

ヒノキ葉粉末のウサギにおける
眼刺激性試験
(試験番号 IET 03-0026)

最終報告書

2003 年 9 月 1 日

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： 上田 英夫

日付： 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

陳述書

試験名称：ヒノキ葉粉末のウサギにおける眼刺激性試験

本報告書の試験方法には当該試験で使用方法・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

毒性第一部動物管理室主任

上田 英夫



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 毅

毒性試験指針（ガイドライン）の適用

農林水産省（12 農産第 8147 号，2-1-5，2000 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，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 上田英夫

試験担当者

動物飼育管理，投与，観察： 中村達也
赤坂道明
逆井幸司

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
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. 観察	8
4.5. 眼刺激性の評価	9
5. 試験成績	10
5.1. 眼刺激性変化	10
5.2. 臨床症状	10
5.3. 体重	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. Summary of eye irritation scores - Group mean values -----	14
2. Scores of eye irritation - Individual values -----	15
3. Other ocular irritation changes -----	17
4. Clinical sign - Individual data -----	18
5. Body weight - Group mean and individual values -----	19
APPENDIX	
1. Scoring of eye irritation -----	20

1. 要約

ヒノキ葉粉末をニュージーランドホホワイト種の SPF 雌ウサギ 6 匹の眼に投与し、眼刺激性を評価した。眼刺激性試験は農林水産省の毒性試験指針 (12 農産第 8147 号, 2-1-5, 2000 年) に従い実施した。動物は、被験物質投与後洗眼しない群 (A 群) および 投与 30 秒後に洗眼する群 (B 群) の 2 群に分け、A および B 群とも 3 匹を用いた。

角膜の刺激性変化: 散在性またはび慢性の混濁 (角膜混濁程度 1) が A 群の 2 例に投与後 24 時間の観察で認められた。混濁の範囲は角膜全体の 1/2 以下であった。この角膜の混濁は、投与後 72 時間までに消失した。B 群では観察期間中に角膜の刺激性変化は認められなかった。

虹彩の刺激性変化: A および B 群では観察期間中に虹彩の刺激性変化は認められなかった。

結膜の発赤: 一部の血管が明らかに充血する程度の発赤 (発赤評点 1) が、A 群の全例および B 群の 1 例に投与後 1 時間の観察で認められた。この結膜の発赤は、A 群の 2 例では投与後 24 時間にび慢性の深紅色の紅斑 (発赤評点 2) に変化し、投与後 72 時間までにすべて消失した。B 群では投与後 24 時間までに消失した。

結膜の浮腫: 正常を超える腫脹 (結膜浮腫評点 1) が B 群の 1 例に、眼瞼の外反を伴った明らかな腫脹 (結膜浮腫評点 2) が A 群の全例に投与後 1 時間の観察で認められた。この結膜の浮腫は A 群では投与後 48 時間までに、B 群では投与後 24 時間までに消失した。

その他の眼刺激性変化: 眼瞼および眼瞼に接する被毛を湿潤する分泌物が、A 群の全例に投与後 1 時間の観察で認められた。この分泌物は投与後 48 時間までに消失した。B 群では観察期間中に分泌物は認められなかった。

以上の結果から、本被験物質はウサギの眼粘膜に対し軽度の刺激性があると判定した。また、投与 30 秒後の洗眼に明確な効果が認められた。

2. 試験目的

ヒノキ葉粉末の眼刺激性をウサギを用いて評価した。

3. 被験物質

名称： ヒノキ葉粉末
ロット番号： SFHI030519
外観： 緑褐色粉末
保管条件： 室温暗所

4. 試験方法

4.1. 供試動物

試験には、北山ラベス株式会社箕輪生産場において生産されたニュージーランドホワイト種の SPF 雌ウサギ (Kbl:NZW)を用いた。動物は 10 週齢にて購入し (入荷動物数:IET 03-0025 用動物を含め 12 匹, 入荷時体重範囲:1956 ~2197 g), 飼育環境に 11 日間検疫・馴化した。入荷時は触診を含む観察を行い, 検疫・馴化期間中はケージサイドから毎日動物を観察した。入荷時および入荷後 6 日に動物の体重を測定した。これらの検査で異常を示す個体は認められなかった。被験物質投与約 24 時間前にフルオレスセインおよびスリットランプを用いた眼検査により正常眼動物を選択し, 11 週齢で試験に供した。動物は, 被験物質投与後洗眼しない群(A群)および投与 30 秒後に洗眼する群(B群)の 2 群を設定し, A群では 3 匹 (動物番号 1~3), B群では 3 匹 (動物番号 4~6)を用いた。被験物質投与直前における動物の体重の平均値 (最小値~最大値) は 2501 g (2412~2709 g) であった。投与終了後余剰動物は当該試験より除外した。

4.2. 動物飼育管理

4.2.1. 飼育方法

温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55 \pm 15\%$, 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208) で動物を飼育した。動物飼育室の温度および湿度を毎日監視したが, 試験結果に影響を及ぼすと思われる異常値は認められなかった。

動物は, ステンレス鋼製ラックに収納した金網床付きアルミニウム製ケージ(350 W × 480 D × 300 H mm: トキワ科学器械株式会社) に 1 匹ずつ収容し, 飼育した。各ケージの前面には試験番号, 被験物質名, 試験の種類, 投与群および動物番号を明記したラベルを貼付した。

4.2.2. 飼料および飲料水

飼料には固型飼料 LRC4 (オリエンタル酵母工業株式会社) を用い, ステンレス鋼製給餌器 (トキワ科学器械株式会社) により自由に摂取させた。

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・殺菌した井戸水を用い、自動給水装置（トキワ科学器械株式会社）により自由に摂取させた。

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。

4.2.3. 動物の群分けおよび個体識別

入荷時に動物を生産業者にて識別された仮番号に従いケージに分配した。馴化期間終了時に試験供試動物の選定を行った後、ケージ番号の小さい順に各群に振り分けた。

供試動物の右耳介にフェルトペンにて動物番号を記入して個体を識別した。

4.3. 投与方法

4.3.1. 被験物質の調製および用量

被験物質を乳鉢および乳棒により微粉末化した後、1動物に対して 0.1 g を投与した。

4.3.2. 被験物質の投与方法

被験物質の投与は、左眼の下眼瞼粘膜面に行った。すなわち、左側の下眼瞼を穏やかに眼球から引き離し、その結膜囊内に被験物質を投与した。その後、被験物質の損失を防ぐために上下の眼瞼を 1 秒間閉じあわせた。なお、B 群における洗眼は投与 30 秒後に、30 秒間微温湯にて行った。いずれの群も右眼を無処置対照眼とした。

4.4. 観察

4.4.1. 観察期間

観察は投与後 1, 24, 48 および 72 時間に行った。刺激性変化が消失したため観察を投与後 72 時間で終了した。

4.4.2. 刺激性変化の採点方法

角膜、虹彩および結膜の被験物質による刺激性変化をスリットランプを用いて観察した。採点は農林水産省の指針に従った(Appendix 1 参照)。

また、角膜の混濁の範囲 (=A) を以下の基準に従って採点した。

	評点
A = 0	0
$0 < A \leq 1/4$	1
$1/4 < A \leq 1/2$	2
$1/2 < A \leq 3/4$	3
$3/4 < A \leq 1$	4

4.4.3. 臨床症状

全動物について被験物質投与日から観察期間終了日まで少なくとも 1日1回ケージの外から観察した。

4.4.4. 体重測定

すべての動物について、被験物質の投与開始直前および観察期間終了時に体重を測定した。

4.5. 眼刺激性の評価

眼刺激性の評価は(a)刺激性反応の種類, (b)反応の強さ, (c)反応が可逆性または非可逆性であるか, (d)反応がみられた動物の割合, を総合的に評価した。以下に示す基準を判断の参考とした。

- * 無刺激性：全観察期間を通じ陽性の刺激性変化が認められない。
- * 軽度の刺激性：角膜の混濁が認められず, その他の陽性の刺激性変化は投与後 7 日以内に消失する。
- * 中等度の刺激性：角膜の混濁が投与後 7 日以内に消失するが, その他の陽性の刺激性変化は 7 日目も持続している。
- * 重度の刺激性：角膜の混濁が 7 日目以内に消失しない。高度の刺激性変化が認められる。または, 非可逆性の刺激性が認められる。

5. 試験成績

眼刺激性変化の投与群別の評点の平均値を Table 1 に、その個体別成績を Table 2 に、その他の眼刺激性変化を Table 3 に示す。各動物の臨床症状は Table 4 に、体重は Table 5 に示す。

5.1. 眼刺激性変化 (Tables 1 - 3)

5.1.1. 角膜の刺激性変化

散在性またはび漫性の混濁（角膜混濁程度 1）が A 群の 2 例に投与後 24 時間の観察で認められた。混濁の範囲は角膜全体の 1/2 以下であった。この角膜の混濁は、投与後 72 時間までに消失した。B 群では観察期間中に角膜の刺激性変化は認められなかった。

5.1.2. 虹彩の刺激性変化

A および B 群では観察期間中に虹彩の刺激性変化は認められなかった。

5.1.3. 結膜の発赤

一部の血管が明らかに充血する程度の発赤（発赤評点 1）が、A 群の全例および B 群の 1 例に投与後 1 時間の観察で認められた。この結膜の発赤は、A 群の 2 例では投与後 24 時間にび漫性の深紅色の紅斑（発赤評点 2）に変化し、投与後 72 時間までにすべて消失した。B 群では投与後 24 時間までに消失した。

5.1.4. 結膜の浮腫

正常を超える腫脹（結膜浮腫評点 1）が B 群の 1 例に、眼瞼の外反を伴った明らかな腫脹（結膜浮腫評点 2）が A 群の全例に投与後 1 時間の観察で認められた。この結膜の浮腫は A 群では投与後 48 時間までに、B 群では投与後 24 時間までに消失した。

5.1.5. その他の眼刺激性変化

眼瞼および眼瞼に接する被毛を湿潤する分泌物が、A 群の全例に投与後 1 時間の観察で認められた。この分泌物は投与後 48 時間までに消失した。B 群では観察期間中に分泌物は認められなかった。

5.2. 臨床症状 (Table 4)

A および B 群では投与後 72 時間までの臨床症状の観察で、被験物質投与によると思われる異常は認められなかった。

5.3. 体重 (Table 5)

投与後 72 時間 (観察期間終了時)において、すべての動物で被験物質投与直前と比べて体重が増加していた。

6. 考察および結論

非洗眼群（A群）では、角膜および結膜において刺激性変化が認められた。その程度は角膜混濁評点 1, 結膜発赤評点 1 ないし 2, 結膜浮腫評点 2 であった。被験物質投与に関連するその他の眼刺激性変化として眼瞼および眼瞼に接する被毛を湿潤する分泌物が認められた。これら刺激性変化の程度は軽度であり投与後 72 時間までにすべて消失したことから、本被験物質は軽度の刺激性があると判定した。

投与 30 秒後に洗眼する群（B群）では結膜にのみ刺激性変化が認められ、その程度は結膜発赤評点 1, 結膜浮腫評点 1 であった。これらの刺激性変化は投与後 24 時間までにすべて消失した。A群で観察された角膜の刺激性変化および眼瞼および眼瞼に接する被毛を湿潤する分泌物は認められなかった。洗眼群における結膜の刺激性変化は非洗眼群のそれと比べ程度が軽く、発現期間も短かったことより、投与 30 秒後の洗眼に明確な効果があると判断した。

以上のことから、本被験物質はウサギの眼粘膜に対し軽度の刺激性があると判定した。また、投与 30 秒後の洗眼に明確な効果が認められた。

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疑いのある事態および試験計画書に従わなかったこと

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った。

Table 1 Summary of eye irritation scores - Group mean values

Group	N	Ocular site	Ocular lesion	Time after application				
				1	24	48	72	hr
A (Eyes unirrigated)	3	Cornea	Opacity	0	0.7	0.3	0	
		Iris		0	0	0	0	
		Conjunc-	Redness	1.0	1.7	0.7	0	
		tivae	Chemosis	2.0	1.7	0	0	
B (Eyes irrigated 30 seconds after application)	3	Cornea	Opacity	0	0	0	0	
		Iris		0	0	0	0	
		Conjunc-	Redness	0.3	0	0	0	
		tivae	Chemosis	0.3	0	0	0	

N: Number of animals examined.

Table 2-1 Scores of eye irritation - Individual values

Group	Animal number	Ocular site ^{a)}	Time after application				
			1	24	48	72 hr	
A (Eyes un- irrigated)	1	Cornea	0	1	0	0	
		Opacity					
		Area ^{b)}	0	2	0	0	
			0	0	0	0	
	2	Iris					
		Conjunctivae	1	2	1	0	
		Redness					
		Chemosis	2	2	0	0	
	3	Cornea	0	1	1	0	
		Opacity					
		Area	0	2	1	0	
			0	0	0	0	
	1	Iris					
		Conjunctivae	1	2	1	0	
		Redness					
		Chemosis	2	2	0	0	
	2	Cornea	0	0	0	0	
		Opacity					
		Area	0	0	0	0	
			0	0	0	0	
	3	Iris					
		Conjunctivae	1	1	0	0	
		Redness					
		Chemosis	2	1	0	0	

a):See Appendix 1.

b):Opacity area:

	score
Zero	0
One quarter (or less), but not zero	1
Greater than one quarter, but less than half	2
Greater than half, but less than three quarters	3
Greater than three quarters, up to whole area	4

Table 2-2 Scores of eye irritation - Individual values

Group	Animal number	Ocular site ^{a)}	Time after application				
			1	24	48	72 hr	
B	4	Cornea	Opacity	0	0	0	0
		Iris Conjunctivae	Area ^{b)}	0	0	0	0
			Redness	0	0	0	0
			Chemosis	0	0	0	0
(Eyes irrigated 30 seconds after application)	5	Cornea	Opacity	0	0	0	0
		Iris Conjunctivae	Area	0	0	0	0
			Redness	1	0	0	0
			Chemosis	1	0	0	0
	6	Cornea	Opacity	0	0	0	0
		Iris Conjunctivae	Area	0	0	0	0
			Redness	0	0	0	0
			Chemosis	0	0	0	0

a): See Appendix 1.

b): Opacity area:

	score
Zero	0
One quarter (or less), but not zero	1
Greater than one quarter, but less than half	2
Greater than half, but less than three quarters	3
Greater than three quarters, up to whole area	4

Table 3 Other ocular irritation changes

Group	Animal number	Time after application			
		1	24	48	72 hr
A (Eyes unirrigated)	1	D	D	-	-
	2	D	D	-	-
	3	D	-	-	-
B (Eyes irrigated 30 seconds after application)	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
	6	-	-	-	-

D: Discharge with moistening of the lids and hairs, just adjacent to lids.

Table 4 Clinical sign - Individual data

Group	Animal number	Day after application			
		0	1	2	3
A (Eyes unirrigated)	1	N	N	N	N
	2	N	N	N	N
	3	N	N	N	N
B (Eyes irrigated 30 seconds after application)	4	N	N	N	N
	5	N	N	N	N
	6	N	N	N	N

N: No abnormalities detected.

Table 5 Body weight - Group mean and individual values

Group	Animal number	Body weight (g)	
		Before application	At the final observation
A (Eyes unirrigated)	1	2709	2802
	2	2433	2542
	3	2572	2634
	Mean	2571	2659
	S.D.	138	132
	4	2434	2552
B (Eyes irrigated 30 seconds after application)	5	2412	2453
	6	2445	2543
	Mean	2430	2516
	S.D.	17	55

S.D.: Standard deviation.

Appendix 1 Scoring of eye irritation

I Cornea		Score
(i) Opacity - degree of density (area most dense taken for reading)		
No ulceration or opacity	0	
Scattered or diffuse areas of opacity (other than slight dulling of normal luster), details of iris clearly visible	1	
Easily discernible translucent area, details of iris slightly obscured	2	
Nacreous area, no details of iris visible, size of pupil barely discernible	3	
Opaque cornea, iris not discernible through the opacity	4	
II Iris		
Normal	0	
Markedly deepened rugae, congestion, swelling, moderate circumcorneal hyperemia, or injection, any of these or combination of any thereof, iris still reacting to light (sluggish reaction is positive)	1	
No reaction to light, hemorrhage, gross destruction (any or all of these)	2	
III Conjunctivae		
(i) Redness (refers to palpebral and bulbar conjunctivae, excluding cornea and iris)		
Blood vessels normal	0	
Some blood vessels definitely hyperemic (injected)	1	
Diffuse, crimson color, individual vessels not easily discernible	2	
Diffuse beefy red	3	
(ii) Chemosis - lids and/or nictitating membranes		
No swelling	0	
Any swelling above normal (includes nictitating membranes)	1	
Obvious swelling with partial eversion of lids	2	
Swelling with lids about half closed	3	
Swelling with lids more than half closed	4	