

ヒノキ葉粉末のラットにおける
急性経口毒性試験

(試験番号 IET 03-0023)

最終報告書

2003年9月1日

茨城県水海道市内守谷町4321

財団法人 残留農薬研究所

全1/20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： 小坂忠司

日付： 2003年 9月 1日

陳述書

試験名称：ヒノキ葉粉末のラットにおける急性経口毒性試験

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

毒性第二部免疫毒性研究室長 小坂 忠司

印

2003年9月1日

試験委託者

名 称 住友林業株式会社 筑波研究所
所 在 地 茨城県つくば市緑ヶ原 3・2 (〒300-2646)

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 豪

毒性試験指針の適用

農林水産省 (12 農産第 8147 号 2-1-1, 2000 年)

米国環境保護庁 (Health Effects Test Guidelines OPPTS, 870.1100, 1998 年)

経済協力開発機構 (OECD Guideline No. 423, 2001 年)

記録等の保管

試験実施中に作出されるすべての生データ、試験計画書、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 藤江秀彰 松本力 林豊 林宏一

目次

	頁
表紙	1
陳述書	2
試験委託者	3
試験施設	3
毒性試験指針の適用	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	7
4.3. 投与方法	8
4.4. 投与用量および使用動物数	8
4.5. 投与液調製	8
4.6. 観察および検査項目	9
4.7. 試験結果の評価	9
5. 試験成績	10
5.1. 死亡率	10
5.2. 臨床症状	10
5.3. 体重変化	10
5.4. 剖検所見	10
6. 考察および結論	11
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事態および 試験計画書に従わなかつたこと	12

目次（続き）

頁

TABLES

1. Mortality - Female rats	13
2. Clinical observation - Incidence of signs in female rats	14
3. Body weight - Individual values in female rats	15
4. Necropsy - Incidence of macroscopic lesion in female rats	16

APPENDICES

1. Flow chart of acute toxic class method with a starting dose of 2000 mg/kg body weight	17
2. Mortality - Identification of scheduled or unscheduled death in female rats ..	18
3. Clinical observation - Individual data in female rats	19
4. Necropsy - Individual macroscopic lesions in female rats	20

1. 要約

ヒノキ葉粉末をSprague-Dawley系SPFラット（Crj:CD(SD)[IGS]）の雌に1回経口投与し、その急性経口毒性を検索した。限界試験として、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20 mL/kg、懸濁媒体には1%Tween80水溶液を用いた。

死亡：投与1回目および2回目ともに、死亡は認められなかった。

臨床症状：臨床症状は認められなかった。

体重：投与後7および14日において順調に増加していた。

剖検所見：観察期間終了時（投与後14日）に行った剖検において、異常は認められなかった。

投与後14日間の累積死亡率から、本被験物質のSprague-Dawley 系雌ラットにおける急性経口毒性は、GHSカテゴリー5に分類され、LD50値は2000 mg/kg以上であると推定された。

2. 試験目的

本試験はヒノキ葉粉末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 : ヒノキ葉粉末
 ロット番号: SFHI030519
 性 状 : 緑褐色粉末
 保存条件 室温

4. 試験方法

4.1. 供試動物

4.1.1. 供試動物および選定理由

日本チャールス・リバー株式会社（神奈川県）により生産されたSprague-Dawley系 SPFラット（Crj:CD(SD)[IGS]）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、かつ試験委託者の希望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
1回目	雌	7	160 – 190 g	5
2回目	雌	7	160 – 190 g	5

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 – 210 g）であった。

4.1.3. 飼化期間

7週齢にて購入後、動物を試験環境に7日間飼化した。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8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 ± 3°C、湿度50 ± 20%、換気回数10回以上/時間（オールフレッシュエア方式）、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114）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3匹以下とした。試験期間中の動物室の温度および湿度を連

続して監視した結果、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。

飼料には保証飼料MF固型 (Lot No. 030304 ; 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群分け

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。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、被験物質投与後はピクリン酸飽和70%エタノール溶液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 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± 20%を超えないことを確認して投与に用いた。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

試験委託者より提供された情報に基づいて、限界試験を実施した。投与用量、使用動物数および動物番号を以下に示す。

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

4.5. 投与液調製

乳鉢および乳棒を用いて微粉末化した被験物質を下記の所定量秤り取り、1%Tween80水溶液で20 mLにメスアップして懸濁して、投与液を調製した。投与容量は20 mL/kgとした。

投与群 (mg/kg 群)	被験物質懸濁量 (mg)	被験物質濃度 (mg/mL)
1回目	2000	100
2回目	2000	100

4.6. 観察および検査項目

4.6.1 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は少なくとも1日1回、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および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）に全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

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、2回目 (2000 mg/kg) 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だった。

5.2. 臨床症状 (Table 2, Appendix 3)

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回目および2回目（2000 mg/kg）とも死亡は認められなかった。

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。

投与後7および14日ともに順調な体重増加を示し、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。

投与後14日間の累積死亡率に基づき、本被験物質のSprague-Dawley系雌ラットにおける急性経口毒性は、GHSカテゴリー5に分類され、LD50値は2000 mg/kg以上であると推定された。

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った試験の信頼性に影響を及ぼす事態
および試験計画書からの逸脱は認められなかつた。

Table 1 Mortality - Female rats

Dose (mg/kg)	Step	Time after administration							Final mortality
		0.5	4 hrs	1	2	3	4	5	
2000	1st	0	0	0	0	0	0	0	0 / 3 ^a
2000	2nd	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.

(IET 03-0023)

Table 2 Clinical observation - Incidence of signs in female rats

Clinical sign	Dose (mg/kg)		2000		2000	
	Step	1st	fd	tk	2nd	
		Fate			fd	tk
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		(g)
				7	14	
2000	1st	101	177	219	238	
		102	184	224	244	
		103	172	212	221	
2000	2nd	104	184	224	240	
		105	169	198	210	
		106	173	204	227	

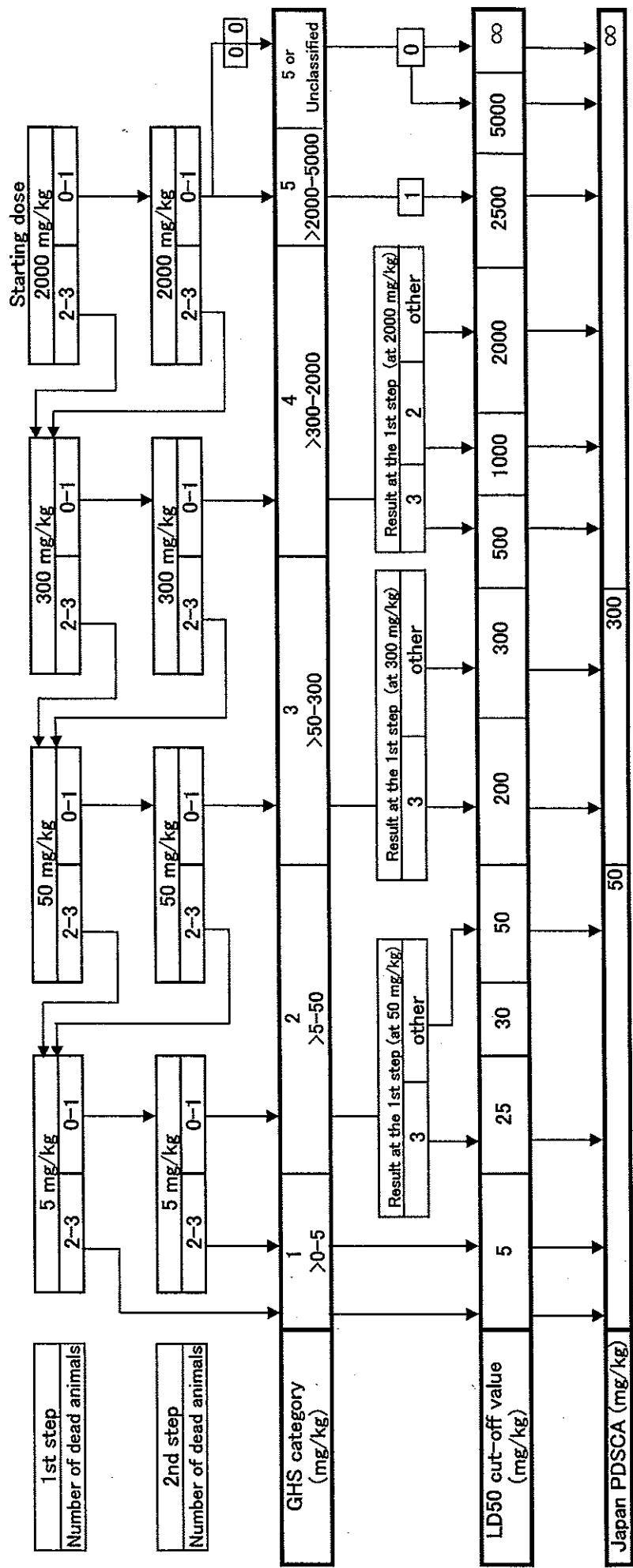
Table 4 Necropsy - Incidence of macroscopic lesion in female rats

Site and lesion	Dose (mg/kg)		2000		2000	
	Step	1st	1st		2nd	
		Fate	fd	tk	fd	tk
No. of animals examined		0	3	0	3	
No abnormalities detected		-	3	-	3	

No abnormalities detected

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	Time of signs noted	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.