

木酢液のラットにおける90日間反復経口毒性試験  
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90日間反復経口投与	1
毒性試験 報告書 (表紙)	
陳述書	2
試験施設、毒性試験の適正実施に関する基準 (G L P) および	3
毒性試験指針、試験期間、記録および標本の保管	
試験従事者	4
目次	5
1. 要約	9
2. 試験目的	10
3. 被験物質	10
4. 試験方法	10
5. 試験結果	22
6. 考察および結論	25
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	26
のある事態および試験計画書に従わなかつたこと	
8. 参考文献	26
【注：参考文献より後に示されている図表等の添付は省略している】	
2 スギを原料とする木酢液のラットにおける90日間反復経口投与	27
毒性試験 報告書 (表紙)	
陳述書	28
試験施設、毒性試験の適正実施に関する基準 (G L P) および	29
毒性試験指針、試験期間、記録および標本の保管	
試験従事者	30
目次	31
1. 要約	35
2. 試験目的	36
3. 被験物質	36
4. 試験方法	36
5. 試験結果	48
6. 考察および結論	51
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	53
のある事態および試験計画書に従わなかつたこと	
8. 参考文献	53
【注：参考文献より後に示されている図表等の添付は省略している】	

平成16年度 農林水産省 農薬的資材リスク情報収集委託事業  
(農薬的資材安全性検討試験)  
クヌギを原料とする木酢液のラットにおける 90 日間反復経口投与毒性試験

(試験番号 IET 04-0058)

最終報告書

2005 年 3 月 18 日

茨城県水海道市内守谷町4321  
財団法人 残留農業研究所

この写しは原本と相違ないことを証明します。

財団法人 残留農業研究所

試験責任者： 小坂 忠司 - 1 -

日付： 2005 年 3 月 18 日

## 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 90 日間反復経口投与毒性試験

当該試験は次に示す試験の適正実施に関する基準（GLP）で定められたGLP精神を尊重して実施された。

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。

試験責任者

財団法人 残留農薬研究所

毒性第部免疫・急性毒性研究室長

小坂 忠司



2005年3月18日

## 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

## 毒性試験の適正実施に関する基準（GLP）および毒性試験指針

GLP： 農林水産省，農薬の毒性に関する試験の適正に係る基準（11農産第6283号，1999年）で定められたGLP精神を尊重して実施する。

毒性試験指針： 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2-1-9，2000年）

## 試験期間

試験開始日：		2004年 8月 24日
動物入荷日：	雄	2004年 9月 3日
	雌	2004年 9月 10日
被験物質投与開始日：	雄	2004年 9月 14日
	雌	2004年 9月 21日
被験物質投与終了日：	雄	2004年 12月 15日
	雌	2004年 12月 21日
最終剖検日：	雄	2004年 12月 16日
	雌	2004年 12月 22日
試験終了(最終報告書作成)日：		2004年 3月 18日

## 記録および標本の保管

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，標本，最終報告書および記録は，当該試験が準拠するGLPの規定に従い，財団法人残留農薬研究所の資料保管施設で保管する。

ただし，変質しやすい標本等について，それによる試験成績の再評価が妥当性を失うとの理由からGLPの定める期間より前に処分する場合には，その理由を付し，文書で記録する。

試験従事者 試験責任者	小坂忠司		
試験担当者 (*は試験分担責任者) 動物飼育管理, 臨床症状観察:	川勝尚夫*	林 宏一	福山朋季
	田島由香里	松本 力	藤江秀彰
	林 豊	上田英夫	
投与液の調製:	上田英夫	林 宏一	福山朋季
	田島由香里		
被験物質の投与	林 宏一	上田英夫	藤江秀彰
	首藤康文	松本 力	林 豊
	福山朋季	田島由香里	
眼科学的検査:	川勝尚夫*	石塚勝美	平山浩司
	田島由香里	林 宏一	
尿検査:	川勝尚夫*	石塚勝美	飯田 勉
	平山浩司	林 宏一	田島由香里
機能検査:	首藤康文*	松本 力	林 豊
	藤江秀彰		
臓器重量測定:	川勝尚夫*	田島由香里	林 宏一
	福山朋季	上田英夫	藤江秀彰
	松本 力	林 豊	首藤康文
臨床検査:	小嶋五百合*	佐々木淳矢	木村豊恵
剖検:	中島信明*	榎本秋子	桑原真紀
	竹内幸子	高橋尚史	
病理組織標本作製:	千葉裕子*	富山千津子	
病理組織学的検査:	桑原真紀*		

## 目次

	頁
表紙 .....	1
陳述書 .....	2
試験施設 .....	3
毒性試験の適正実施に関する（GLP）および毒性試験指針 .....	3
試験期間 .....	3
記録および標本の保管 .....	3
試験従事者 .....	4
目次 .....	5
1. 要約 .....	9
2. 試験目的 .....	10
3. 被験物質 .....	10
4. 試験方法 .....	10
4.1. 試験動物 .....	10
4.2. 動物飼育管理 .....	11
4.3. 被験物質の投与方法および投与期間 .....	13
4.4. 試験群の設定および使用動物数 .....	13
4.5. 被験物質投与液の調製 .....	14
4.6. 観察および検査項目 .....	14
4.7. 有意差検定 .....	21
5. 試験結果 .....	22
5.1. 死亡率 .....	22
5.2. 一般状態の観察 .....	22
5.3. 詳細な状態の観察 .....	22
5.4. 機能検査 .....	22
5.5. 体重 .....	22
5.6. 摂餌量 .....	22
5.7. 食餌効率 .....	22
5.8. 眼科学的検査 .....	22
5.9. 尿検査 .....	23
5.10. 血液学的検査 .....	23
5.11. 血液生化学的検査 .....	23
5.12. 臓器重量 .....	24
5.13. 剖検 .....	24

## 目次 (続き)

	頁
5.14. 病理組織学的検査 .....	24
6. 考察および結論 .....	25
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 事象および試験計画書に従わなかったこと .....	26
8. 参考文献 .....	26

## FIGURES

1. Body weight change in male rats .....	27
2. Body weight change in female rats .....	28

## TABLES

1. Mortality – Cumulative death rates in male rats .....	29
2. Mortality – Cumulative death rates in female rats .....	30
3. General clinical observation – Incidence of signs in male rats .....	31
4. General clinical observation – Incidence of signs in female rats .....	32
Key to Tables 5 and 6	
Standard key to detailed clinical observation .....	33
5 (1-32). Detailed clinical observation – Summary data in male rats .....	35
6 (1-32). Detailed clinical observation – Summary data in female rats .....	67
Key to Tables 7 and 8	
Standard key to functional observation data .....	99
7 (1-3). Functional observation – Summary data in male rats .....	100
8 (1-3). Functional observation – Summary data in female rats .....	103
9. Body weight – Group mean values in male rats .....	106
10. Body weight – Group mean values in female rats .....	107
11. Food consumption – Group mean values in male rats .....	108
12. Food consumption – Group mean values in female rats .....	109
13. Food efficiency – Group mean values in male rats .....	110
14. Food efficiency – Group mean values in female rats .....	111
15. Ophthalmology – Incidence of findings in male rats .....	112
16. Ophthalmology – Incidence of findings in female rats .....	113
Key to Tables 17 and 18 Standard key to urinalysis data .....	114
17 (1-2). Urinalysis – Summary data in male rats .....	115
18 (1-2). Urinalysis – Summary data in female rats .....	117



## 目次 (続き)

TABLES (continued)	頁
Key to Tables 19 and 20	
Standard key to hematology data .....	119
19 (1-3). Hematology – Group mean values in male rats .....	120
20 (1-3). Hematology – Group mean values in female rats .....	123
Key to Tables 21 and 22	
Standard key to blood biochemistry data .....	126
21 (1-2). Blood biochemistry – Group mean values in male rats .....	127
22 (1-2). Blood biochemistry – Group mean values in female rats .....	129
23. Necropsy – Incidence of macroscopic lesions in male rats .....	131
24. Necropsy – Incidence of macroscopic lesions in female rats .....	132
25 (1-2). Organ weight – Group mean values in male rats .....	133
26 (1-2). Organ weight – Group mean values in female rats .....	135
27 (1-2). Histopathology – Incidence of microscopic lesions in male rats .....	137
28 (1-2). Histopathology – Incidence of microscopic lesions in female rats .....	139
APPENDICES	
1. Mortality – Identification of scheduled or unscheduled deaths in male rats .....	141
2. Mortality – Identification of scheduled or unscheduled deaths in female rats .....	142
3 (1-4). General clinical observation – Individual data in male rats .....	143
4 (1-4). General clinical observation – Individual data in female rats .....	147
Key to 5 and 6	
Standard key to detailed clinical observation .....	151
5 (1-40). Detailed clinical observation – Individual data in male rats .....	153
6 (1-40). Detailed clinical observation – Individual data in female rats .....	193
Key to Appendices 7 and 8	
Standard key to functional observation data .....	233
7 (1-6). Functional observation – Individual data in male rats .....	234
8 (1-6). Functional observation – Individual data in female rats .....	240
9 (1-2). Body weight – Individual values in male rats .....	246
10 (1-2). Body weight – Individual values in female rats .....	248
11 (1-2). Food consumption – Individual values in male rats .....	250
12 (1-2). Food consumption – Individual values in female rats .....	252

## 目次 (続き)

	頁
APPENDICES (continued)	
13 (1-2). Ophthalmology – Individual findings in male rats .....	254
14 (1-2). Ophthalmology – Individual findings in female rats .....	256
Key to Appendices 15 and 16	
Standard key to individual urinalysis data .....	258
15 (1-2). Urinalysis – Individual data in male rats .....	259
16 (1-2). Urinalysis – Individual data in female rats .....	261
Key to Appendices 17 and 18	
Standard key to hematology data .....	263
17 (1-6). Hematology – Individual values in male rats .....	264
18 (1-6). Hematology – Individual values in female rats .....	270
Key to Appendices 19 and 20	
Standard key to blood biochemistry data .....	276
19 (1-4). Blood biochemistry – Individual values in male rats .....	277
20 (1-4). Blood biochemistry – Individual values in female rats .....	281
21 (1-4). Organ weight – Individual values in male rats .....	285
22 (1-4). Organ weight – Individual values in female rats .....	289
Key to Appendices 23 and 24	
Standard key to pathology data .....	293
23 (1-12). Pathology – Individual data in male rats .....	294
24 (1-12). Pathology – Individual data in female rats .....	306
25. Environmental control – Temperature in the animal room .....	318
26. Environmental control – Humidity in the animal room .....	319
27. Analysis of nutrients in basal diet .....	320
28. Acceptable limits of diet contaminants .....	321
29 (1-3). Chemical analysis – Contaminants in basal diet .....	322
30. Acceptable limits of water contaminants .....	325
31 (1-4). Chemical analysis – Contaminants in drinking water .....	326

## 1. 要約

クヌギを原料とする木酢液のラットにおける90日間反復経口投与の毒性変化を検索し、無毒性量 (NOAEL) を求めた。各用量群雌雄 10 匹ずつの Wistar Hannover 系 SPF ラット (BrlHan:WIST@Jcl[GALAS]) を用いて、本被験物質を 0, 100, 300 および 1000 mg/kg/日 の用量で 90 日間 (13 週間) にわたって毎日連続強制経口投与した。試験期間中、全ての動物について死亡の有無を確認し、一般状態の観察、摂餌量の測定および体重測定を実施した。投与 11 週時に機能検査を、投与 13 週時に眼科学的検査および尿検査を実施し、13 週投与終了後に血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量測定、剖検および病理組織学的検査を行った。

以下に、試験結果を要約する。

### 1000 mg/kg 用量群：

詳細な状態の観察では、雄動物に投与期間中の一時期に偶発的な排尿頻度の増加が観察された。この他、雌雄とも一般状態の観察、機能検査、体重、摂餌量、食餌効率、眼科学的検査、尿検査、血液学的検査および血液生化学的検査成績に被験物質投与の影響は認められなかった。各臓器の臓器重量、剖検所見および病理組織学所見においても、被験物質投与に関連付けられる変化は観察されなかった。

### 300 mg/kg 以下の用量群：

統計学的に有意な変化は散見されたものの、被験物質投与に関連付けられる明らかな変化はいずれの項目にも観察されなかった。

当該試験実施条件下でのクヌギを原料とする木酢液の Wistar Hannover 系 SPF ラット (BrlHan:WIST@Jcl[GALAS]) における無毒性量 (NOAEL) は雌雄とも 1000 mg/kg/日 と結論した。

## 2. 試験目的

クヌギを原料とする木酢液をラットに 90 日間 (13 週間) にわたり反復経口投与してその亜急性毒性を検索し、無毒性量 (NOAEL) を求めた。

## 3. 被験物質

名称：クヌギを原料とする木酢液  
 供給元：農林水産省林野庁林政部経営課特用林産対策室  
 ロット番号：W15021  
 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：冷蔵暗所 (設定値 4℃, 許容範囲 1~10℃の被験物質保管庫)  
 参照用標本：受領した被験物質より参照用サンプルとして約 5 g 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

### 4.1. 試験動物

#### 4.1.1. 試験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) で生産された Wistar Hannover 系 SPF ラット (BrIHan:WIST@Jcl[GALAS]) の雌雄動物を用いた。ラットは反復経口投与毒性試験に通常用いられている動物種である。

#### 4.1.2. 入荷時の動物の週齢, 数および体重範囲

雌雄ともに 5 週齢で雄 47 匹を 2004 年 9 月 3 日に、雌 49 匹を 2004 年 9 月 10 日に入荷した。出荷時の体重範囲は、雄は 110~130 g, 雌は 90~110 g であった。これは、試験計画書に記載された許容範囲 (雄は 100~140 g, 雌は 80~120 g) 内であり、問題はなかった。

#### 4.1.3. 検疫および馴化

入荷後、雌雄とも 11 日間試験環境に検疫・馴化させた。この期間中毎日ケージサイドから全動物の一般状態を観察した。また、入荷日および群分け直前に腫瘤の触診を含む一般状態の観察を行った。さらに、全動物について詳細な状態の観察を検疫・馴化 6 日目に、眼科学的検査を検疫・馴化 7 日目に実施した。これらの一般状態の観察、詳細な状態の観察および眼科学的検査の結果、眼の異常が認められた雄 2 匹を供試動物より排除した。

#### 4.1.4. 投与開始時の動物の週齢

雌雄ともに6週齢で被験物質の投与を開始した(雄は2004年9月14日,雌は2004年9月21日)。投与開始時の体重は,雄は174~196g,雌は128~149gであった。

### 4.2. 動物飼育管理

#### 4.2.1. 飼育方法

##### 4.2.1.1. 飼育環境

温度  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , 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ー方式), 照明時間 12 時間/日(午前 7 時点灯, 午後 7 時消灯)に設定された動物飼育室(動物室 116)で動物を飼育した。試験期間中の動物飼育室の温度および湿度を付表 25 および 26 に示す。試験期間中, 動物飼育室の温度には設定値からの逸脱は認められなかった。一方, 湿度については, 動物飼育室の洗浄時にもなう逸脱が 1 回(2004 年 9 月 21 日), そして空調機保守点検時の一時停止による逸脱が 1 回(2004 年 11 月 6 日)認められた。これらの逸脱は 3% 以内の極わずかな, そして 10 分間以内の短時間のものであり, その後の動物の状態にも異常は見られなかったことから, 試験成績に影響を与えるものではなかったと判断した。

##### 4.2.1.2. ラックおよび飼育ケージ

ステンレス鋼製可動ラックにステンレス鋼製金網ケージ(310 W × 440 D × 230 H mm)を装着し, 群分け前は雌雄別に原則として各ケージに 6 匹ずつ収容した。試験期間中(群分け後)はステンレス鋼製プレートを装着することによりステンレス鋼製金網ケージを分割し, 動物を左右に個体別に収容した。各ラックには被験物質名, 試験番号, 試験の種類および性別を, また, 群分け後の各ケージには被験物質名, 試験番号, 試験の種類, 動物種, 用量群, 性別, 個体識別および動物番号を記した標識を付けて識別した。

ラックおよびケージは群分け時に 1 回, その後は 4 週間に 1 回の頻度で洗浄・滅菌したものと交換した。各動物に対する照明, 騒音など環境条件を均等にするために, 交換時にケージのローテーションを行なった。ローテーションでは, 用量群ごとに配置位置を移動させた。対照群は高用量群の位置に, 高用量群, 中間用量群および低用量群はそれぞれ中間用量群, 低用量群および対照群の位置に移動した。また, 各群内のケージ配置はラックの最上段のケージを最下段に, 他の段は下段より順次上段に移動させる方法で実施した。

##### 4.2.1.3. 動物の群分け

試験には検疫・馴化を終えた健康な動物を用いた。投与開始日(雄は 2004 年 9 月 14 日, 雌は 2004 年 9 月 21 日)にこれらすべての動物の体重を測定し, 極端に重い個体あるいは軽い個体を除外した。残りの動物を, 雌雄別々に, 体重値に基づいた層別無作為抽出法で各用量群に雌雄 10 匹ずつ配分した。この時, 各群間の体重に統計学的有意差のみられないこと, また, 雌雄各々について, 各個体の体重が平均体重の 80~120%の範囲内に

あることを確認した。群分け後、試験に用いなかった動物（群分けから除外した動物を含め、雄 7 匹、雌 9 匹）は当該動物室から排除した。

#### 4.2.1.4. 動物の個体識別

群分け前の個体識別は体部の被毛を塩基性フクシン飽和 70%エタノール溶液で染色することで行った。動物のケージ内番号と染色部位の関係を以下に示す。

- |                      |                      |
|----------------------|----------------------|
| No. 1, 頭部 (ア);       | No. 2, 背部 (セ);       |
| No. 3, 臀部 (シ);       | No. 4, 頭部および背部 (アセ); |
| No. 5, 背部および臀部 (セシ); | No. 6, 無染色 (ム)       |

群分け後の個体識別は耳鑑札法で行った。また、一般状態の観察および投与時の個体確認を容易にするために、雌雄の各用量群の動物番号の小さい順に 10 匹ずつ用量群ごとの個体識別を行った。各用量群での個体識別はピクリン酸飽和 70%エタノール溶液にて以下のように頭部、背部および臀部の被毛の一部を染色した。

- |                            |                           |
|----------------------------|---------------------------|
| No. 1, 頭部 (ア);             | No. 2, 背部 (セ);            |
| No. 3, 臀部 (シ);             | No. 4, 頭部および背部 (アセ);      |
| No. 5, 背部および臀部 (セシ);       | No. 6, 頭部, 背部および臀部 (アセシ); |
| No. 7, 頭部から背部 (ア-セ);       | No. 8, 背部から臀部 (セ-シ);      |
| No. 9, 頭部から背部から臀部 (ア-セ-シ); | No. 10, 無染色 (ム)           |

#### 4.2.2. 飼料

保証飼料MF粉末 (オリエンタル酵母工業株式会社, 東京都) をステンレス鋼製粉末給餌器に入れて動物に自由に摂取させた。給餌器は週に 1 回交換した。

試験に用いた全ロットの飼料について、オリエンタル酵母工業株式会社は使用ロット (Lot No. 040705, 041005, 041102) について以下の栄養素の分析を実施した。これらの栄養素の分析結果を付表 27 に示す。

水分, 粗蛋白, 粗脂肪, 粗灰分, 粗繊維, 可溶性無窒素物

本飼料中の以下の汚染物質については、飼料各ロットの発送前に財団法人日本食品分析センター (東京都) がロットごとに混入濃度を分析した。当研究所が設定したこれらの汚染物質の許容基準を付表 28 に示す。使用ロット (Lot No. 040705, 041005, 041102) の分析値を付表 29 に示す。飼料は各汚染物質の含有量が許容基準内にあることを確認したうえで発送された。

水銀, カドミウム, 鉛, ヒ素, セレン,  $\gamma$ -BHC, DDT (含類縁物質), アルドリン, デイルドリン, エンドリン, ヘプタクロール, マラチオン, パラチオン, アフラトキシン

(B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>), ポリ塩化ビフェニール, エストラジオール, ジメチルニトロソアミン, ジエチルニトロソアミン

#### 4.2.3. 飲料水

急速濾過・活性炭吸着装置を通した後、次亜塩素酸ナトリウムおよび紫外線によって殺菌した井戸水を、プラスチック製給水びんに入れて動物に自由に摂取させた。毎年6月と12月(2004年6月28日, 12月6日)に採取した試料を用いて、飲料水中の以下のAの項目を財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センター(東京都)が、Bの項目を財団法人残留農薬研究所化学部が分析した。当研究所が設定したこれらの汚染物質の許容基準を付表30に、実際の分析値を付表31に示す。分析の結果、いずれの汚染物質も許容基準内であり、問題はなかった。

A: ヒ素, 鉛, 総水銀, カドミウム, セレン, ポリ塩化ビフェニール, N-ニトロソ化合物, 総トリハロメタン  
 B: シマジン, チウラム, チオベンカルブ, 1,3-ジクロロプロペン

#### 4.3. 被験物質の投与方法および投与期間

被験物質の投与方法は強制経口投与とし、週7日間で13週間(90日間以上)にわたって反復経口投与した。経口による暴露はヒトで予想される本被験物質の主たる暴露経路に一致する。また、強制経口投与法は反復経口投与毒性試験で通常用いられている方法である。

被験物質の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、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与は午前11時から午後4時までの一定時間に実施した。投与容量は、体重1kg当り4mLとした。

#### 4.4. 試験群の設定および使用動物数

当該試験に先立って14日間反復経口投与毒性試験(IET 04-0057)を実施した。同試験ではクヌギを原料とする木酢液を0, 100, 300および1000mg/kg/日の用量で強制経口投与にて雄各4匹から成る各試験群のWistar Hannover系SPFラット(BrlHan:WIST@Jcl[GALAS])に反復経口投与した。その結果、100, 300および1000mg/kgの各投与群において、一般状態、体重、摂餌量、臓器重量等の検査成績に対照群と比べ有意な差は認められなかった。そこで、農林水産省の毒性試験指針に記載されている最大投与量の1000mg/kgを最高用量として、公比3にて300および100mg/kgの用量を設定した。

以下に当該試験の用量群ならびに使用動物数および動物番号(耳標識番号)を示す。

用量群 (mg/kg/日)	使用動物数 (動物番号)	
	雄	雌
0	10 (201~210)	10 (241~250)
100	10 (211~220)	10 (251~260)
300	10 (221~230)	10 (261~270)
1000	10 (231~240)	10 (271~280)

#### 4.5. 被験物質投与液の調製

各用量 (0, 100, 300, 1000 mg/kg) の被験物質投与液を週に 2 回 (月曜日と金曜日), 1 回の調製あたり 120 mL ずつ調製した。なお, 動物の体重増加による投与用量増加のため, 2004 年 11 月 15 日以降は 1 回の調製あたり 160 mL ずつ調製した。用量群ごとに必要量の被験物質を秤量した後, 注射用水 (大塚製薬株式会社, 東京都) にて希釈・定容し, スターラーで攪拌した。各用量の投与液は 1 日分 (当初 30 mL で, 2004 年 11 月 15 日以降は 40 mL) ずつ小分けし, 投与日まで冷蔵庫 (設定値 5℃, 許容範囲 1~10℃ の冷蔵庫) にて保管した。投与当日, 投与の約 30 分前に室温にもどし, 投与に用いた。また, 対照群では注射用水を用いた。

#### 4.6. 観察および検査項目

##### 4.6.1. 死亡率

全動物について, 投与期間中少なくとも 1 日 2 回, 瀕死状態ないし死亡の有無をケージサイドから観察した。

各用量群の死亡率は, 死亡・切迫殺動物数を分子, 使用動物数を分母とする分数表示により, 投与週毎の累積死亡率として雌雄別に表した。

##### 4.6.2. 一般状態の観察

一般状態の観察は, 少なくとも 1 日 1 回被験物質投与前に実施した。また, 触診を含む観察を少なくとも毎週 1 回実施した。一般状態の観察によって何らかの異常が認められた場合は, その発見日, 状態, 強度および持続期間を記録した。

##### 4.6.3. 詳細な状態の観察

全動物について, 詳細な状態の観察を投与開始前 1 回と投与期間中毎週 1 回, 午前のほぼ一定時刻 (被験物質投与前) に実施した。詳細な状態の観察時には以下の項目について発現の有無あるいは程度を観察し, 採点 (スコアリング) した。

ケージ内: 興奮, 鎮静, 異常姿勢 (腹臥, 横臥など), 異常行動 (後ずさり, 常同行動, 自傷行動など)



ハンドリング： 取り扱い難さ，筋緊張の変化（亢進，低下），振戦，眼瞼閉鎖，瞳孔径の変化（散瞳，縮瞳），流涎，流涙，分泌物（鼻孔，耳孔，膻などからの分泌物），眼球突出，体温の変化（上昇，下降），呼吸異常音，被毛の変化（外陰部湿潤），皮膚および可視粘膜の変化（充血）

オープンフィールド： 跳躍，旋回，痙攣，歩様異常（運動協調性を含む，よろめき歩行，ひきずり歩行，後肢麻痺など），自発運動（亢進，低下），身づくろい動作（頻度），立ち上がり姿勢（頻度），呼吸（促迫，緩徐），発声，立毛，排尿（回数），排便（個数），異常姿勢（腹臥，横臥など），異常行動（後ずさり，常同行動，自傷行動など）

#### 4.6.4. 機能検査

全動物について，投与 11 週時に以下の項目の機能検査を実施した。

自発運動量，握力（前肢，後肢），感覚運動反応（位置視覚，接近反応，聴覚反応，触覚反応，痛覚反応，空中立ち直り反射）

自発運動量は，遠赤外線方式の検出器（SUPER MEX®）を装着した運動量測定装置（室町機械株式会社，東京都）を用いて連続 1 時間，10 分ごとに測定した。握力はラット握力測定器 CPU gauge Model-9505（アイコーエンジニアリング株式会社，愛知県）を用いて測定した。感覚運動反応の各項目は以下の方法で行い，正常あるいは通常範囲を“0”に設定した尺度基準を用いて採点（スコアリング）した。

位置視覚：動物の尾部を持ち垂直にぶら下げた状態で，平面に近づけて行った際の前肢を伸ばすタイミングを判定

接近反応：動物の正面に検査棒をゆっくりと近づけた際の反応を判定

聴覚反応：動物の背後で突然クリッカーを鳴らした際の反応を判定

触覚反応：動物の背部をピンセットで軽く触れた際の反応を判定

痛覚反応：動物の尾部をピンセットで挟んだ際の反応を判定

空中立ち直り反射：動物を仰向けに持ち上げて約 20 cm の高さから落下させた際の着地の姿勢を判定

各検査は，群間に偏りが出ないように各用量群から動物番号の若い順に 1 匹ずつ選択し，この操作を繰り返して実施した。機能検査は午前 9 時から午後 3 時の間に実施した。

機能検査は以下の日程で実施した。

	雄	雌
投与 11 週時	2004 年 11 月 24～25 日	2004 年 12 月 1～2 日

#### 4.6.5. 体重

全動物について投与開始日(0 週, 第一回目の投与日), およびその後毎週 1 回体重を測定した。投与期間中の体重測定は各投与週の最終日に行なった。各用量群の群平均体重を測定週ごとに雌雄別に算出した。また, 全動物について殺処分前に最終体重を測定し, 臓器重量測定時の比体重値の算出に用いた(4.6.12. 臓器重量参照)た。

#### 4.6.6. 摂餌量

全生存動物について, 投与期間中毎週 1 回連続 7 日分(最終週のみ 4 日分)の摂餌量を測定した。各測定値を測定期間中の延べ日数で除し, 1 日 1 匹あたりの摂餌量(個体別平均摂餌量)を算出した。これらの個体別摂餌量から各用量群における群平均摂餌量(g/rat/day)を測定週毎に雌雄別に算出した。さらに, これら週毎の群平均摂餌量を加重平均し, 全投与期間を通じた総平均摂餌量を雌雄別に求めた。

#### 4.6.7. 食餌効率

全用量群について, 投与開始後毎週, 群平均体重増加量をそれぞれの群平均摂餌量で除して群平均食餌効率(%で表示)を雌雄別に算出した。さらに, これらの群平均食餌効率を平均し, 全投与期間を通じた総平均食餌効率を雌雄別に求めた。

#### 4.6.8. 眼科学的検査

馴化期間中に雌雄の全馴化動物および投与 13 週時には対照群と 1000 mg/kg 用量群の全生存動物について, ハロゲン検眼鏡(株式会社ナイツ, 東京都)による観察を含む眼科学的検査を行なった。眼科学的検査では以下の部位を観察した。

眼球, 眼瞼, 結膜, 角膜, 前眼房, 瞳孔, 虹彩, 水晶体/硝子体, 眼底

投与 13 週時の検査において 1000 mg/kg 用量群の動物に被験物質の投与に関連した異常が認められなかったため, その他の投与群の動物の検査は行わなかった。

眼科学的検査は以下の日程で実施した。

	雄	雌
投与開始前	2004 年 9 月 10 日	2004 年 9 月 17 日
投与 13 週時	2004 年 12 月 10 日	2004 年 12 月 17 日

#### 4.6.9. 尿検査

投与 13 週時に各群の全生存動物について尿検査を実施した。各動物から自然排泄によって得た尿を用いて以下の A の項目を検査した。また, 動物を個体別採尿ケージに一昼夜入れて採取した蓄積尿について B の項目を検査した。

A: 尿比重, ブドウ糖, ビリルビン, ケトン体, 潜血, pH, 蛋白質, ウロビリノーゲン,  
尿沈渣  
B: 尿色, 尿量

尿比重は手持屈折計（株式会社アタゴ，東京都）で測定した。ブドウ糖，ビリルビン，ケトン体，潜血，pH，蛋白質およびウロビリノーゲンは，試験紙マルティスティックス®SG（バイエルメディカル株式会社，東京都）の呈色の程度を，クリニテック®50（バイエルメディカル株式会社）で準定量することによって行った。尿沈渣は鏡検した。

尿検査は以下の日程で実施した。

	雄	雌
投与 13 週時	2004 年 12 月 8～9 日	2004 年 12 月 15～16 日

#### 4.6.10. 血液学的検査

13 週間反復投与終了後に各群の全生存動物について血液学的検査を実施した。検査動物は採血前に一晚絶食させた。動物をエーテル麻酔下で開腹し，無処理の注射筒を用いて後大静脈より採血した。

血液学的検査は，EDTA 処理後の試料カップに分注した各血液試料の一部を用いて，以下の項目について実施した。測定は総合血液学検査装置アドヴィア 120（Bayer Corporation, NY, U.S.A.）で行なった。なお，必要となった場合に参照する可能性を考慮して，各血液試料からメイグリュンワルド・ギムザ染色を施した塗抹標本を作製した。

測定項目(略号)	単位	測定方法
ヘマトクリット値 (Ht)	%	RBC, MCV 値より算出
血色素量 (Hb)	g/dl	シアンメトヘモグロビン変法
赤血球数 (RBC)	$10^6/\mu\text{l}$	光学的検知法
平均赤血球容積 (MCV)	fl	光学的検知法
平均赤血球血色素量 (MCH)	pg	Hb, RBC 値より算出
平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	g/dl	Hb, RBC, MCV 値より算出
血小板数 (PLT)	$10^3/\mu\text{l}$	光学的検知法
網赤血球数 (Retics)	$10^9/\text{l}$	光学的検知法
白血球数 (WBC)	$10^3/\mu\text{l}$	光学的検知法
白血球のディファレンシャルカウント： 好中球 (N)，リンパ球 (L)，単球 (M)， 好酸球 (E)，好塩基球 (B)，大型非染色 球 (LUC)	$10^3/\mu\text{l}$	光学的検知法

血液凝固能を調べるために以下の検査を実施した。これらの項目は、未処理の血液9容と3.2%クエン酸ソーダ水溶液1容の混和後に得られた血漿を試料として、自動血液凝固測定装置 CA-5000 (シスメックス株式会社, 兵庫県) を用いて測定した。

測定項目(略号)	単位	測定方法
プロトロンビン時間 (PT)	sec	プロトロンビン時間法
活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	sec	活性化部分トロンボプラスチン時間法

また、上述の血液学的検査に供した全動物の大腿骨骨髓から骨髓細胞を採取し、骨髓有核細胞数の測定およびメイグリュンワルド・ギムザ染色を施した骨髓塗抹標本の作製を実施した。骨髓有核細胞数は総合血液学検査装置アドヴィア 120 で行なった。血液学的検査において、本被験物質投与に起因すると考えられる造血器系への影響が認められなかったため、骨髓塗抹標本を対象とした骨髓細胞形態検査を行わなかった。

血液学的検査は以下の日程で実施した。

	雄	雌
投与 13 週計画殺動物	2004 年 12 月 16 日	2004 年 12 月 22 日

#### 4.6.11. 血液生化学的検査

13 週間反復投与終了後に、各群の全生存動物について前項 (4.6.10. 血液学的検査) で採取した血液試料をヘパリン処理して得られた血漿を用い、以下の項目を JCA-BM1250 自動分析装置 (日本電子株式会社, 東京都) を用いて測定した。

測定項目(略号)	単位	測定方法
アルカリホスファターゼ (ALP)	U/l	JSCC 標準化対応法
グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)	U/l	JSCC 標準化対応法
グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)	U/l	JSCC 標準化対応法
$\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGTP)	U/l	JSCC 標準化対応法
クレアチニン (Creat)	mg/dl	酵素法
尿素窒素 (BUN)	mg/dl	ウレアーゼ・UV LED アンモニア回避法
総蛋白 (TP)	g/dl	ビウレット法

アルブミン (Alb)	g/dl	BCG 法
グロブリン (Glob)	g/dl	計算値, TP-Alb
アルブミン/グロブリン比 (A/G ratio)	—	計算値, Alb/(TP-Alb)
血糖 (Gluc)	mg/dl	Gluc-DH 法
総コレステロール (T.Chol)	mg/dl	コレステロール酸化酵素法
トリグリセライド (TG)	mg/dl	FG 消去酵素法
総ビリルビン (T.Bil)	mg/dl	酵素法
カルシウム (Ca)	mg/dl	OCPC 法
無機リン (P)	mg/dl	酵素法
ナトリウム (Na)	mEq/l	イオン電極法
カリウム (K)	mEq/l	イオン電極法
塩素 (Cl)	mEq/l	イオン電極法

#### 4.6.12. 臓器重量

13 週間反復投与終了後に各群の生存動物について、採血および剖検後、以下の臓器の固定前の重量（絶対重量）を測定した。それらの値と最終体重から比体重値（相対重量）を算出した。

脳, 甲状腺 (両側), 心臓, 胸腺, 肝臓, 腎臓 (両側), 脾臓, 副腎 (両側), 精巣 (両側), 精巣上体 (両側), 前立腺 (腹葉), 卵巣 (両側), 子宮

臓器重量の測定は以下の日程で実施した。

	雄	雌
投与 13 週計画殺動物	2004 年 12 月 16 日	2004 年 12 月 22 日

#### 4.6.13. 剖検

13 週間反復投与終了後に各群の生存動物について、エーテルの深麻酔下で腹大動脈・後大静脈を切断して放血により安楽死させた後に剖検した。計画殺動物については剖検前に一晩絶食させた。剖検では、各個体の全身を詳細に観察し、肉眼的異常を記録した。

剖検は以下の日程で実施した。

	雄	雌
投与 13 週計画殺動物	2004 年 12 月 16 日	2004 年 12 月 22 日

#### 4.6.14. 組織採取

剖検時に全動物から以下の臓器および組織を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。ただし、肺についてはホルマリン液を気管から注入した後に浸漬固定した。また、

精巣は FSA 液（ホルマリン-ショ糖-酢酸混合液）で 5 日間固定した後、10% 中性緩衝ホルマリン液に移して保存した。

脳（大脳，小脳，橋および延髄），脊髄（頸部，胸部および腰部），坐骨神経（片側），下垂体，胸腺，甲状腺および上皮小体（両側），副腎（両側），脾臓，骨および骨髄（胸骨，片側大腿骨および頸部，胸部，腰部椎骨），膝関節（片側），リンパ節（頸部および腸間膜），心臓，大動脈，唾液腺（顎下腺および舌下腺），食道，胃（前胃および腺胃），肝臓，脾臓，十二指腸，空腸，回腸，盲腸，結腸，直腸，頭部（鼻腔，副鼻腔，口腔粘膜および中耳を含む），舌，咽頭，喉頭，気管，肺（気管支を含む），腎臓（両側），膀胱，精巣（両側），精巣上体（両側），前立腺，精のう（両側），凝固腺（両側），卵巣（両側），子宮（頸部を含む），膺，眼球（両側），ハーダー腺（両側），下腿三頭筋（片側），皮膚（腰背部），乳腺（腹部），肉眼的異常部位

#### 4.6.15. 病理組織学的検査

次に示す動物および臓器・組織を対象にして病理組織学的検査を実施した。

- (1) 対照群および高用量群の全動物から採取した次表に示す臓器・組織
- (2) 低用量群および中用量群の動物から採取した肉眼的異常部位

なお，(1)の検査の結果，被験物質による作用が生じていると考えられる組織（標的組織）はなかったため，これらの群については肉眼的異常部位のみを検査した。

脳（大脳，小脳，橋および延髄），脊髄（頸部，胸部および腰部），坐骨神経（片側），下垂体，胸腺，甲状腺（両側），上皮小体（両側），副腎（両側），脾臓，骨および骨髄（胸骨および片側大腿骨），リンパ節（頸部および腸間膜），心臓，大動脈，唾液腺（顎下腺および舌下腺），食道，胃（前胃および腺胃），肝臓，脾臓，十二指腸，空腸，回腸，盲腸，結腸，直腸，鼻腔，咽頭，喉頭，気管，肺（気管支を含む），腎臓（両側），膀胱，精巣（両側），精巣上体（両側），前立腺，精のう（両側），凝固腺（両側），卵巣（両側），子宮（角部および頸部），膺，眼球（網膜および視神経を含む，両側），ハーダー腺（両側），下腿三頭筋（片側），膝関節（片側），皮膚（腰背部），乳腺（腹部），肉眼的異常部位

病理組織学的検査は，常法に従って作製したパラフィン包埋，ヘマトキシリン・エオジン染色標本を対象に実施した。

#### 4.7. 有意差検定<sup>1)</sup>

各検査項目について、対照群と各被験物質投与群間の統計学的有意差の有無を危険率 5 および 1% レベルで解析した。

運動量、握力、体重、摂餌量、尿比重、尿量、血液学的検査項目、血液生化学的検査項目および臓器重量のデータについては、先ず Bartlett の等分散検定を行った。この検定によって全用量群における分散が均一であるという判定が出た場合には、一元配置分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた場合には、Dunnett の多重比較法を実施して対照群と各投与群間における有意差の有無を判定した。Bartlett の等分散検定で各群の分散が等しくないという判定が出た場合は、Kruskal-Wallis のノンパラメトリックな分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた場合には、Dunnett 型の多重比較法を用いて対照群と各投与群間における平均順位の有意差の有無を判定した。

尿検査項目（尿比重、尿量を除く）のデータについては、Kruskal-Wallis のノンパラメトリックな分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べ、その結果群間に有意差が認められた場合には、Dunnett 型の多重比較法を用いて対照群と各投与群間における平均順位の有意差の有無を判定した。

死亡率ならびに一般状態の観察所見、眼科学的検査所見、剖検所見および病理組織学的所見の発生頻度については、Fisher の直接確率計算法（片側検定）を用いて解析した。

## 5. 試験結果

### 5.1. 死亡率 (表 1 および 2, 付表 1 および 2)

試験期間中, いずれの投与群の雌雄とも死亡は認められなかった。

### 5.2. 一般状態の観察 (表 3 および 4, 付表 3 および 4)

いずれの被験物質投与群の雌雄においても, 発生頻度が対照群と比較して有意に増減した一般状態の異常は認められなかった。

また, 1000 mg/kg 用量群では雄の 1 例 (動物番号 233) に鼻周囲部の腫脹と被毛汚れ, 眼周囲部の赤色物付着および不正咬合が観察された。

### 5.3. 詳細な状態の観察 (表 5 および 6, 付表 5 および 6)

1000 mg/kg 用量群では, 投与 6 週時の雄にオープンフィールド観察での排尿頻度の有意な増加が観察された。雌では有意な変化はなかった。

300 mg/kg 用量群以下の被験物質投与群では, 雌雄とも投与に関連すると考えられる異常はなかった。

### 5.4. 機能検査 (表 7 および 8, 付表 7 および 8)

1000 mg/kg 用量群では, 対照群と比較して有意な変化はみられなかった。

300 mg/kg 用量群では, 雌で自発運動量の有意な減少が 20~30 分の測定時に認められた。雄では有意な変化はなかった。

### 5.5. 体重 (図 1 および 2, 表 9 および 10, 付表 9 および 10)

いずれの被験物質投与群の雌雄にも対照群と比較し, 投与 13 週間終了までに有意な体重変化は認められなかった。

### 5.6. 摂餌量 (表 11 および 12, 付表 11 および 12)

いずれの被験物質投与群の雌雄にも対照群と比較して有意な摂餌量の変化は認められなかった。

### 5.7. 食餌効率 (表 13 および 14)

雌雄とも投与 13 週までの食餌効率および全投与期間を通じた総平均食餌効率には被験物質投与群と対照群との間に明らかな差は認められなかった。

### 5.8. 眼科学的検査 (表 15 および 16, 付表 13 および 14)

投与 13 週時の検査では, 1000 mg/kg 用量群の雌雄に統計学的有意差のみられた変化はなかった。このため, 300 mg/kg 以下の被験物質投与群については投与 13 週時の眼科学的検査は行わなかった。



## 5.9. 尿検査 (表 17 および 18, 付表 15 および 16)

いずれの被験物質投与群の雌雄において、対照群と比べ統計学的に有意な差は認められなかった。

## 5.10. 血液学的検査 (表 19 および 20, 付表 17 および 18)

被験物質投与群で対照群と比較して統計学的有意差が認められた項目を以下の本文表 1 に示す。

本文表 1. 血液学的検査成績まとめ

項目	用量群 (mg/kg/日)					
	雄			雌		
	100	300	1000	100	300	1000
白血球のディファレンシャルカウント:						
単球数 (M)	100	109	109	140	↑ 160	120
好酸数 (E)	129	157	114	125	↑ 175	75

Dunnett の多重比較法。

↑,  $P \leq 0.05$ 。表中の数値は対照群を 100 とした時の相対値。

1000 mg/kg 用量群では、雌雄の各検査項目に統計学的有意差のみられた変化はなかった。

300 mg/kg 用量群では、雌動物に末梢血の白血球のディファレンシャルカウント項目の単球数および好酸球数が有意に増加した。

## 5.11. 血液生化学的検査 (表 21 および 22, 付表 19 および 20)

被験物質投与群で対照群と比較して統計学的有意差が認められた項目および関連項目を以下の本文表 2 に示す。

本文表 2. 血液生化学的検査成績まとめ

項目	用量群 (mg/kg/日)					
	雄			雌		
	100	300	1000	100	300	1000
アルブミン (Alub)	100	101	100	100	98	101
グロブリン (Glob)	100	94	99	100	99	98
アルブミン/グロブリン比 (A/G ratio)	99	↑109	101	100	100	103

Dunnett の多重比較法。

↑,  $P \leq 0.01$ 。表中の数値は対照群を 100 とした時の相対値。

1000 mg/kg 用量群では、雌雄の各検査項目に統計学的有意差のみられた変化はなかった。

300 mg/kg 用量群では、雄動物でアルブミン/グロブリン比が有意に増加した。

#### 5.12. 臓器重量 (表 25 および 26, 付表 21 および 22)

被験物質投与群で対照群と比較して統計学的有意差が認められた項目を以下の本文表 3 に示す。

本文表 3. 臓器重量まとめ

項目		用量群 (mg/kg/日)					
		雄			雌		
		100	300	1000	100	300	1000
心臓	絶対重量	98	95	96	101	101	95
	相対重量	96	↓ 91	96	104	102	101

Dunnett の多重比較法。

↓,  $P \leq 0.05$ 。表中の数値は対照群を 100 とした時の相対値。

1000 mg/kg 用量群では、雌雄の各臓器に統計学的有意差のみられた変化はなかった。

300 mg/kg 用量群では、雄動物で心臓の相対重量値が有意に減少した。

#### 5.13. 剖検 (表 23 および 24, 付表 23 および 24)

いずれの被験物質投与群の雌雄とも、対照群と比較して統計学的に有意な増加あるいは増加傾向を示した病変はなかった。

また、1000 mg/kg 用量群の雄 1 例 (動物番号 233) に口腔の不正咬合が認められた。

#### 5.14. 病理組織学的検査 (表 27 および 28, 付表 23 および 24)

高用量群の雌雄ともに対照群と比較して統計学的に有意に増加した病変はなかった。

また、1000 mg/kg 用量群の雄 1 例 (動物番号 233) に鼻骨骨折および上顎切歯の異形成が認められた。

## 6. 考察および結論

クヌギを原料とする木酢液のラットにおける90日間反復経口投与の毒性変化を検索し、無毒性量 (NOAEL) を求めた。各用量群雌雄 10 匹ずつの Wistar Hannover 系 SPF ラット (BrIHan:WIST@Jcl[GALAS]) を用いて、本被験物質を 0, 100, 300 および 1000 mg/kg/日 の用量で 90 日間 (13 週間) にわたって毎日連続強制経口投与した。試験期間中、全ての動物について死亡の有無を確認し、一般状態の観察、摂餌量の測定および体重測定を実施した。投与 11 週時に機能検査を、投与 13 週時に眼科学的検査および尿検査を実施し、13 週投与終了後に血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量測定、剖検および病理組織学的検査を行った。

1000 mg/kg 用量群において、詳細な状態の観察で投与 6 週時に雄で排尿頻度が増加した。雄動物にみられた本所見は投与期間中の一時期な変化であり、僅かな変化であったため、偶発的な増加であると判断された。この他、雌雄とも一般状態の観察、機能検査、体重、摂餌量、食餌効率、眼科学的検査、尿検査、血液学的検査および血液生化学的検査成績に被験物質投与の影響は認められなかった。各臓器の臓器重量、剖検所見および病理組織学的所見においても、被験物質投与に関連付けられる変化は観察されなかった。

また、1000 mg/kg 用量群では雄の 1 例 (動物番号 233) に一般状態の観察で鼻周囲部の腫脹と被毛汚れ、眼周囲部の赤色物付着および不正咬合が観察され、剖検で口腔の不正咬合が、病理組織学的検査で鼻骨骨折および上顎切歯の異形成が認められた。本個体にみられた各所見はケージ内での鼻部損傷によると思われる変化であろうと考えられ、被験物質投与に起因する変化ではないと判断された。

一方、300 mg/kg 用量群では、機能検査の自発運動量、血液学的検査の白血球ディファレンシャルカウント項目、血液生化学的検査項目および心臓重量に統計学的に有意な変化は散見されたものの、用量相関性のある変化ではなかった。これらの変化は被験物質投与に関連付けられる変化ではないと考えられた。

当該試験実施条件下でのクヌギを原料とする木酢液の Wistar Hannover 系 SPF ラット (BrIHan:WIST@Jcl[GALAS]) における無毒性量 (NOAEL) は雌雄とも 1000 mg/kg/日 と結論した。

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

当該試験において試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態は発生しなかった。

試験期間中に動物飼育室内の湿度の実測値が試験計画書の設定値から逸脱した。すなわち、動物飼育室の洗浄時にもなう逸脱が1回(2004年9月21日)、そして空調機保守点検時の一時停止による逸脱が1回(2004年11月6日)認められた。これらの逸脱は3%以内の極わずかな、そして10分間以内の短時間のものであり、その後の動物の状態にも異常は見られなかったことから、試験成績に影響を与えるものではなかったと判断した。

8. 参考文献

- 1) Gad, S.C. and Weil, C.S.: Statistics for Toxicologists. In: Principles and Methods of Toxicology (3rd edition), edited by Hayes, A.W., pp. 221-274, Raven Press, N.Y., 1994.

平成16年度 農林水産省 農薬的資材リスク情報収集委託事業  
(農薬的資材安全性検討試験)  
スギを原料とする木酢液のラットにおける 90 日間反復経口投与毒性試験  
(試験番号 IET 04-0060)

最終報告書

2005 年 3 月 18 日

茨城県水海道市内守谷町4321  
財団法人 残留農薬研究所

1/全337頁

この写しは原本と相違ないことを証明します。

財団法人 残留農薬研究所

試験責任者: 小坂 志可

日付: 2005 年 3 月 18 日

-27-

## 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 90 日間反復経口投与毒性試験

当該試験は次に示す試験の適正実施に関する基準（GLP）で定められたGLP精神を尊重して実施された。

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。

試験責任者

財団法人 残留農薬研究所

毒性第部免疫・急性毒性研究室長

小坂 忠司



2005年3月18日

**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

**毒性試験の適正実施に関する基準（GLP）および毒性試験指針**

GLP： 農林水産省，農薬の毒性に関する試験の適正に係る基準（11農産第6283号，1999年）で定められたGLP精神を尊重して実施する。

毒性試験指針： 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2-1-9，2000年）

**試験期間**

試験開始日：		2004年 8月 24日
動物入荷日：	雄	2004年 9月 7日
	雌	2004年 9月 14日
被験物質投与開始日：	雄	2004年 9月 15日
	雌	2004年 9月 22日
被験物質投与終了日：	雄	2004年 12月 16日
	雌	2004年 12月 23日
最終剖検日：	雄	2004年 12月 17日
	雌	2004年 12月 24日
試験終了(最終報告書作成)日：		2004年 3月 18日

**記録および標本の保管**

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，標本，最終報告書および記録は，当該試験が準拠するGLPの規定に従い，財団法人残留農薬研究所の資料保管施設で保管する。

ただし，変質しやすい標本等について，それによる試験成績の再評価が妥当性を失うとの理由からGLPの定める期間より前に処分する場合には，その理由を付し，文書で記録する。

試験従事者 試験責任者	小坂忠司		
試験担当者 (*は試験分担責任者)			
動物飼育管理, 臨床症状観察:	川勝尚夫* 平山浩司 林 宏一	石塚勝美 田島由香里	飯田 勉 福山朋季
投与液の調製:	上田英夫 田島由香里	林 宏一	福山朋季
被験物質の投与	川勝尚夫* 平山浩司	石塚勝美	飯田 勉
眼科学的検査:	川勝尚夫* 飯田 勉	石塚勝美	平山浩司
尿検査:	川勝尚夫* 飯田 勉	石塚勝美	平山浩司
機能検査:	首藤康文* 藤江秀彰	松本 力	林 豊
臓器重量測定:	川勝尚夫* 平山浩司 林 宏一	石塚勝美 田島由香里 上田英夫	飯田 勉 福山朋季
臨床検査:	小嶋五百合*	佐々木淳矢	木村豊恵
剖検:	榎本秋子* 竹内幸子	中島信明 高橋尚史	桑原真紀
病理組織標本作製:	千葉裕子*	富山千津子	
病理組織学的検査:	榎本秋子*		



## 目次

	頁
表紙 .....	1
陳述書 .....	2
試験施設 .....	3
毒性試験の適正実施に関する (GLP) および毒性試験指針 .....	3
試験期間 .....	3
記録および標本の保管 .....	3
試験従事者 .....	4
目次 .....	5
1. 要約 .....	9
2. 試験目的 .....	10
3. 被験物質 .....	10
4. 試験方法 .....	10
4.1. 試験動物 .....	10
4.2. 動物飼育管理 .....	11
4.3. 被験物質の投与方法および投与期間 .....	13
4.4. 試験群の設定および使用動物数 .....	13
4.5. 被験物質投与液の調製 .....	14
4.6. 観察および検査項目 .....	14
4.7. 有意差検定 .....	21
5. 試験結果 .....	22
5.1. 死亡率 .....	22
5.2. 一般状態の観察 .....	22
5.3. 詳細な状態の観察 .....	22
5.4. 機能検査 .....	22
5.5. 体重 .....	22
5.6. 摂餌量 .....	22
5.7. 食餌効率 .....	22
5.8. 眼科学的検査 .....	22
5.9. 尿検査 .....	23
5.10. 血液学的検査 .....	23
5.11. 血液生化学的検査 .....	23
5.12. 臓器重量 .....	24
5.13. 剖検 .....	24

## 目次 (続き)

	頁
5.14. 病理組織学的検査 .....	24
6. 考察および結論 .....	25
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 .....	27
8. 参考文献 .....	27

## FIGURES

1. Body weight change in male rats .....	28
2. Body weight change in female rats .....	29

## TABLES

1. Mortality – Cumulative death rates in male rats .....	30
2. Mortality – Cumulative death rates in female rats .....	31
3. General clinical observation – Incidence of signs in male rats .....	32
4. General clinical observation – Incidence of signs in female rats .....	33
Key to Tables 5 and 6	
Standard key to detailed clinical observation .....	34
5 (1-32). Detailed clinical observation – Summary data in male rats .....	36
6 (1-32). Detailed clinical observation – Summary data in female rats .....	68
Key to Tables 7 and 8	
Standard key to functional observation data .....	100
7 (1-3). Functional observation – Summary data in male rats .....	101
8 (1-3). Functional observation – Summary data in female rats .....	104
9. Body weight – Group mean values in male rats .....	107
10. Body weight – Group mean values in female rats .....	108
11. Food consumption – Group mean values in male rats .....	109
12. Food consumption – Group mean values in female rats .....	110
13. Food efficiency – Group mean values in male rats .....	111
14. Food efficiency – Group mean values in female rats .....	112
15. Ophthalmology – Incidence of findings in male rats .....	113
16. Ophthalmology – Incidence of findings in female rats .....	114
Key to Tables 17 and 18      Standard key to urinalysis data .....	115
17 (1-2). Urinalysis – Summary data in male rats .....	116
18 (1-2). Urinalysis – Summary data in female rats .....	118

## 目次 (続き)

TABLES (continued)	頁
Key to Tables 19 and 20	
Standard key to hematology data .....	120
19 (1-3). Hematology – Group mean values in male rats .....	121
20 (1-3). Hematology – Group mean values in female rats .....	124
Key to Tables 21 and 22	
Standard key to blood biochemistry data .....	127
21 (1-2). Blood biochemistry – Group mean values in male rats .....	128
22 (1-2). Blood biochemistry – Group mean values in female rats .....	130
23.(1-3) Necropsy – Incidence of macroscopic lesions in male rats .....	132
24. Necropsy – Incidence of macroscopic lesions in female rats .....	135
25 (1-2). Organ weight – Group mean values in male rats .....	136
26 (1-2). Organ weight – Group mean values in female rats .....	138
27 (1-6). Histopathology – Incidence of microscopic lesions in male rats .....	140
28 (1-2). Histopathology – Incidence of microscopic lesions in female rats .....	146
APPENDICES	
1. Mortality – Identification of scheduled or unscheduled deaths in male rats .....	148
2. Mortality – Identification of scheduled or unscheduled deaths in female rats .....	149
3 (1-4). General clinical observation – Individual data in male rats .....	150
4 (1-4). General clinical observation – Individual data in female rats .....	154
Key to 5 and 6	
Standard key to detailed clinical observation .....	158
5 (1-40). Detailed clinical observation – Individual data in male rats .....	160
6 (1-40). Detailed clinical observation – Individual data in female rats .....	200
Key to Appendices 7 and 8	
Standard key to functional observation data .....	240
7 (1-6). Functional observation – Individual data in male rats .....	241
8 (1-6). Functional observation – Individual data in female rats .....	247
9 (1-2). Body weight – Individual values in male rats .....	253
10 (1-2). Body weight – Individual values in female rats .....	255
11 (1-2). Food consumption – Individual values in male rats .....	257
12 (1-2). Food consumption – Individual values in female rats .....	259

## 目次 (続き)

APPENDICES (continued)	頁
13 (1-2). Ophthalmology – Individual findings in male rats .....	261
14 (1-2). Ophthalmology – Individual findings in female rats .....	263
Key to Appendices 15 and 16	
Standard key to individual urinalysis data .....	265
15 (1-2). Urinalysis – Individual data in male rats .....	266
16 (1-2). Urinalysis – Individual data in female rats .....	268
Key to Appendices 17 and 18	
Standard key to hematology data .....	270
17 (1-6). Hematology – Individual values in male rats .....	271
18 (1-6). Hematology – Individual values in female rats .....	277
Key to Appendices 19 and 20	
Standard key to blood biochemistry data .....	283
19 (1-4). Blood biochemistry – Individual values in male rats .....	284
20 (1-4). Blood biochemistry – Individual values in female rats .....	288
21 (1-4). Organ weight – Individual values in male rats .....	292
22 (1-4). Organ weight – Individual values in female rats .....	296
Key to Appendices 23 and 24	
Standard key to pathology data .....	300
23 (1-13). Pathology – Individual data in male rats .....	301
24 (1-12). Pathology – Individual data in female rats .....	314
25. Environmental control – Temperature in the animal room .....	326
26. Environmental control – Humidity in the animal room .....	327
27. Analysis of nutrients in basal diet .....	328
28. Acceptable limits of diet contaminants .....	329
29 (1-3). Chemical analysis – Contaminants in basal diet .....	330
30. Acceptable limits of water contaminants .....	333
31 (1-4). Chemical analysis – Contaminants in drinking water .....	334

## 1. 要約

スギを原料とする木酢液のラットにおける 90 日間反復経口投与の毒性変化を検索し、無毒性量 (NOAEL) を求めた。各用量群雌雄 10 匹ずつの Wistar Hannover 系 SPF ラット (BrIHan:WIST@Jcl[GALAS]) を用いて、本被験物質を 0, 100, 300 および 1000 mg/kg/日 の用量で 90 日間 (13 週間) にわたって毎日連続強制経口投与した。試験期間中、全ての動物について死亡の有無を確認し、一般状態の観察、摂餌量の測定および体重測定を実施した。投与 11 週時に機能検査を、投与 13 週時に眼科学的検査および尿検査を実施し、13 週投与終了後に血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量測定、剖検および病理組織学的検査を行った。

以下に、試験結果を要約する。

### 1000 mg/kg 用量群：

雄動物では、血液学的検査にて白血球数の増加および白血球ディファレンシャルカウント項目の好中球数と大型非染色球数の増加が認められた。臓器重量測定では、副腎重量の減少が認められた。一般状態の観察、機能検査、体重、摂餌量、食餌効率、眼科学的検査成績、尿検査成績、血液生化学的検査成績、剖検所見および病理組織学所見においても、被験物質投与に関連付けられる変化は認められなかった。

雌動物には被験物質投与に統計学的に有意な変化は観察されなかった。

### 300 mg/kg 以下の用量群：

統計学的に有意な変化は散見されたものの、被験物質投与に関連付けられる明らかな変化はいずれの項目にも観察されなかった。

当該試験実施条件下でのスギを原料とする木酢液の Wistar Hannover 系 SPF ラット (BrIHan:WIST@Jcl[GALAS]) における無毒性量 (NOAEL) は雄では 300 mg/kg/日、雌では 1000 mg/kg/日と結論した。

## 2. 試験目的

スギを原料とする木酢液をラットに 90 日間 (13 週間) にわたり反復経口投与してその亜急性毒性を検索し、無毒性量 (NOAEL) を求めた。

## 3. 被験物質

名称： スギを原料とする木酢液  
 供給元： 農林水産省林野庁林政部経営課特用林産対策室  
 ロット番号： W15081  
 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： 冷蔵暗所 (設定値 4℃, 許容範囲 1~10℃の被験物質保管庫)  
 参照用標本： 受領した被験物質より参照用サンプルとして約 5 g 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

### 4.1. 試験動物

#### 4.1.1. 試験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) で生産された Wistar Hannover 系 SPF ラット (BrlHan:WIST@Jcl[GALAS]) の雌雄動物を用いた。ラットは反復経口投与毒性試験に通常用いられている動物種である。

#### 4.1.2. 入荷時の動物の週齢、数および体重範囲

雌雄ともに 5 週齢で雄 47 匹を 2004 年 9 月 7 日に、雌 49 匹を 2004 年 9 月 14 日に入荷した。出荷時の体重範囲は、雄は 100~120 g、雌は 90~110 g であった。これは、試験計画書に記載された許容範囲 (雄は 90~130 g、雌は 80~120 g) 内であり、問題はなかった。

#### 4.1.3. 検疫および馴化

入荷後、雌雄とも 8 日間試験環境に検疫・馴化させた。この期間中毎日ケージサイドから全動物の一般状態を観察した。また、入荷日および群分け直前に腫瘤の触診を含む一般状態の観察を行った。さらに、全動物について詳細な状態の観察を雌雄とも検疫・馴化 7 日目に、眼科学的検査を雄では検疫・馴化 6 日目、雌では 7 日目に実施した。これらの一般状態の観察、詳細な状態の観察および眼科学的検査の結果、眼の異常が認められた雄 4 匹、雌 2 匹を供試動物より排除した。

#### 4.1.4. 投与開始時の動物の週齢

雌雄ともに6週齢で被験物質の投与を開始した(雄は2004年9月15日,雌は2004年9月22日)。投与開始時の体重は,雄は148~169g,雌は119~136gであった。

### 4.2. 動物飼育管理

#### 4.2.1. 飼育方法

##### 4.2.1.1. 飼育環境

温度  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , 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ー方式), 照明時間 12 時間/日 (午前 7 時点灯, 午後 7 時消灯) に設定された動物飼育室 (動物室 116) で動物を飼育した。試験期間中の動物飼育室の温度および湿度を付表 25 および 26 に示す。試験期間中, 動物飼育室の温度には設定値からの逸脱は認められなかった。一方, 湿度については, 動物飼育室の洗浄時にもなう逸脱が 1 回 (2004 年 9 月 21 日), そして空調機保守点検時の一時停止による逸脱が 1 回 (2004 年 11 月 6 日) 認められた。これらの逸脱は 3 % 以内の極わずかな, そして 10 分間以内の短時間のものであり, その後の動物の状態にも異常は見られなかったことから, 試験成績に影響を与えるものではなかったと判断した。

##### 4.2.1.2. ラックおよび飼育ケージ

ステンレス鋼製可動ラックにステンレス鋼製金網ケージ (310 W × 440 D × 230 H mm) を装着し, 群分け前は雌雄別に原則として各ケージに 6 匹ずつ収容した。試験期間中 (群分け後) はステンレス鋼製プレートを装着することによりステンレス鋼製金網ケージを分割し, 動物を左右に個体別に収容した。各ラックには被験物質名, 試験番号, 試験の種類および性別を, また, 群分け後の各ケージには被験物質名, 試験番号, 試験の種類, 動物種, 用量群, 性別, 個体識別および動物番号を記した標識を付けて識別した。

ラックおよびケージは群分け時に 1 回, その後は 4 週間に 1 回の頻度で洗浄・滅菌したものと交換した。各動物に対する照明, 騒音など環境条件を均等にするために, 交換時にケージのローテーションを行なった。ローテーションでは, 用量群ごとに配置位置を移動させた。対照群は高用量群の位置に, 高用量群, 中間用量群および低用量群はそれぞれ中間用量群, 低用量群および対照群の位置に移動した。また, 各群内のケージ配置はラックの最上段のケージを最下段に, 他の段は下段より順次上段に移動させる方法で実施した。

##### 4.2.1.3. 動物の群分け

試験には検疫・馴化を終えた健康な動物を用いた。投与開始日 (雄は 2004 年 9 月 15 日, 雌は 2004 年 9 月 22 日) にこれらすべての動物の体重を測定し, 極端に重い個体あるいは軽い個体を除外した。残りの動物を, 雌雄別々に, 体重値に基づいた層別無作為抽出法で各用量群に雌雄 10 匹ずつ配分した。この時, 各群間の体重に統計学的有意差のみられないこと, また, 雌雄各々について, 各個体の体重が平均体重の 80~120% の範囲内に

あることを確認した。群分け後、試験に用いなかった動物（群分けから除外した動物を含め、雄 7 匹、雌 9 匹）は当該動物室から排除した。

#### 4.2.1.4. 動物の個体識別

群分け前の個体識別は体部の被毛を塩基性フクシン飽和 70%エタノール溶液で染色することで行った。動物のケージ内番号と染色部位の関係を以下に示す。

- |                      |                      |
|----------------------|----------------------|
| No. 1, 頭部 (ア);       | No. 2, 背部 (セ);       |
| No. 3, 臀部 (シ);       | No. 4, 頭部および背部 (アセ); |
| No. 5, 背部および臀部 (セシ); | No. 6, 無染色 (ム)       |

群分け後の個体識別は耳鑑札法で行った。また、一般状態の観察および投与時の個体確認を容易にするために、雌雄の各用量群の動物番号の小さい順に 10 匹ずつ用量群ごとの個体識別を行った。各用量群での個体識別はピクリン酸飽和 70%エタノール溶液にて以下のように頭部、背部および臀部の被毛の一部を染色した。

- |                            |                           |
|----------------------------|---------------------------|
| No. 1, 頭部 (ア);             | No. 2, 背部 (セ);            |
| No. 3, 臀部 (シ);             | No. 4, 頭部および背部 (アセ);      |
| No. 5, 背部および臀部 (セシ);       | No. 6, 頭部, 背部および臀部 (アセシ); |
| No. 7, 頭部から背部 (ア-セ);       | No. 8, 背部から臀部 (セ-シ);      |
| No. 9, 頭部から背部から臀部 (ア-セ-シ); | No. 10, 無染色 (ム)           |

#### 4.2.2. 飼料

保証飼料MF粉末 (オリエンタル酵母工業株式会社, 東京都)をステンレス鋼製粉末給餌器に入れて動物に自由に摂取させた。給餌器は週に 1 回交換した。

試験に用いた全ロットの飼料について、オリエンタル酵母工業株式会社は使用ロット (Lot No. 040705, 041005, 041102) について以下の栄養素の分析を実施した。これらの栄養素の分析結果を付表 27 に示す。

水分, 粗蛋白, 粗脂肪, 粗灰分, 粗繊維, 可溶性無窒素物

本飼料中の以下の汚染物質については、飼料各ロットの発送前に財団法人日本食品分析センター (東京都) がロットごとに混入濃度を分析した。当研究所が設定したこれらの汚染物質の許容基準を付表 28 に示す。使用ロット (Lot No. 040705, 041005, 041102) の分析値を付表 29 に示す。飼料は各汚染物質の含有量が許容基準内にあることを確認したうえで発送された。

水銀, カドミウム, 鉛, ヒ素, セレン,  $\gamma$ -BHC, DDT (含類縁物質), アルドリン, デイルドリン, エンドリン, ヘプタクロール, マラチオン, パラチオン, アフラトキシン



(B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>), ポリ塩化ビフェニール, エストラジオール, ジメチルニトロソアミン, ジエチルニトロソアミン

#### 4.2.3. 飲料水

急速濾過・活性炭吸着装置を通した後、次亜塩素酸ナトリウムおよび紫外線によって殺菌した井戸水を、プラスチック製給水びんに入れて動物に自由に摂取させた。毎年6月と12月(2004年6月28日, 12月6日)に採取した試料を用いて、飲料水中の以下のAの項目を財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センター(東京都)が、Bの項目を財団法人残留農薬研究所化学部が分析した。当研究所が設定したこれらの汚染物質の許容基準を付表30に、実際の分析値を付表31に示す。分析の結果、いずれの汚染物質も許容基準内であり、問題はなかった。

A: ヒ素, 鉛, 総水銀, カドミウム, セレン, ポリ塩化ビフェニール, N-ニトロソ化合物, 総トリハロメタン  
 B: シマジン, チウラム, チオベンカルブ, 1,3-ジクロロプロペン

#### 4.3. 被験物質の投与方法および投与期間

被験物質の投与方法は強制経口投与とし、週7日間で13週間(90日間以上)にわたって反復経口投与した。経口による暴露はヒトで予想される本被験物質の主たる暴露経路に一致する。また、強制経口投与法は反復経口投与毒性試験で通常用いられている方法である。

被験物質の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、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与は午前11時から午後4時までの一定時間に実施した。投与容量は、体重1kg当り4mLとした。

#### 4.4. 試験群の設定および使用動物数

当該試験に先立って14日間反復経口投与毒性試験(IET 04-0059)を実施した。同試験ではスギを原料とする木酢液を0, 100, 300および1000mg/kg/日の用量で強制経口投与にて雄各4匹から成る各試験群のWistar Hannover系SPFラット(BrlHan:WIST@Jcl[GALAS])に反復経口投与した。その結果、100, 300および1000mg/kgの各投与群において、一般状態、体重、摂餌量、臓器重量等の検査成績に対照群と比べ有意な差は認められなかった。そこで、農林水産省の毒性試験指針に記載されている最大投与量の1000mg/kgを最高用量として、公比3にて300および100mg/kgの用量を設定した。

以下に当該試験の用量群ならびに使用動物数および動物番号(耳標識番号)を示す。

用量群 (mg/kg/日)	使用動物数 (動物番号)	
	雄	雌
0	10 (301~310)	10 (341~350)
100	10 (311~320)	10 (351~360)
300	10 (321~330)	10 (361~370)
1000	10 (331~340)	10 (371~380)

#### 4.5. 被験物質投与液の調製

各用量 (0, 100, 300, 1000 mg/kg) の被験物質投与液を週に2回 (月曜日と金曜日), 1回の調製あたり120 mL ずつ調製した。なお, 動物の体重増加による投与容量増加のため, 2004年11月15日以降は1回の調製あたり160 mL ずつ調製した。用量群ごとに必要量の被験物質を秤量した後, 注射用水 (大塚製薬株式会社, 東京都) にて希釈・定容し, スターラーで攪拌した。各用量の投与液は1日分 (当初30 mL で, 2004年11月15日以降は40 mL) ずつ小分けし, 投与日まで冷蔵庫 (設定値5℃, 許容範囲1~10℃の冷蔵庫) にて保管した。投与当日, 投与の約30分前に室温にもどし, 投与に用いた。また, 対照群では注射用水を用いた。

#### 4.6. 観察および検査項目

##### 4.6.1. 死亡率

全動物について, 投与期間中少なくとも1日2回, 瀕死状態ないし死亡の有無をケージサイドから観察した。

各用量群の死亡率は, 死亡・切迫殺動物数を分子, 使用動物数を分母とする分数表示により, 投与週毎の累積死亡率として雌雄別に表した。

##### 4.6.2. 一般状態の観察

一般状態の観察は, 少なくとも1日1回被験物質投与前に実施した。また, 触診を含む観察を少なくとも毎週1回実施した。一般状態の観察によって何らかの異常が認められた場合は, その発見日, 状態, 強度および持続期間を記録した。

##### 4.6.3. 詳細な状態の観察

全動物について, 詳細な状態の観察を投与開始前1回と投与期間中毎週1回, 午前のほぼ一定時刻 (被験物質投与前) に実施した。詳細な状態の観察時には以下の項目について発現の有無あるいは程度を観察し, 採点 (スコアリング) した。

ケージ内: 興奮, 鎮静, 異常姿勢 (腹臥, 横臥など), 異常行動 (後ずさり, 常同行動, 自傷行動など)

ハンドリング： 取り扱い難さ，筋緊張の変化（亢進，低下），振戦，眼瞼閉鎖，瞳孔径の変化（散瞳，縮瞳），流涎，流涙，分泌物（鼻孔，耳孔，膣などからの分泌物），眼球突出，体温の変化（上昇，下降），呼吸異常音，被毛の変化（外陰部湿潤），皮膚および可視粘膜の変化（充血）

オープンフィールド： 跳躍，旋回，痙攣，歩様異常（運動協調性を含む，よろめき歩行，ひきずり歩行，後肢麻痺など），自発運動（亢進，低下），身づくろい動作（頻度），立ち上がり姿勢（頻度），呼吸（促迫，緩徐），発声，立毛，排尿（回数），排便（回数），異常姿勢（腹臥，横臥など），異常行動（後ずさり，常同行動，自傷行動など）

#### 4.6.4. 機能検査

全動物について，投与 11 週時に以下の項目の機能検査を実施した。

自発運動量，握力（前肢，後肢），感覚運動反応（位置視覚，接近反応，聴覚反応，触覚反応，痛覚反応，空中立ち直り反射）

自発運動量は，遠赤外線方式の検出器（SUPER MEX®）を装着した運動量測定装置（室町機械株式会社，東京都）を用いて連続 1 時間，10 分ごとに測定した。握力はラット握力測定器 CPU gauge Model-9505（アイコーエンジニアリング株式会社，愛知県）を用いて測定した。感覚運動反応の各項目は以下の方法で行い，正常あるいは通常範囲を“0”に設定した尺度基準を用いて採点（スコアリング）した。

位置視覚：動物の尾部を持ち垂直にぶら下げた状態で，平面に近づけて行った際の前肢を伸ばすタイミングを判定

接近反応：動物の正面に検査棒をゆっくりと近づけた際の反応を判定

聴覚反応：動物の背後で突然クリッカーを鳴らした際の反応を判定

触覚反応：動物の背部をピンセットで軽く触れた際の反応を判定

痛覚反応：動物の尾部をピンセットで挟んだ際の反応を判定

空中立ち直り反射：動物を仰向けに持ち上げて約 20 cm の高さから落下させた際の着地の姿勢を判定

各検査は，群間に偏りが出ないように各用量群から動物番号の若い順に 1 匹ずつ選択し，この操作を繰り返して実施した。機能検査は午前 9 時から午後 3 時の間に実施した。

機能検査は以下の日程で実施した。

	雄	雌
投与 11 週時	2004 年 11 月 26～27 日	2004 年 12 月 3～4 日

#### 4.6.5. 体重

全動物について投与開始日(0 週, 第一回目の投与日), およびその後毎週 1 回体重を測定した。投与期間中の体重測定は各投与週の最終日に行なった。各用量群の群平均体重を測定週ごとに雌雄別に算出した。また, 全動物について殺処分前に最終体重を測定し, 臓器重量測定時の比体重値の算出に用いた(4.6.12. 臓器重量参照)。

#### 4.6.6. 摂餌量

全生存動物について, 投与期間中毎週 1 回連続 7 日分(最終週のみ 4 日分)の摂餌量を測定した。各測定値を測定期間中の延べ日数で除し, 1 日 1 匹あたりの摂餌量(個別別平均摂餌量)を算出した。これらの個別別摂餌量から各用量群における群平均摂餌量(g/rat/day)を測定週毎に雌雄別に算出した。さらに, これら週毎の群平均摂餌量を加重平均し, 全投与期間を通じた総平均摂餌量を雌雄別に求めた。

#### 4.6.7. 食餌効率

全用量群について, 投与開始後毎週, 群平均体重増加量をそれぞれの群平均摂餌量で除して群平均食餌効率(%で表示)を雌雄別に算出した。さらに, これらの群平均食餌効率を平均し, 全投与期間を通じた総平均食餌効率を雌雄別に求めた。

#### 4.6.8. 眼科学的検査

馴化期間中に雌雄の全馴化動物および投与 13 週時には対照群と 1000 mg/kg 用量群の全生存動物について, ハロゲン検眼鏡(株式会社ナイツ, 東京都)による観察を含む眼科学的検査を行なった。眼科学的検査では以下の部位を観察した。

眼球, 眼瞼, 結膜, 角膜, 前眼房, 瞳孔, 虹彩, 水晶体/硝子体, 眼底

投与 13 週時の検査において 1000 mg/kg 用量群の動物に被験物質の投与に関連した異常が認められなかったため, その他の投与群の動物の検査は行わなかった。

眼科学的検査は以下の日程で実施した。

	雄	雌
投与開始前	2004 年 9 月 13 日	2004 年 9 月 21 日
投与 13 週時	2004 年 12 月 13 日	2004 年 12 月 20 日

#### 4.6.9. 尿検査

投与 13 週時に各群の全生存動物について尿検査を実施した。各動物から自然排泄によって得た尿を用いて以下の A の項目を検査した。また, 動物を個別別採尿ケージに一昼夜入れて採取した蓄積尿について B の項目を検査した。

A: 尿比重, ブドウ糖, ビリルビン, ケトン体, 潜血, pH, 蛋白質, ウロビリノーゲン, 尿沈渣  
 B: 尿色, 尿量

尿比重は手持屈折計（株式会社アタゴ，東京都）で測定した。ブドウ糖，ビリルビン，ケトン体，潜血，pH，蛋白質およびウロビリノーゲンは，試験紙マルティスティックス®SG（バイエルメディカル株式会社，東京都）の呈色の程度を，クリニテック®50（バイエルメディカル株式会社）で準定量することによって行った。尿沈渣は鏡検した。

尿検査は以下の日程で実施した。

	雄	雌
投与 13 週時	2004 年 12 月 9～10 日	2004 年 12 月 16～17 日

#### 4.6.10. 血液学的検査

13 週間反復投与終了後に各群の全生存動物について血液学的検査を実施した。検査動物は採血前に一晩絶食させた。動物をエーテル麻酔下で開腹し，無処理の注射筒を用いて後大静脈より採血した。

血液学的検査は，EDTA 処理後の試料カップに分注した各血液試料の一部を用いて，以下の項目について実施した。測定は総合血液学検査装置アドヴィア 120（Bayer Corporation, NY, U.S.A.）で行なった。なお，必要となった場合に参照する可能性を考慮して，各血液試料からメイグリュンワルド・ギムザ染色を施した塗抹標本を作製した。

測定項目(略号)	単位	測定方法
ヘマトクリット値 (Ht)	%	RBC, MCV 値より算出
血色素量 (Hb)	g/dl	シアンメトヘモグロビン変法
赤血球数 (RBC)	$10^6/\mu\text{l}$	光学的検知法
平均赤血球容積 (MCV)	fl	光学的検知法
平均赤血球血色素量 (MCH)	pg	Hb, RBC 値より算出
平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	g/dl	Hb, RBC, MCV 値より算出
血小板数 (PLT)	$10^3/\mu\text{l}$	光学的検知法
網赤血球数 (Retics)	$10^9/\text{l}$	光学的検知法
白血球数 (WBC)	$10^3/\mu\text{l}$	光学的検知法
白血球のディファレンシャルカウント： 好中球 (N)，リンパ球 (L)，単球 (M)， 好酸球 (E)，好塩基球 (B)，大型非染色 球 (LUC)	$10^3/\mu\text{l}$	光学的検知法

血液凝固能を調べるために以下の検査を実施した。これらの項目は、未処理の血液 9 容と 3.2%クエン酸ソーダ水溶液 1 容の混和後に得られた血漿を試料として、自動血液凝固測定装置 CA-5000 (シスメックス株式会社, 兵庫県) を用いて測定した。

測定項目(略号)	単位	測定方法
プロトロンビン時間 (PT)	sec	プロトロンビン時間法
活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	sec	活性化部分トロンボプラスチン時間法

また、上述の血液学的検査に供した全動物の大腿骨髄から骨髓細胞を採取し、骨髓有核細胞数の測定およびメイグリュンワルド・ギムザ染色を施した骨髓塗抹標本の作製を実施した。骨髓有核細胞数は総合血液学検査装置アドヴィア 120 で行なった。血液学的検査成績において、本被験物質投与によると思われる造血器系への影響が考えられるため、骨髓塗抹標本を対象とした骨髓細胞形態検査を実施する。

血液学的検査は以下の日程で実施した。

	雄	雌
投与 13 週計画殺動物	2004 年 12 月 17 日	2004 年 12 月 24 日

#### 4.6.11. 血液生化学的検査

13 週間反復投与終了後に、各群の全生存動物について前項 (4.6.10. 血液学的検査) で採取した血液試料をヘパリン処理して得られた血漿を用い、以下の項目を JCA-BM1250 自動分析装置 (日本電子株式会社, 東京都) を用いて測定した。

測定項目(略号)	単位	測定方法
アルカリホスファターゼ (ALP)	U/l	JSCC 標準化対応法
グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)	U/l	JSCC 標準化対応法
グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)	U/l	JSCC 標準化対応法
γ-グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGTP)	U/l	JSCC 標準化対応法
クレアチニン (Creat)	mg/dl	酵素法
尿素窒素 (BUN)	mg/dl	ウレアーゼ・UV LED アンモニア回避法
総蛋白 (TP)	g/dl	ビウレット法

アルブミン (Alb)	g/dl	BCG 法
グロブリン (Glob)	g/dl	計算値, TP-Alb
アルブミン/グロブリン比 (A/G ratio)	-	計算値, Alb/(TP-Alb)
血糖 (Gluc)	mg/dl	Gluc-DH 法
総コレステロール (T.Chol)	mg/dl	コレステロール酸化酵素法
トリグリセライド (TG)	mg/dl	FG 消去酵素法
総ビリルビン (T.Bil)	mg/dl	酵素法
カルシウム (Ca)	mg/dl	OCPC 法
無機リン (P)	mg/dl	酵素法
ナトリウム (Na)	mEq/l	イオン電極法
カリウム (K)	mEq/l	イオン電極法
塩素 (Cl)	mEq/l	イオン電極法

#### 4.6.12. 臓器重量

13 週間反復投与終了後に各群の生存動物について、採血および剖検後、以下の臓器の固定前の重量（絶対重量）を測定した。それらの値と最終体重から比体重値（相対重量）を算出した。

脳, 甲状腺 (両側), 心臓, 胸腺, 肝臓, 腎臓 (両側), 脾臓, 副腎 (両側), 精巣 (両側), 精巣上体 (両側), 前立腺 (腹葉), 卵巣 (両側), 子宮

臓器重量の測定は以下の日程で実施した。

	雄	雌
投与 13 週計画殺動物	2004 年 12 月 17 日	2004 年 12 月 24 日

#### 4.6.13. 剖検

13 週間反復投与終了後に各群の生存動物について、エーテルの深麻酔下で腹大動脈・後大静脈を切断して放血により安楽死させた後に剖検した。計画殺動物については剖検前に一晩絶食させた。剖検では、各個体の全身を詳細に観察し、肉眼的異常を記録した。

剖検は以下の日程で実施した。

	雄	雌
投与 13 週計画殺動物	2004 年 12 月 17 日	2004 年 12 月 24 日

#### 4.6.14. 組織採取

剖検時に全動物から以下の臓器および組織を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。ただし、肺についてはホルマリン液を気管から注入した後に浸漬固定した。また、

精巣は FSA 液（ホルマリン-ショ糖-酢酸混合液）で 5 日間固定した後、10% 中性緩衝ホルマリン液に移して保存した。

脳（大脳，小脳，橋および延髄），脊髄（頸部，胸部および腰部），坐骨神経（片側），下垂体，胸腺，甲状腺および上皮小体（両側），副腎（両側），脾臓，骨および骨髄（胸骨，片側大腿骨および頸部，胸部，腰部椎骨），膝関節（片側），リンパ節（頸部および腸間膜），心臓，大動脈，唾液腺（顎下腺および舌下腺），食道，胃（前胃および腺胃），肝臓，膵臓，十二指腸，空腸，回腸，盲腸，結腸，直腸，頭部（鼻腔，副鼻腔，口腔粘膜および中耳を含む），舌，咽頭，喉頭，気管，肺（気管支を含む），腎臓（両側），膀胱，精巣（両側），精巣上体（両側），前立腺，精のう（両側），凝固腺（両側），卵巣（両側），子宮（頸部を含む），膣，眼球（両側），ハーダー腺（両側），下腿三頭筋（片側），皮膚（腰背部），乳腺（腹部），肉眼的異常部位

#### 4.6.15. 病理組織学的検査

次に示す動物および臓器・組織を対象にして病理組織学的検査を実施した。

(1) 対照群および高用量群の全動物から採取した次表に示す臓器・組織

(2) 低用量群および中用量群の動物から採取した肉眼的異常部位

なお、(1)の検査の結果、被験物質による作用が生じていると考えられる組織（標的組織）はなかったため、これらの群については肉眼的異常部位のみを検査した。

脳（大脳，小脳，橋および延髄），脊髄（頸部，胸部および腰部），坐骨神経（片側），下垂体，胸腺，甲状腺（両側），上皮小体（両側），副腎（両側），脾臓，骨および骨髄（胸骨および片側大腿骨），リンパ節（頸部および腸間膜），心臓，大動脈，唾液腺（顎下腺および舌下腺），食道，胃（前胃および腺胃），肝臓，膵臓，十二指腸，空腸，回腸，盲腸，結腸，直腸，鼻腔，咽頭，喉頭，気管，肺（気管支を含む），腎臓（両側），膀胱，精巣（両側），精巣上体（両側），前立腺，精のう（両側），凝固腺（両側），卵巣（両側），子宮（角部および頸部），膣，眼球（網膜および視神経を含む，両側），ハーダー腺（両側），下腿三頭筋（片側），膝関節（片側），皮膚（腰背部），乳腺（腹部），肉眼的異常部位

病病理組織学的検査は、常法に従って作製したパラフィン包埋、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を対象に実施した。



#### 4.7. 有意差検定<sup>1)</sup>

各検査項目について、対照群と各被験物質投与群間の統計学的有意差の有無を危険率 5 および 1% レベルで解析した。

運動量、握力、体重、摂餌量、尿比重、尿量、血液学的検査項目、血液生化学的検査項目および臓器重量のデータについては、先ず Bartlett の等分散検定を行った。この検定によって全用量群における分散が均一であるという判定が出た場合には、一元配置分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた場合には、Dunnett の多重比較法を実施して対照群と各投与群間における有意差の有無を判定した。Bartlett の等分散検定で各群の分散が等しくないという判定が出た場合は、Kruskal-Wallis のノンパラメトリックな分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた場合には、Dunnett 型の多重比較法を用いて対照群と各投与群間における平均順位の有義差の有無を判定した。

尿検査項目（尿比重、尿量を除く）のデータについては、Kruskal-Wallis のノンパラメトリックな分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べ、その結果群間に有意差が認められた場合には、Dunnett 型の多重比較法を用いて対照群と各投与群間における平均順位の有義差の有無を判定した。

死亡率ならびに一般状態の観察所見、眼科学的検査所見、剖検所見および病理組織学的所見の発生頻度については、Fisher の直接確率計算法（片側検定）を用いて解析した。

## 5. 試験結果

### 5.1. 死亡率 (表 1 および 2, 付表 1 および 2)

対照群の雄 1 例 (動物番号 301) が投与 1 週に切迫殺された。  
被験物質投与群の雌雄とも死亡は認められなかった。

### 5.2. 一般状態の観察 (表 3 および 4, 付表 3 および 4)

いずれの被験物質投与群の雌雄においても, 発生頻度が対照群と比較して有意に増減した一般状態の異常は認められなかった。

また, 切迫殺された対照群の 1 例 (雄, 動物番号 301) には鼻部の形成異常と閉鎖, 口腔の閉鎖と創傷と腫脹, 不正咬合, 眼周囲部の赤色物付着および自発運動の低下が観察された。

### 5.3. 詳細な状態の観察 (表 5 および 6, 付表 5 および 6)

いずれの被験物質投与群の雌雄とも対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

### 5.4. 機能検査 (表 7 および 8, 付表 7 および 8)

いずれの被験物質投与群の雌雄とも対照群と比較して有意な機能検査項目の変化はみられなかった。

### 5.5. 体重 (図 1 および 2, 表 9 および 10, 付表 9 および 10)

いずれの被験物質投与群の雌雄にも対照群と比較し, 投与 13 週間終了までに有意な体重変化は認められなかった。

### 5.6. 摂餌量 (表 11 および 12, 付表 11 および 12)

いずれの被験物質投与群の雌雄にも対照群と比較して有意な摂餌量の変化は認められなかった。

### 5.7. 食餌効率 (表 13 および 14)

雌雄とも投与 13 週までの食餌効率および全投与期間を通じた総平均食餌効率には, 被験物質投与群と対照群との間に明らかな差は認められなかった。

### 5.8. 眼科学的検査 (表 15 および 16, 付表 13 および 14)

投与 13 週時の検査では, 1000 mg/kg 用量群の雌雄に統計学的有意差のみられた変化はなかった。このため, 300 mg/kg 以下の被験物質投与群については投与 13 週時の眼科学的検査は行わなかった。

## 5.9. 尿検査 (表 17 および 18, 付表 15 および 16)

いずれの被験物質投与群の雌雄において、対照群と比べ統計学的に有意な差は認められなかった。

## 5.10. 血液学的検査 (表 19 および 20, 付表 17 および 18)

被験物質投与群で対照群と比較して統計学的有意差が認められた項目を以下の本文表 1 に示す。

本文表 1. 血液学的検査成績まとめ

項目	用量群 (mg/kg/日)					
	雄			雌		
	100	300	1000	100	300	1000
白血球数 (WBC)	105	118	↑ 128	121	110	111
白血球のディファレンシャルカウント:						
好中球数 (N)	106	91	↑ 151	123	110	110
大型非染色球数 (LUC)	80	120	↑ 140	150	150	200

Dunnett の多重比較法。

↑,  $P \leq 0.05$ ; ↑↑,  $P \leq 0.01$ 。表中の数値は対照群を 100 とした時の相対値。

1000 mg/kg 用量群の雄動物では、白血球数の有意な増加および白血球ディファレンシャルカウント項目の好中球数と大型非染色球数の増加が認められた。同群の雌動物には有意な変化は認められなかった。

300 mg/kg 以下の被験物質投与群では、雌雄の各検査項目に統計学的有意差のみられた変化はなかった。

## 5.11. 血液生化学的検査 (表 21 および 22, 付表 19 および 20)

被験物質投与群で対照群と比較して統計学的有意差が認められた項目および関連項目を以下の本文表 2 に示す。

本文表 2. 血液生化学的検査成績まとめ

項目	用量群 (mg/kg/日)					
	雄			雌		
	100	300	1000	100	300	1000
アルブミン (Alb)	102	102	101	102	100	102
グロブリン (Glob)	103	101	106	105	100	103
アルブミン/グロブリン比 (A/G ratio)	99	101	↓ 96	97	100	99

Dunnett の多重比較法。

↓,  $P \leq 0.05$ 。表中の数値は対照群を 100 とした時の相対値。

1000 mg/kg 用量群では、雄動物でアルブミン/グロブリン比が有意に減少した。同群の雌動物には有意な変化は認められなかった。

300 mg/kg 以下の被験物質投与群では、雌雄の各検査項目に統計学的有意差のみられた変化はなかった。

#### 5.12. 臓器重量 (表 25 および 26, 付表 21 および 22)

被験物質投与群で対照群と比較して統計学的有意差が認められた項目を以下の本文表 3 に示す。

本文表 3. 臓器重量まとめ

項目		用量群 (mg/kg/日)					
		雄			雌		
		100	300	1000	100	300	1000
腎臓	絶対重量	105	102	105	98	100	101
	相対重量	↑ 107	98	103	97	98	97
副腎	絶対重量	96	93	86	90	95	94
	相対重量	100	94	↓ 88	91	94	91

Dunnett の多重比較法。

↑,  $P \leq 0.05$ ; ↓,  $P \leq 0.01$ 。表中の数値は対照群を 100 とした時の相対値。

1000 mg/kg 用量群では、雄動物で副腎の相対重量値が有意に減少した。同群の雌動物には有意な変化は認められなかった。

300 mg/kg 用量群では、雌雄の各臓器に統計学的有意差のみられた変化はなかった。

100 mg/kg 用量群では、雄動物で腎臓の相対重量値が有意に増加した。

#### 5.13. 剖検 (表 23 および 24, 付表 23 および 24)

いずれの被験物質投与群の雌雄とも、対照群と比較して統計学的に有意な増加あるいは増加傾向を示した病変はなかった。

また、切迫殺された対照群の 1 例 (雄, 動物番号 301) では顔面骨折および口腔の創傷が認められた。

#### 5.14. 病理組織学的検査 (表 27 および 28, 付表 23 および 24)

高用量群の雌雄ともに対照群と比較して統計学的に有意に増加した病変はなかった。

また、対照群の切迫殺の動物 (雄, 動物番号 301) では、顔面骨骨折および鼻腔の鼻炎と口腔の口内炎が認められた。

## 6. 考察および結論

スギを原料とする木酢液のラットにおける 90 日間反復経口投与の毒性変化を検索し、無毒性量 (NOAEL) を求めた。各用量群雌雄 10 匹ずつの Wistar Hannover 系 SPF ラット (BrlHan:WIST@Jcl[GALAS]) を用いて、本被験物質を 0, 100, 300 および 1000 mg/kg/日の用量で 90 日間 (13 週間) にわたって毎日連続強制経口投与した。試験期間中、全ての動物について死亡の有無を確認し、一般状態の観察、摂餌量の測定および体重測定を実施した。投与 11 週時に機能検査を、投与 13 週時に眼科学的検査および尿検査を実施し、13 週投与終了後に血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量測定、剖検および病理組織学的検査を行った。

1000 mg/kg 用量群雄動物では、血液学的検査にて白血球数の有意な増加および白血球ディファレンシャルカウント項目の好中球数と大型非染色球数の増加が認められた。また、臓器重量測定では雄の副腎相対重量値が有意に減少した。通常、白血球数および好中球数の増加は炎症性変化に伴った変化であると考えられるが、病理組織学的所見においてこれに対応するような炎症性変化や骨髄等における造血亢進は認められなかった。重量の減少がみられた副腎においても病理組織学的異常は認められなかった。また、副腎相対重量値の減少は白血球数および好中球数の増加に関連した変化とは考えられなかった。いずれの変化も最高用量群にみられた統計学的に有意な変化であるので、被験物質投与による毒性変化であると考えられた。一方、血液生化学的検査にて雄動物でアルブミン/グロブリン比が減少した。しかし、同群のアルブミン値およびグロブリン値には何ら変化が認められなかったため、本所見は偶発的な変化であると判断された。

本被験物質の「スギを原料とする木酢液」中の主要な毒性物質の化学分析 (林野庁特用林産対策室より得られたデータ) において、ホルムアルデヒドの含有量が 1300 ppm であった。この含有量に基づき、当該試験における本被験物質中のホルムアルデヒド濃度を算定すると、本被験物質の 1000 mg/kg の用量はホルムアルデヒドの 1.3 mg/kg の用量に相当する。そこで、ホルムアルデヒドのラットを用いた反復経口投与毒性試験における毒性情報を挙げてみる。Wistar 系の雌雄ラットを用いた 5, 25 および 125 mg/kg 用量の 4 週間飲水経口投与毒性試験<sup>2)</sup>において、125 mg/kg 投与群では病理組織学的検査で雌雄に前胃部の角化亢進が、血液生化学的検査で雄に総蛋白とアルブミンの減少が、臓器重量で雌に腎臓重量の増加が認められた。SD 系の雌雄ラットを用いた 90 日間反復経口投与毒性試験<sup>3)</sup>においては、100 および 150 mg/kg 投与群にて体重の増加抑制はみられたものの、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量検査および病理組織学的検査の各検査において毒性学的異常は認められなかった。また、Wistar 系の雌雄ラットを用いた飲水経路の 2 年間慢性経口投与毒性試験<sup>4)</sup>において、雄の 82 mg/kg および雌の 109 mg/kg 投与群では、病理組織学的検査にて雌雄ともに 52, 78 および 104 週間投与終了後の各時期に前胃部の乳頭状上皮過形成と腺胃部の慢性萎縮性胃炎の発生頻度が増加し、最終解剖の 104 週間投与終了後に前胃部の角化亢進および腺胃部の潰瘍形成と腺上皮過形成の発生頻度が増加

した事が報告されている。これらの4週間および2年間飲水経口投与毒性試験の報告は、ホルムアルデヒドをラットに反復経口投与した場合、胃に上皮過形成や胃炎などの炎症性変化を誘起させることを示している。本試験では病理組織学的検査で胃などの各臓器に炎症性変化は認められなかったものの、1000 mg/kg 投与群の雄で認められた白血球数と好中球数の増加はホルムアルデヒドを含有する本被験物質の投与に起因する変化であると考えられた。加えて、ホルムアルデヒドの反復経口投与毒性試験の報告から、白血球数と好中球数の増加は病理組織学的検査では検出できない程度の炎症性変化に随伴した変化である可能性が示唆された。

1000 mg/kg 用量群の雌動物には被験物質投与に関連付けられる変化は観察されなかった。

100 mg/kg 用量群では、雄動物で腎臓相対重量に有意な増加が認められたものの、用量相関性のある変化ではなかった。

また、対照群の雄に死亡例（動物番号 301）がみられ、本個体では一般状態の観察で鼻部の形成異常と閉鎖、口腔の閉鎖と創傷と腫脹、不正咬合、眼周囲部の赤色物付着および自発運動の低下が観察され、剖検所見で顔面骨折および口腔の創傷が、病理組織学的検査で鼻骨骨折および上顎切歯の異形成が認められた。本個体にみられた各所見はケージ内での顔面骨折に至る強度の顔面損傷による変化であった。

当該試験実施条件下でのスギを原料とする木酢液の Wistar Hannover 系 SPF ラット (Br1Han:WIST@Jcl[GALAS]) における無毒性量 (NOAEL) は雄では 300 mg/kg/日、雌では 1000 mg/kg/日と結論した。

#### 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

当該試験において試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態は発生しなかつた。

試験期間中に動物飼育室内の湿度の実測値が試験計画書の設定値から逸脱した。すなわち、動物飼育室の洗浄時にもなう逸脱が1回(2004年9月21日)、そして空調機保守点検時の一時停止による逸脱が1回(2004年11月6日)認められた。これらの逸脱は3%以内の極わずかな、そして10分間以内の短時間のものであり、その後の動物の状態にも異常は見られなかつたことから、試験成績に影響を与えるものではなかつたと判断した。

#### 8. 参考文献

- 1) Gad S.C. and Weil C.S.: Statistics for Toxicologists. In: Principles and Methods of Toxicology (3rd edition), edited by Hayes, A.W., pp. 221-274, Raven Press, N.Y., 1994.
- 2) Til H.P, Woutersen R.A., Feron V.J., and Clary J.J.: Evaluation of the Oral Toxicity of Acetaldehyde and Formaldehyde in a 4-Week Drinking-Water Study in Rats. Food and Chemical Toxicology 26, 447-452, 1988.
- 3) Johannsen F.R, Levinskas G.J. and Tegeris, A.S.: Effects of Formaldehyde in the Rat and Dog Following Oral Exposure. Toxicology Letters 30, 1-6, 1986.
- 4) Til H.P, Woutersen R.A., Feron V.J., Hollanders V.H.M., and Falke H.E.: Two-Year Drinking-Water Study of Formaldehyde in Rats. Food and Chemical Toxicology 27, 77-87, 1989.