

ヒノキ葉粉末のラットにおける 急性経皮毒性試験

(試験番号 IET 03-0024)

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 1/26 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 忍司

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皮毒性試験

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

毒性第二部免疫毒性研究室長

小坂 忠司



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

毒性試験指針の適用

農林水産省 (12 農産第 8147 号 2-1-2, 2000 年)
米国環境保護庁 (Health Effects Test Guidelines OPPTS, 870.1200, 1998 年)
経済協力開発機構 (OECD Guideline No. 402, 1987 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

被験物質調製, 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 田島由香里 林豊 林宏一 首藤康文

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	9
4.5. 被験物質調製	9
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ったこと	12

目次 (続き)

頁

TABLES

1. Mortality - Male rats	13
2. Mortality - Female rats	14
3. Clinical observation - Incidence of signs in male rats	15
4. Clinical observation - Incidence of signs in female rats	16
5. Body weight - Individual values in male rats	17
6. Body weight - Individual values in female rats	18
7. Necropsy - Incidence of macroscopic lesion in male rats	19
8. Necropsy - Incidence of macroscopic lesion in female rats	20

APPENDICES

1. Mortality - Identification of scheduled or unscheduled death in male rats ----	21
2. Mortality - Identification of scheduled or unscheduled death in female rats --	22
3. Clinical observation - Individual data in male rats	23
4. Clinical observation - Individual data in female rats	24
5. Necropsy - Individual macroscopic lesions in male rats	25
6. Necropsy - Individual macroscopic lesions in female rats	26

1. 要約

ヒノキ葉粉末をSprague-Dawley系SPFラット (Crj:CD (SD) [IGS]) に1回経皮投与し、その急性経皮毒性を検索した。限界試験として、雌雄各5匹の動物に2000 mg/kgの用量を投与した。

死亡：雌雄ともに死亡は認められなかった。

臨床症状：雌雄ともに臨床症状は認められなかった。

体重：雌雄ともに投与後7および14日において順調に増加していた。

剖検所見：雌雄ともに観察期間終了時（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系ラットにおける急性経皮毒性試験の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における急性経皮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]）の雌雄を用いた。ラットは急性経皮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
雄	7	230 – 260 g	7
雌	7	160 – 190 g	7

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（140–210 g）であった。

4.1.3. 馴化期間

雌雄とも7週齢にて購入後、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

雌雄ともに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 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ，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，馴化期間中は同性の動物を5匹以下，投与前日の剪毛終了後は個体別とした。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。馴化期間中のケージ内における動物の個体識別は、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)

被験物質投与後の各用量群内での個体識別は、ピクリン酸飽和 70%エタノール溶液を用いて以下のように被毛の一部を染色することで行った。

No. 1 右前肢 No. 2 左前肢 No. 3 両前肢
No. 4 右後肢 No. 5 無染色

投与に使用する動物は、雄については、投与直前の体重測定において、すべての動物がガイドラインに示されている体重範囲 (200–300g) を超過していたため、より300gに近い動物を優先して試験に使用した。雌については、投与直前の体重測定において、ガイドラインに示されている体重範囲内の動物が使用動物数と同数であったため、それらを優先して試験に用いた。また、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。余剰動物は試験より除外した。

4.3. 投与方法

投与24時間以上前に供試動物の背部中央を電気バリカンを用いて剪毛した。投与当日には、粘着テープ上にのせた 4 cm×5 cm (体表面積の約10%) のパッド (三共MS®パッド-K; 三共株式会社, 東京都) を0.5 mLの脱イオン水で湿らせた上に、所定量の被験物質を均一に載せ、この面を投与区画に当てて固定した。さらに動物の胴体を閉塞性サージカルテープ (Transpore®; 3M Co., Minn, USA) で巻き、被験物質に24時間暴露した。貼付除去後、投与区画に残存する被験物質は微温湯を用いてできる限り除去した。

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。

用量群 (mg/kg)	使用動物数（動物番号）	
	雄	雌
2000	5 (1-5)	5 (101-105)

4.5. 被験物質調製

被験物質はそのまま投与に用いた。

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1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、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

死亡率からLD50値の範囲を決定した。

5. 試験成績

5.1. 死亡率 (Tables 1 and 2, Appendices 1 and 2)

雌雄ともに死亡は認められなかった。

死亡率は、雄0/5 雌0/5だった。

5.2. 臨床症状 (Tables 3 and 4, Appendices 3 and 4)

雌雄ともに臨床症状は認められなかった。

5.3. 体重変化 (Tables 5 and 6)

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 (Tables 7 and 8, Appendices 5 and 6)

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

6. 考察および結論

雌雄ともに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、雌雄ともに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、雌雄ともに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系ラットにおける急性経皮毒性試験のLD50値は、雌雄ともに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ったこと

試験期間を通じて、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からの逸脱は認められなかった。

Table 1 Mortality - Male rats

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

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

Table 2 Mortality - Female rats

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

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

Table 3 Clinical observation - Incidence of signs in male rats

Clinical sign	Dose (mg/kg)	
	2000	
	fd	tk
No. of animals examined	0	5

No abnormalities detected

5

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

Table 4 Clinical observation - Incidence of signs in female rats

Clinical sign	Dose (mg/kg)	
	2000	
	fd	tk
No. of animals examined	0	5
No abnormalities detected	-	5
Fate: fd, found dead; tk, terminal kill.		

Table 5 Body weight - Individual values in male rats

Dose (mg/kg)	Animal number	Before administration	Days after administration	
			7	14
2000	1	312	365	408
	2	315	386	452
	3	309	358	403
	4	301	327	373
	5	309	366	410
	Mean	309	360	409
	S.D.	5	21	28

S.D.: Standard deviation

Table 6 Body weight - Individual values in female rats

Dose (mg/kg)	Animal number	Before administration	Days after administration	
			7	14
2000	101	220	238	248
	102	207	221	236
	103	205	231	255
	104	203	230	250
	105	218	238	259
	Mean	211	232	250
	S.D.	8	7	9

S.D.: Standard deviation

Table 7 Necropsy - Incidence of macroscopic lesion in male rats

Site and lesion	Dose (mg/kg)	
	2000	
	fd	tk
No. of animals examined	0	5

No abnormalities detected

- 5

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

Table 8 Necropsy - Incidence of macroscopic lesion in female rats

Site and lesion	Dose (mg/kg)	
	2000	
	Fate	tk
No. of animals examined	fd	tk
	0	5

No abnormalities detected

- 5

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

Appendix 1 Mortality - Identification of scheduled or unscheduled death in male rats

Dose (mg/kg)	Time after administration		1	2	3	4	5	6	7	8-13	14 days
	1	4 hrs									
2000											(1), (2)
											(3), (4)
											(5)

(n): Scheduled death.

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

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

(n): Scheduled death.

Appendix 3 Clinical observation - Individual data in male rats

					Dose	2000	mg/kg
Animal number	Fate	Time of death	Time of signs noted	Clinical signs			
1	tk	14d		No abnormalities detected			
2	tk	14d		No abnormalities detected			
3	tk	14d		No abnormalities detected			
4	tk	14d		No abnormalities detected			
5	tk	14d		No abnormalities detected			

Fate: tk, terminal kill.

Time: d, days.

Appendix 4 Clinical observation - Individual data in female rats

<u>Dose 2000 mg/kg</u>				
Animal number	Fate	Time of death	Time of signs noted	Clinical signs
101	tk	14d		No abnormalities detected
102	tk	14d		No abnormalities detected
103	tk	14d		No abnormalities detected
104	tk	14d		No abnormalities detected
105	tk	14d		No abnormalities detected

Fate: tk, terminal kill.

Time: d, days.

Appendix 5 Necropsy - Individual macroscopic lesions in male rats

				Dose	2000	mg/kg
Animal number	Fate	Time of death	Macroscopic lesions			
1	tk	14d	No abnormalities detected			
2	tk	14d	No abnormalities detected			
3	tk	14d	No abnormalities detected			
4	tk	14d	No abnormalities detected			
5	tk	14d	No abnormalities detected			

Fate: tk, terminal kill.

Time: d, days.

Appendix 6 Necropsy - Individual macroscopic lesions in female rats

				<u>Dose</u>	<u>2000</u>	<u>mg/kg</u>
<u>Animal</u> <u>number</u>	<u>Fate</u>	<u>Time of</u> <u>death</u>	<u>Macroscopic lesions</u>			
101	tk	14d	No abnormalities detected			
102	tk	14d	No abnormalities detected			
103	tk	14d	No abnormalities detected			
104	tk	14d	No abnormalities detected			
105	tk	14d	No abnormalities detected			

Fate: tk, terminal kill.

Time: d, days.