

ヒノキ葉粉末のウサギにおける
皮膚刺激性試験
(試験番号 IET 03-0025)

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皮膚刺激性試験

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，2-1-4，2000 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. 皮膚刺激性の評価	9
5. 試験成績	10
5.1. 皮膚刺激性変化	10
5.2. 臨床症状	10
5.3. 体重	10
6. 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疑いのある 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. Summary of dermal irritation scores	13
2. Scores for erythema and eschar formation - Individual values	14
3. Scores for edema - Individual values	15
4. Clinical sign - Individual data	16
5. Body weight - Group mean and individual values	17
APPENDIX	
1. Scoring of dermal irritation	18

1. 要約

ヒノキ葉粉末をニュージーランドホワイ種 SPF 雌ウサギ 3 匹の皮膚に投与し、皮膚刺激性を評価した。皮膚刺激性試験は農林水産省の毒性試験指針 (12 農産第 8147 号, 2-1-4, 2000 年) に従い実施した。

被験物質投与区および陰性対照区の皮膚には、パッチ除去後 1, 24, 48 および 72 時間のいずれの観察においても、紅斑、痂皮形成、浮腫およびその他の刺激性変化は認められなかった。

これらの結果から、4 時間の皮膚暴露において本被験物質はウサギの皮膚に対し無刺激性であると判定した。

2. 試験目的

ヒノキ葉粉末の皮膚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 03-0026 用動物を含め 12 匹, 入荷時体重範囲: 1956 ~ 2197 g), 飼育環境に 7 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 5 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。被験物質投与直前に正常な皮膚を持つ動物を 3 匹選択し, 11 週齢で試験に供した。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 2456 g (2383~2572 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. 動物の個体識別

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0.5gを投与した。

4.3.2. 被験物質の投与方法

投与の約24時間前に、供試動物全例の背側部被毛を電気バリカンおよびカミソリにて剪毛・剃毛した。動物の背側部に2.54cm平方の区画(約6cm²)を2ヶ所設けた。1ヶ所は被験物質投与区とし、残り1ヶ所は被験物質を投与しない陰性対照区とした。

被験物質投与区の皮膚に被験物質を直接投与し、その上に脱イオン水0.5mlで湿らせたガーゼパッチ(2.5 × 2.5cm;日本薬局方タイプI)を当てた。陰性対照区画には被験物質を用いず被験物質投与区と同様の貼付処置を行った。

さらに、その上をリント布およびサージカルテープ(Transpore®, 3M Co., USA)を用いて半閉塞貼付した。

被験物質は皮膚と4時間接触させた後、半閉塞貼付物を除去し、皮膚反応に影響を及ぼさないように脱イオン水で洗い流して取り除いた。

4.4. 観察

4.4.1. 観察期間

観察はパッチ除去後1, 24, 48および72時間に行った。パッチ除去後72時間の観察で刺激性変化が認められなかったため、この時点で観察を終了した。

4.4.2. 刺激性変化の採点方法

紅斑・痂皮形成および浮腫の程度は、農林水産省の指針に従い採点した(Appendix 1 参照)。

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. 皮膚刺激性の評価

皮膚刺激性の強さは、観察された反応の質および可逆性または非可逆性を関連させ、観察された反応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：非常に軽度の刺激性変化はみられるものの、72 時間目には全て回復している。
- * 中等度の刺激性：72 時間目以内の観察で軽度あるいは中等度の刺激性変化が認められる。
- * 重度の刺激性：72 時間目以内の観察で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

皮膚刺激性変化の評点のまとめを Table 1 に、その個体別成績を Table 2 および 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. 皮膚刺激性変化 (Tables 1 - 3)

被験物質投与区の皮膚には、パッチ除去後 1, 24, 48 および 72 時間のいずれの観察においても紅斑、痂皮形成、浮腫およびその他の刺激性変化は認められなかった。陰性対照区の皮膚には、パッチ除去後 1, 24, 48 および 72 時間のいずれの観察においても紅斑、痂皮形成、浮腫およびその他の刺激性変化は認められなかった。

5.2. 臨床症状 (Table 4)

試験に用いたすべての動物において観察期間を通して異常は観察されなかった。

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. 結論

本試験成績から、4 時間の皮膚暴露において、本被験物質はウサギの皮膚に対し無刺激性であると判定した。

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

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 dermal irritation scores

Sites	N ^a	Skin reactions	Mean scores of skin reaction at:			
			1	24	48	72 hr ^b
Control	3	Erythema/ Eschar	0	0	0	0
		Edema	0	0	0	0
Treated	3	Erythema/ Eschar	0	0	0	0
		Edema	0	0	0	0

a: Number of animals examined.

b: Time after removal of the patch.

Table 2 Scores for erythema and eschar formation - Individual values

Animal number	Site ^a	Scores of skin reaction at:			
		1	24	48	72 hr ^b
1	(A)	0	0	0	0
	(B)	0	0	0	0
2	(A)	0	0	0	0
	(B)	0	0	0	0
3	(A)	0	0	0	0
	(B)	0	0	0	0
Mean	(A)	0	0	0	0
	(B)	0	0	0	0

a: (A), Control site; (B), Treated site.

b: Time after removal of the patch.

Table 3 Scores for edema - Individual values

Animal number	Site ^a	Scores of skin reaction at:			
		1	24	48	72 hr ^b
1	(A)	0	0	0	0
	(B)	0	0	0	0
2	(A)	0	0	0	0
	(B)	0	0	0	0
3	(A)	0	0	0	0
	(B)	0	0	0	0
Mean	(A)	0	0	0	0
	(B)	0	0	0	0

a: (A), Control site; (B), Treated site.

b: Time after removal of the patch.

Table 4 Clinical sign - Individual data

Animal number	Sign at:			
	0	1	2	3 ^a
1	NAD	NAD	NAD	NAD
2	NAD	NAD	NAD	NAD
3	NAD	NAD	NAD	NAD

a: Day after application.

NAD: No abnormalities detected.

Table 5 Body weight - Group mean and individual values

Animal number	Body weight (g)	
	Before application	At the final observation
1	2572	2614
2	2413	2479
3	2383	2475
Mean	2456	2523
S.D.	102	79

S.D.: Standard deviation.

Appendix 1 Scoring of dermal irritation

<u>Erythema and Eschar Formation</u>	Score
No erythema	0
Very slight erythema (barely perceptible)	1
Well defined erythema	2
Moderate to severe erythema	3
Severe erythema (beet redness) to slight eschar formation (injuries in depth)	4

Edema

No edema	0
Very slight edema (barely perceptible)	1
Slight edema (edges of area well defined by definite raising)	2
Moderate edema (raised approximately 1 mm)	3
Severe edema (raised more than 1 mm and extending beyond area of exposure)	4