

## 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。