4
1. 要約	6
2. 試験目的	7
3. 被験物質	7
4. 試験方法	7
4.1. 供試動物	7
4.2. 動物飼育管理	8
4.3. 投与方法	9
4.4. 投与用量および使用動物数	9
4.5. 投与液調製	9
4.6. 観察および検査項目	9
4.7. 試験結果の評価	10
5. 試験成績	11
5.1. 死亡率	11
5.2. 臨床症状	11
5.3. 体重変化	11
5.4. 剖検所見	11
6. 考察および結論	12
7. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および 試験計画書に従わなかったこと	13

目次 (続き)

頁

TABLES

1. Mortality - Female rats	14
2. Clinical observation - Incidence of signs in female rats	15
3. Body weight - Individual values in female rats	16
4. Necropsy - Incidence of macroscopic lesions in female rats	17

APPENDICES

1. Flow chart of acute toxic class method with a starting dose of 2000 mg/kg body weight	18
2. Mortality - Identification of scheduled or unscheduled death in female rats ..	19
3. Clinical observation - Individual data in female rats	20
4. Necropsy - Individual macroscopic lesions in female rats	21
5. Environmental control - Temperature in the animal room	22
6. Environmental control - Humidity in the animal room	23

1. 要約

クヌギを原料とする木酢液を Wistar Hannover 系 SPF ラット (BrlHan: WIST@Jcl GALAS) の雌に1回経口投与し、その急性経口毒性を毒性等級法により検索した。投与1回目、2回目とも3匹ずつ計6匹の動物に、2000 mg/kgの用量を投与した。投与容量は10 mL/kg、希釈媒体には注射用水を用いた。

死亡：投与 1回目 (2000 mg/kg, ステップ1), 2回目 (2000 mg/kg, ステップ2) とともに、死亡は認められなかった。

臨床症状：投与1回目、2回目ともに臨床症状は認められなかった。

体重：体重は、投与後7日および14日ともに、全ての動物で投与前の値と比べて増加していた。

剖検所見： 観察期間終了時 (投与後14日) に行った剖検では、投与1回目および2回目ともに、異常は観察されなかった。

以上の結果から、本被験物質の Wistar Hannover 系雌ラットにおける急性経口毒性は、毒性等級法に従って GHS カテゴリー 5 に分類され、LD50値は2000 mg/kg以上であると判定された。

2. 試験目的

当該試験はクヌギを原料とする木酢液のラットにおける急性経口毒性を検索するために実施した。

3. 被験物質

名称： クヌギを原料とする木酢液
 供給元： 林野庁
 ロット番号： W15020
 採取日： 2002年12月1日
 性状： 液体
 安定性： 不明であるが、室温で数年安定と考えられている。
 保存条件： 冷暗所
 参照用標本： 先に実施した「クヌギを原料とする木酢液の細菌を用いた復帰突然変異試験（IET03-0088）」にて被験物質の参照用標本として約 1mL を採取し、財団法人残留農薬研究所資料保管施設に保管した。

4. 試験方法

当該試験は、毒性等級法により実施した。

4.1. 供試動物

4.1.1. 供試動物および選定理由

日本クレア株式会社富士生育場（静岡県）により生産されたWistar Hannover系SPFラット（BrlHan:WIST@Jcl GALAS）の雌を用いた。ラットは急性経口毒性試験に汎用されている動物種であり、かつ毒性試験指針に推奨されていることによりこれを選定した。

4.1.2. 入荷時週齢、体重範囲および入荷数

	性	週齢	体重範囲 ^{a)}	入荷数	入荷日
1回目	雌	8	140 - 170 g	5	2003年11月18日
2回目	雌	8	140 - 170 g	5	2003年11月25日

a) 生産者からの出荷時の体重範囲；試験計画書に定めた範囲内（140-170g）であった。

4.1.3. 馴化期間

8週齢にて購入後、動物を試験環境に7日間馴化した。その間毎日動物を観察し、異常がないことを確認して試験に供した。

4.1.4. 投与時週齢

1回目, 2回目とも9週齢で供試した。

4.2. 動物飼育管理

4.2.1 試験環境

室温 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 湿度 $50 \pm 20\%$, 換気回数10回以上/時間 (オールフレッシュエア一方式), 照明時間12時間/日 (午前7時点灯, 午後7時消灯) に制御された動物飼育室 (動物室116) 内で飼育を行った。動物は, ステンレス鋼製可動ラックに収納したステンレス鋼製金網ケージ (310 W×440 D×230 H mm) に収容した。1ケージに収容する動物数は馴化期間中は5匹, 投与後は3匹とした。各ケージには試験番号, 被験物質名, 試験の種類, 性別, 用量群, 動物番号および個体識別を明記したラベルを貼付した。試験期間中の動物室の温度および湿度をAppendices 5および6に示す。この期間中, 温度については試験成績に影響を及ぼすと思われる異常値は認められなかった。一方, 湿度について2003年12月2日に飼育室の洗浄後に設定範囲を上回った。しかし, この異常の継続時間は1.8時間という短時間であり, 逸脱の程度も小さく, その後の動物の状態にも異常は見られなかった。このことから, 試験成績に影響を与えるものではなかったと判断した。

飼料には保証飼料MF固型 (Lot No. 030801; オリエンタル酵母工業株式会社, 東京都) を, 飲料水には急速濾過・活性炭吸着装置と次亜塩素酸ナトリウムにより浄化・殺菌した井戸水をプラスチック製給水ビンを用い, それぞれ自由に摂取させた。飼料および飲料水中の汚染物質の分析結果を確認したところ, いずれも残留農業研究所が定めた許容基準値の範囲内であった。

4.2.2. 動物の個体識別および選別

ケージ内における動物の個体識別は, 馴化期間中は塩基性フクシン飽和70%エタノール溶液を用いて下記のごとく被毛の一部を染色することで行った。

No. 1 頭部 (ア) No. 2 背部 (セ) No. 3 臀部 (シ)

No. 4 頭・背部 (アセ) No. 5 無染色 (シロ)

被験物質投与後はピクリン酸飽和70%エタノール溶液を用いて下記のごとく被毛を染色することで行った。

No. 1 頭部 (ア) No. 2 背部 (セ) No. 3 無染色 (シロ)

投与に使用する動物は, 投与当日にコンピューターで作成した乱数表を用いて決定し, 各個体の体重が平均値の $\pm 20\%$ を超えないことを確認して投与に用いた。投与時の体重範囲は140 g~153 gであり, 平均値は146 gであった。余剰動物は試験より除外した。

4.3. 投与方法

動物を投与前日の夕方より投与約3時間後まで絶食させた。投与液をスターラーで攪拌して均質な状態に保ち、注射筒内に吸い上げ胃ゾンデを用いて1回経口投与した。

4.4. 投与用量および使用動物数

木酢液の急性経口毒性の情報 (LD50 : 5 g/kg以上) ならびに毒性試験指針により、開始用量として2000 mg/kgを選択して試験を実施した。投与用量、使用動物数および動物番号を以下に示す。

投与回	投与用量 (mg/kg)	使用動物数 (動物番号)
		雌
1回目	2000	3 (101 - 103)
2回目	2000	3 (104 - 106)

4.5. 投与液調製

被験物質を下記の所定量秤り取り、注射用水 (大塚製薬株式会社, 東京都) で10 mLに希釈定容して投与液を調製した。投与容量は10 mL/kgとした。

	投与群 (mg/kg 群)	被験物質溶解量 (mg)	被験物質濃度 (mg/mL)
1回目	2000	2000	200.0
2回目	2000	2000	200.0

投与液の調製時に化学反応の徴候のないことおよび均一性、溶解性を目視により確認した。また、投与終了時の残余液について、調製直後と比べて変化していないことを確認してから廃棄した。

4.6. 観察および検査項目

4.6.1 死亡および臨床症状の観察

投与当日は投与30分および4時間後に、翌日から観察期間終了時までには少なくとも1日1回、死亡の有無および動物の外貌、外皮、姿勢、行動、呼吸、意識、神経症徴候、体温、排泄等の臨床症状について詳細に観察した。観察期間は投与後14日間とした。

4.6.2. 体重測定

体重は、被験物質投与直前、投与後7日、14日に個体別に測定した。

4.6.3. 剖検

観察期間終了時（投与後14日）に動物をエーテル麻酔により安楽死させ、解剖して肉眼的異常の有無を検索した。

4.7. 試験結果の評価

毒性等級法のフローチャート（Appendix 1）に従ってGHS（Globally Harmonised System）カテゴリーおよびLD50値の範囲を決定した。

5. 試験成績

5.1. 死亡率 (Table 1, Appendix 2)

投与1回目 (2000 mg/kg, ステップ1) , 2回目 (2000 mg/kg, ステップ2) ともに死亡は認められなかった。

死亡率は, 1回目 0/3, 2回目 0/3であった。

5.2. 臨床症状 (Table 2, Appendix 3)

投与1回目, 2回目ともに, 臨床症状は認められなかった。

5.3. 体重変化 (Table 3)

体重は, 投与後7および14日において, 投与前の値と比べて全動物において増加していた。

5.4. 剖検所見 (Table 4, Appendix 4)

観察期間終了時 (投与後14日) に行った剖検では, 異常は認められなかった。

6. 考察および結論

投与1回目 (2000 mg/kg, ステップ1) で, 死亡例は認められなかった。そのため, 毒性等級法のフローチャート (Appendix 1) に従って, 投与2回目 (2000 mg/kg, ステップ2) を実施したところ, 死亡例は認められなかった。投与1回目および2回目の死亡率を毒性等級法のGHSカテゴリーに照らしあわせ, LD50値を判定した。その結果, GHSカテゴリー5 (2000 mg/kg以上) に分類された。

投与後14日間の観察期間を通して, 臨床症状は認められなかった。

体重は, 投与後7日および14日ともに順調に増加し, 一般状態の良好な推移を反映していた。

観察期間終了時に行った剖検においても, 異常は認められなかった。

以上の結果から, 本被験物質のWistar Hannover系雌ラットにおける急性経口毒性は, 毒性等級法に従ってGHSカテゴリー5に分類され, LD50値は2000 mg/kg以上であると判定された。

7. 予見することが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および試験計画書に従わなかつたこと

試験期間を通じて、予見する事が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はなかつた。試験計画書に従わなかつたことは以下の通りである。

4.2.1 試験環境

動物室の湿度の設定値からの逸脱

本文中 (p.8) に記載したとおり、この逸脱は試験結果に影響を与えない。

Table 1 Mortality - Female rats

Dose (mg/kg)	Step	Time after administration										Final mortality
		0.5	4 hrs	1	2	3	4	5	6	7	8-14 days	
2000	1st	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 / 3 ^a
2000	2nd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 / 3

^a: Cumulative number of animals found dead during the observation period per number of animals treated.

Table 2 Clinical observation - Incidence of signs in female rats

Clinical sign	Dose (mg/kg)	2000		2000	
	Step	1st		2nd	
	Fate	fd	tk	fd	tk
	No. of animals examined	-	3	-	3
No abnormalities detected		-	3	-	3

Fate: fd, found dead; tk, terminal kill.

Table 3 Body weight - Individual values in female rats

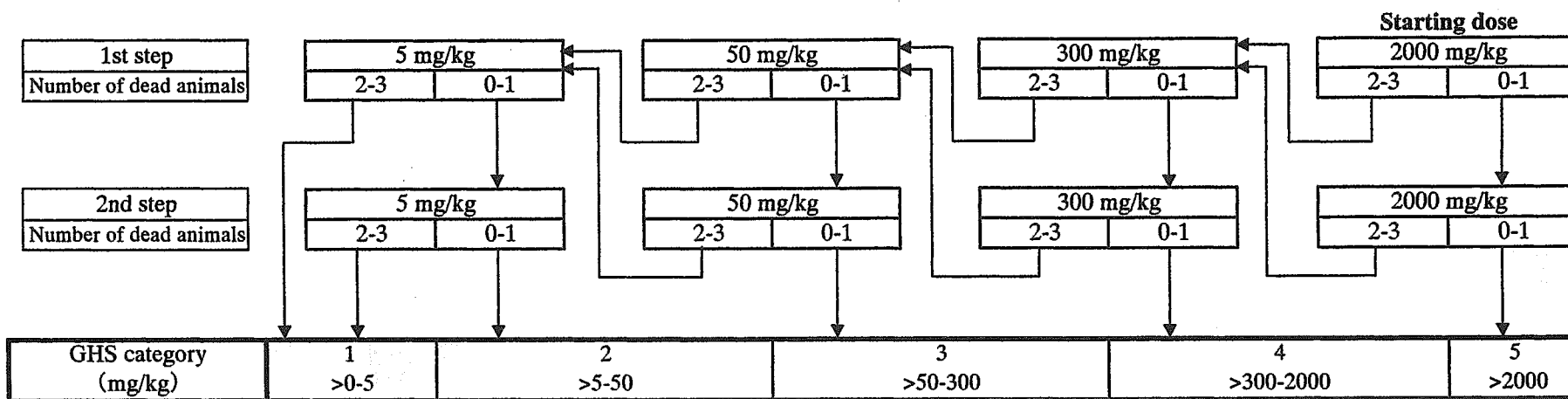
Dose (mg/kg)	Step	Animal number	Before administration	Days after administration	
				7	14
2000	1st	101	140	174	189
		102	142	173	186
		103	153	184	194
2000	2nd	104	147	180	189
		105	151	181	197
		106	143	164	181

Table 4 Necropsy - Incidence of macroscopic lesions in female rats

Site and lesion	Dose (mg/kg)		2000		2000	
	Step		1st		2nd	
	Fate		fd	tk	fd	tk
	No. of animals examined		-	3	-	3
No abnormalities detected		-	3	-	3	

Fate: fd, found dead; tk, terminal kill.

Appendix 1 Flow chart of acute toxic class method with a starting dose of 2000 mg/kg body weight



Appendix 2 Mortality - Identification of scheduled or unscheduled death in female rats

Dose (mg/kg)	Step	Time after administration										
		0.5	4 hrs	1	2	3	4	5	6	7	8-13	14 days
2000	1st											(101) (102)
												(103)
2000	2nd											(104) (105)
												(106)

(n): Scheduled death.

Appendix 3 Clinical observation - Individual data in female rats

Dose (mg/kg)	Step	Animal number	Fate	Time of death	Clinical signs
2000	1st	101	tk	14d	No abnormalities detected
		102	tk	14d	No abnormalities detected
		103	tk	14d	No abnormalities detected
2000	2nd	104	tk	14d	No abnormalities detected
		105	tk	14d	No abnormalities detected
		106	tk	14d	No abnormalities detected

Fate: tk, terminal kill.
Time: d, days.

Appendix 4 Necropsy - Individual macroscopic lesions in female rats

Dose (mg/kg)	Step	Animal number	Fate	Time of death	Macroscopic lesions
2000	1st	101	tk	14d	No abnormalities detected
		102	tk	14d	No abnormalities detected
		103	tk	14d	No abnormalities detected
2000	2nd	104	tk	14d	No abnormalities detected
		105	tk	14d	No abnormalities detected
		106	tk	14d	No abnormalities detected

Fate: tk, terminal kill.

Time: d, days.

Appendix 5

Environmental control - Temperature in the animal room
(Animal Room 116)

(°C)

Day	Month	November	December
Year	2003	2003	
1	-	-	21.5 ~ 22.1
2	-	-	21.8 ~ 22.0
3	-	-	21.9 ~ 22.0
4	-	-	21.8 ~ 22.0
5	-	-	21.9 ~ 22.0
6	-	-	21.9 ~ 21.9
7	-	-	21.6 ~ 22.0
8	-	-	21.8 ~ 22.0
9	-	-	21.8 ~ 22.0
10	-	-	21.8 ~ 22.2
11	-	-	21.8 ~ 21.9
12	-	-	21.8 ~ 22.0
13	-	-	21.8 ~ 22.0
14	-	-	21.8 ~ 22.2
15	-	-	21.8 ~ 22.2
16	-	-	21.8 ~ 22.0
17	-	-	-
18	21.8 ~ 22.0	-	-
19	21.8 ~ 22.0	-	-
20	21.8 ~ 22.0	-	-
21	21.9 ~ 22.0	-	-
22	21.9 ~ 22.2	-	-
23	21.9 ~ 22.1	-	-
24	21.8 ~ 22.0	-	-
25	21.8 ~ 21.9	-	-
26	21.8 ~ 22.0	-	-
27	21.8 ~ 22.0	-	-
28	21.8 ~ 22.0	-	-
29	21.9 ~ 22.0	-	-
30	21.8 ~ 22.0	-	-
31	-	-	-

-: Data not shown because of the absence of animals in the room.

Appendix 6 Environmental control - Humidity in the animal room
(Animal Room 116)

		(%)	
Month	November	December	
Day	Year	2003	2003
1		-	47.8 ~ 59.1
2		-	52.8 ~ 71.3 ^a
3		-	51.7 ~ 55.1
4		-	52.2 ~ 55.9
5		-	52.7 ~ 58.3
6		-	55.3 ~ 59.4
7		-	53.1 ~ 60.8
8		-	53.0 ~ 61.1
9		-	53.0 ~ 64.5
10		-	52.6 ~ 61.5
11		-	50.8 ~ 57.6
12		-	55.4 ~ 60.2
13		-	54.7 ~ 64.8
14		-	53.5 ~ 61.4
15		-	52.9 ~ 62.7
16		-	53.2 ~ 64.4
17		-	-
18		50.1 ~ 54.2	-
19		50.3 ~ 52.5	-
20		49.8 ~ 51.6	-
21		47.6 ~ 54.0	-
22		47.2 ~ 58.7	-
23		49.5 ~ 54.9	-
24		49.9 ~ 53.5	-
25		49.4 ~ 56.1	-
26		49.0 ~ 55.2	-
27		53.0 ~ 56.4	-
28		53.3 ~ 59.8	-
29		53.2 ~ 57.1	-
30		48.2 ~ 58.2	-
31		-	-

-: Data not shown because of the absence of animals in the room.

a: A temporal rise following cleaning of the animal room (≤ 1.8 h).

平成 15 年度 農林水産省補助事業 環境負荷低減農業技術確立実証事業

スギを原料とする木酢液のラットにおける急性経口毒性試験

(試験番号 IET 03-0087)

最終報告書

平成 16 年 3 月 31 日

茨城県水海道市内守谷町 4321
財団法人 残留農薬研究所

陳述書

試験名称：スギを原料とする木酢液のラットにおける急性経口毒性試験

当該試験は、急性毒性試験の実施能力に関して次に示す試験の適正実施に係る基準（GLP）に適合することが確認された試験施設において実施された。

農林水産省、農薬の毒性に関する試験の適正実施に係る基準，11 農産第 6283 号，
1999 年

本報告書の試験方法には当該試験で使用した方法・手順が忠実に記述され、試験成績には当該試験の実施過程において得られた生データが正確に反映されている。

試験施設

名 称 財団法人 残留農薬研究所
所在地 茨城県水海道市内守谷町 4321 (〒303-0043)
運営管理者 理事長 岩本 毅

毒性試験指針 (ガイドライン) の適用

農林水産省, 農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針
(12 農産第 8147 号 2-1-1, 2000 年)

記録等の保管

試験実施中に作出されたすべての生データ, 試験計画書, 被験物質のサンプル, 最終報告書および記録は, 財団法人残留農薬研究所の資料保管施設で保管する。

試験従事者

試験責任者 小坂忠司

試験担当者

投与液調製, 投与, 臨床症状観察, 剖検および動物飼育管理

石嶺さやか 田島由香里 藤江秀彰 首藤康文 松本力 林宏一 林豊

目次

	頁
表紙	1
陳述書	2
試験施設	3
毒性試験指針（ガイドライン）の適用	3
試験期間	3
記録等の保管	3
試験従事者	3
目次	4
1. 要約	6
2. 試験目的	7
3. 被験物質	7
4. 試験方法	7
4.1. 供試動物	7
4.2. 動物飼育管理	8
4.3. 投与方法	9
4.4. 投与用量および使用動物数	9
4.5. 投与液調製	9
4.6. 観察および検査項目	9
4.7. 試験結果の評価	10
5. 試験成績	11
5.1. 死亡率	11
5.2. 臨床症状	11
5.3. 体重変化	11
5.4. 剖検所見	11
6. 考察および結論	12
7. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および 試験計画書に従わなかったこと	13

目次 (続き)

頁

TABLES

1. Mortality - Female rats	14
2. Clinical observation - Incidence of signs in female rats	15
3. Body weight - Individual values in female rats	16
4. Necropsy - Incidence of macroscopic lesions in female rats	17

APPENDICES

1. Flow chart of acute toxic class method with a starting dose of 2000 mg/kg body weight	18
2. Mortality - Identification of scheduled or unscheduled death in female rats ..	19
3. Clinical observation - Individual data in female rats	20
4. Necropsy - Individual macroscopic lesions in female rats	21
5. Environmental control - Temperature in the animal room	22
6. Environmental control - Humidity in the animal room	23

1. 要約

スギを原料とする木酢液をWistar Hannover系SPFラット (BrlHan:WIST@Jcl GALAS) の雌に1回経口投与し、その急性経口毒性を毒性等級法により検索した。投与1回目、2回目とも3匹ずつ計6匹の動物に、2000 mg/kgの用量を投与した。投与容量は10 mL/kg、希釈媒体には注射用水を用いた。

死亡：投与 1回目 (2000 mg/kg, ステップ1) , 2回目 (2000 mg/kg, ステップ2) とともに、死亡は認められなかった。

臨床症状：投与1回目、2回目ともに臨床症状は認められなかった。

体重：体重は、投与後7日および14日ともに、全ての動物で投与前の値と比べて増加していた。

剖検所見： 観察期間終了時 (投与後14日) に行った剖検では、投与1回目および2回目ともに、異常は観察されなかった。

以上の結果から、本被験物質のWistar Hannover系雌ラットにおける急性経口毒性は、毒性等級法に従ってGHSカテゴリー5に分類され; LD50値は2000 mg/kg以上であると判定された。

2. 試験目的

当該試験はスギを原料とする木酢液のラットにおける急性経口毒性を検索するために実施した。

3. 被験物質

名称： スギを原料とする木酢液
 供給元： 林野庁
 ロット番号： W15080
 採取日： 2003年6月6日
 性状： 液体
 安定性： 不明であるが、室温で数年安定と考えられている。
 保存条件： 冷暗所
 参照用標本： 先に実施した「スギを原料とする木酢液の細菌を用いた復帰突然変異試験（IET03-0089）」にて被験物質の参照用標本として約 1mL を採取し、財団法人残留農薬研究所資料保管施設に保管した。

4. 試験方法

当該試験は、毒性等級法により実施した。

4.1. 供試動物

4.1.1. 供試動物および選定理由

日本クレア株式会社富士生育場（静岡県）により生産されたWistar Hannover系SPFラット（BrlHan:WIST@Jcl GALAS）の雌を用いた。ラットは急性経口毒性試験に汎用されている動物種であり、かつ毒性試験指針に推奨されていることによりこれを選定した。

4.1.2. 入荷時週齢、体重範囲および入荷数

	性	週齢	体重範囲 ^{a)}	入荷数	入荷日
1回目	雌	8	140 - 170 g	6	2003年11月18日
2回目	雌	8	140 - 170 g	6	2003年11月25日

a) 生産者からの出荷時の体重範囲；試験計画書に定めた範囲内（140-170g）であった。

4.1.3. 馴化期間

8週齢にて購入後、動物を試験環境に7日間馴化した。その間毎日動物を観察し、異常がないことを確認して試験に供した。

4.1.4. 投与時週齢

1回目、2回目とも9週齢で供試した。

4.2. 動物飼育管理

4.2.1 試験環境

室温 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、換気回数10回以上/時間（オールフレッシュエア一方式）、照明時間12時間/日（午前7時点灯、午後7時消灯）に制御された動物飼育室（動物室116）内で飼育を行った。動物は、ステンレス鋼製可動ラックに収納したステンレス鋼製金網ケージ（310 W×440 D×230 H mm）に收容した。1ケージに收容する動物数は馴化期間中は5匹、投与後は3匹とした。各ケージには試験番号、被験物質名、試験の種類、性別、用量群、動物番号および個体識別を明記したラベルを貼付した。試験期間中の動物室の温度および湿度をAppendices 5および6に示す。この期間中、温度については試験成績に影響を及ぼすと思われる異常値は認められなかった。一方、湿度について2003年12月2日に飼育室の洗浄後に設定範囲を上回った。しかし、この異常の継続時間は1.8時間という短時間であり、逸脱の程度も小さく、その後の動物の状態にも異常は見られなかった。このことから、試験成績に影響を与えるものではなかったと判断した。

飼料には保証飼料MF固型（Lot No. 030801；オリエンタル酵母工業株式会社，東京都）を、飲料水には急速濾過・活性炭吸着装置と次亜塩素酸ナトリウムにより浄化・殺菌した井戸水をプラスチック製給水ビンを用い、それぞれ自由に摂取させた。飼料および飲料水中の汚染物質の分析結果を確認したところ、いずれも残留農薬研究所が定めた許容基準値の範囲内であった。

4.2.2. 動物の個体識別および選別

ケージ内における動物の個体識別は、馴化期間中は塩基性フクシン飽和70%エタノール溶液を用いて下記のごとく被毛の一部を染色することで行った。

No. 1 頭部 (ア) No. 2 背部 (セ) No. 3 臀部 (シ)
No. 4 頭・背部 (アセ) No. 5 無染色 (シロ)

被験物質投与後はピクリン酸飽和70%エタノール溶液を用いて下記のごとく被毛を染色することで行った。

No. 1 頭部 (ア) No. 2 背部 (セ) No. 3 無染色 (シロ)

投与に使用する動物は、投与当日にコンピューターで作成した乱数表を用いて決定し、各個体の体重が平均値の $\pm 20\%$ を超えないことを確認して投与に用いた。投与時の体重範囲は145 g～155 gであり、平均値は151 gであった。余剰動物は試験より除外した。

4.3. 投与方法

動物を投与前日の夕方より投与約3時間後まで絶食させた。投与液をスターラーで攪拌して均質な状態に保ち、注射筒内に吸い上げ胃ゾンデを用いて1回経口投与した。

4.4. 投与用量および使用動物数

木酢液の急性経口毒性の情報 (LD50: 5 g/kg以上) ならびに毒性試験指針により、開始用量として2000 mg/kgを選択して試験を実施した。投与用量、使用動物数および動物番号を以下に示す。

投与回	投与用量 (mg/kg)	使用動物数 (動物番号)
		雌
1回目	2000	3 (111 - 113)
2回目	2000	3 (114 - 116)

4.5. 投与液調製

被験物質を下記の所定量秤り取り、注射用水 (大塚製薬株式会社, 東京都) で10 mLに希釈定容して投与液を調製した。投与容量は10 mL/kgとした。

	投与群 (mg/kg 群)	被験物質溶解量 (mg)	被験物質濃度 (mg/mL)
1回目	2000	2000	200.0
2回目	2000	2000	200.0

投与液の調製時に化学反応の徴候のないことおよび均一性、溶解性を目視により確認した。また、投与終了時の残余液について、調製直後と比べて変化していないことを確認してから廃棄した。

4.6. 観察および検査項目

4.6.1 死亡および臨床症状の観察

投与当日は投与30分および4時間後に、翌日から観察期間終了時までには少なくとも1日1回、死亡の有無および動物の外貌、外皮、姿勢、行動、呼吸、意識、神経症徴候、体温、排泄等の臨床症状について詳細に観察した。観察期間は投与後14日間とした。

4.6.2. 体重測定

体重は、被験物質投与直前、投与後7日、14日に個体別に測定した。

4.6.3. 剖検

観察期間終了時（投与後14日）に動物をエーテル麻酔により安楽死させ、解剖して肉眼的異常の有無を検索した。

4.7. 試験結果の評価

毒性等級法のフローチャート（Appendix 1）に従ってGHS（Globally Harmonised System）カテゴリーおよびLD50値の範囲を決定した。

5. 試験成績

5.1. 死亡率 (Table 1, Appendix 2)

投与1回目 (2000 mg/kg, ステップ1) , 2回目 (2000 mg/kg, ステップ2) ともに死亡は認められなかった。

死亡率は, 1回目 0/3, 2回目 0/3であった。

5.2. 臨床症状 (Table 2, Appendix 3)

投与1回目, 2回目ともに, 臨床症状は認められなかった。

5.3. 体重変化 (Table 3)

体重は, 投与後7および14日において, 投与前の値と比べて全動物において増加していた。

5.4. 剖検所見 (Table 4, Appendix 4)

観察期間終了時 (投与後14日) に行った剖検では, 異常は認められなかった。

6. 考察および結論

投与1回目（2000 mg/kg, ステップ1）で、死亡例は認められなかった。そのため、毒性等級法のフローチャート（Appendix 1）に従って、投与2回目（2000 mg/kg, ステップ2）を実施したところ、死亡例は認められなかった。投与1回目および2回目の死亡率を毒性等級法のGHSカテゴリーに照らしあわせ、LD50値を判定した。その結果、GHSカテゴリー5（2000 mg/kg以上）に分類された。

投与後14日間の観察期間を通して、臨床症状は認められなかった。

体重は、投与後7日および14日ともに順調に増加し、一般状態の良好な推移を反映していた。

観察期間終了時に行った剖検においても、異常は認められなかった。

以上の結果から、本被験物質のWistar Hannover系雌ラットにおける急性経口毒性は、毒性等級法に従ってGHSカテゴリー5に分類され、LD50値は2000 mg/kg以上であると判定された。

7. 予見することが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および試験計画書に従わなかつたこと

試験期間を通じて、予見する事が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はなかつた。試験計画書に従わなかつたことは以下の通りである。

4.2.1 試験環境

動物室の湿度の設定値からの逸脱

本文中 (p.8) に記載したとおり、この逸脱は試験結果に影響を与えない。

Table 1 Mortality - Female rats

Dose (mg/kg)	Step	Time after administration										Final mortality	
		0.5	4 hrs	1	2	3	4	5	6	7	8-14 days		
2000	1st	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 / 3 ^a
2000	2nd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 / 3

^a: Cumulative number of animals found dead during the observation period per number of animals treated.

Table 2 Clinical observation - Incidence of signs in female rats

Clinical sign	Dose (mg/kg)	2000		2000	
	Step	1st		2nd	
	Fate	fd	tk	fd	tk
	No. of animals examined	-	3	-	3
No abnormalities detected		-	3	-	3

Fate: fd, found dead; tk, terminal kill.

Table 3 Body weight - Individual values in female rats

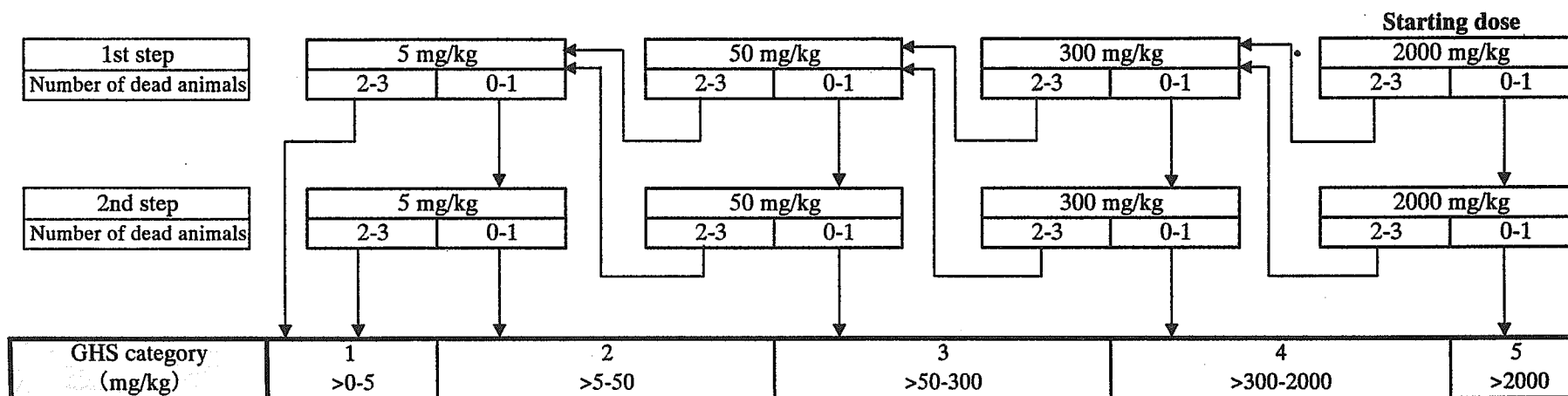
Dose (mg/kg)	Step	Animal number	Before administration	Days after administration	
				7	14
2000	1st	111	145	183	193
		112	154	189	199
		113	151	180	185
2000	2nd	114	148	181	192
		115	154	185	188
		116	155	189	201

Table 4 Necropsy - Incidence of macroscopic lesions in female rats

Site and lesion	Dose (mg/kg)		2000		
	Step		2nd		
	Fate	1st	fd	tk	
	No. of animals examined	-	3	-	3
No abnormalities detected		-	3	-	3

Fate: fd, found dead; tk, terminal kill.

Appendix 1 Flow chart of acute toxic class method with a starting dose of 2000 mg/kg body weight



Appendix 2 Mortality - Identification of scheduled or unscheduled death in female rats

Dose (mg/kg)	Step	Time after administration											
		0.5	4 hrs	1	2	3	4	5	6	7	8-13	14 days	
2000	1st											(111)	(112)
													(113)
2000	2nd											(114)	(115)
													(116)

(n): Scheduled death.

Appendix 3 Clinical observation - Individual data in female rats

Dose (mg/kg)	Step	Animal number	Fate	Time of death	Clinical signs
2000	1st	111	tk	14d	No abnormalities detected
		112	tk	14d	No abnormalities detected
		113	tk	14d	No abnormalities detected
2000	2nd	114	tk	14d	No abnormalities detected
		115	tk	14d	No abnormalities detected
		116	tk	14d	No abnormalities detected

Fate: tk, terminal kill.

Time: d, days.

Appendix 4 Necropsy - Individual macroscopic lesions in female rats

Dose (mg/kg)	Step	Animal number	Fate	Time of death	Macroscopic lesions
2000	1st	111	tk	14d	No abnormalities detected
		112	tk	14d	No abnormalities detected
		113	tk	14d	No abnormalities detected
2000	2nd	114	tk	14d	No abnormalities detected
		115	tk	14d	No abnormalities detected
		116	tk	14d	No abnormalities detected

Fate: tk, terminal kill.

Time: d, days.

Appendix 5

Environmental control - Temperature in the animal room
(Animal Room 116)

(°C)

Day	Month Year	November 2003	December 2003
1		-	21.5 ~ 22.1
2		-	21.8 ~ 22.0
3		-	21.9 ~ 22.0
4		-	21.8 ~ 22.0
5		-	21.9 ~ 22.0
6		-	21.9 ~ 21.9
7		-	21.6 ~ 22.0
8		-	21.8 ~ 22.0
9		-	21.8 ~ 22.0
10		-	21.8 ~ 22.2
11		-	21.8 ~ 21.9
12		-	21.8 ~ 22.0
13		-	21.8 ~ 22.0
14		-	21.8 ~ 22.2
15		-	21.8 ~ 22.2
16		-	21.8 ~ 22.0
17		-	-
18		21.8 ~ 22.0	-
19		21.8 ~ 22.0	-
20		21.8 ~ 22.0	-
21		21.9 ~ 22.0	-
22		21.9 ~ 22.2	-
23		21.9 ~ 22.1	-
24		21.8 ~ 22.0	-
25		21.8 ~ 21.9	-
26		21.8 ~ 22.0	-
27		21.8 ~ 22.0	-
28		21.8 ~ 22.0	-
29		21.9 ~ 22.0	-
30		21.8 ~ 22.0	-
31		-	-

-: Data not shown because of the absence of animals in the room.

Appendix 6 Environmental control - Humidity in the animal room
(Animal Room 116)

		(%)	
Month	November	December	
Day	Year	2003	2003
1		-	47.8 ~ 59.1
2		-	52.8 ~ 71.3 ^a
3		-	51.7 ~ 55.1
4		-	52.2 ~ 55.9
5		-	52.7 ~ 58.3
6		-	55.3 ~ 59.4
7		-	53.1 ~ 60.8
8		-	53.0 ~ 61.1
9		-	53.0 ~ 64.5
10		-	52.6 ~ 61.5
11		-	50.8 ~ 57.6
12		-	55.4 ~ 60.2
13		-	54.7 ~ 64.8
14		-	53.5 ~ 61.4
15		-	52.9 ~ 62.7
16		-	53.2 ~ 64.4
17		-	-
18		50.1 ~ 54.2	-
19		50.3 ~ 52.5	-
20		49.8 ~ 51.6	-
21		47.6 ~ 54.0	-
22		47.2 ~ 58.7	-
23		49.5 ~ 54.9	-
24		49.9 ~ 53.5	-
25		49.4 ~ 56.1	-
26		49.0 ~ 55.2	-
27		53.0 ~ 56.4	-
28		53.3 ~ 59.8	-
29		53.2 ~ 57.1	-
30		48.2 ~ 58.2	-
31		-	-

-: Data not shown because of the absence of animals in the room.

a: A temporal rise following cleaning of the animal room (≤ 1.8 h).