

3 安全性に関する資料の概要

(1) 葉害

播種作物への影響を検討するため実施した試験において、播種後処理を行った「はつかだいこん」に対して 1000g/m²以上で苗立ち数の減少が認められた。

(2) 人畜に対する安全性

①急性経口毒性試験

ラットにおける急性経口毒性試験（資料No.4）

試験機関：（財）残留農薬研究所

GLP試験省略

理由：GLP試験では、対象となる製品の成分及び濃度が保証されていることが前提条件となるが、ヒノキ葉は漢方薬のように複数の天然物質が絡み合っていて発揮される効果であると推測されるため、成分や濃度を保証することができない。そのため、GLP試験を行うことができないが、GLP基準に適合した試験施設で実施すること及び試験に供試した試験体を保存しておくことにより、GLPに準拠したと考えられる。

報告書作成年：2003年

公表の有無：なし

検体：ヒノキ葉粉末、ロット番号SFHI030519

供試動物：Sprague-Dawley系SPFラット、8週齢、体重：雌169～184g、一群6匹

観察期間：14日間

投与方法：投与前日の夕方より投与3時間後まで絶食させた。微粉末化した被験物質を1%Tween80水溶液に懸濁し投与液を調製し、経口投与した。

観察・検査項目：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には少なくとも1日1回、臨床症状の観察を行い、体重は投与直前、投与後7および14日に測定した。観察期間終了時（投与14日後）に、組織の肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌 2000 mg/kg以上
死亡開始時間及び終了時間	死亡せず
症状発現時間及び消失時間	臨床症状は認められず
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)※2	2000
死亡例の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	2000

剖検所見では、主要な組織器官に特記すべき変化は認められなかった。

② 変異原性試験

データなし

理由：（財）残留農薬研究所及び旧農薬検査所に相談したが、粉末での使用を想定しているが、溶解しないため、培地内での挙動や変化が予測できず、物理的に試験を実施できない。また、文献検索を行ったが、該当文献は無かった。文献検索には、JSTのJDream II を用いた。

③ 90日間反復経口投与毒性試験

データなし

理由：○（財）残留農薬研究所及び旧農薬検査所に相談したが、粉末での使用を想定しているため、物理的に試験を実施することができないとの回答。
○施用された資材は土壌と固着するため栽培植物に付着する可能性は低いため。
○人間は、刺身の飾り葉としてヒノキを利用、また鹿はヒノキ葉を食料としており、人畜に対する安全性は高いと考えられるため。
○ヒノキの枝葉が大量に堆積されているヒノキ林地付近の住民、動物等に問題が発生しているとの報告がないため。
○本剤の原料が人の生活圏に広く普遍的に存在しているものであるため。
○なお、文献検索を行ったが、該当文献は無かった。文献検索には、JSTのJDre

am II を用いた。

④ 暴露評価に係る試験

ラットにおける急性経皮毒性試験（資料No.5）

試験機関：（財）残留農薬研究所

GLP試験省略

理由：GLP試験では、対象となる製品の成分及び濃度が保証されていることが前提条件となるが、ヒノキ葉は漢方薬のように複数の天然物質が絡み合っていて発揮される効果であると推測されるため、成分や濃度を保証することができない。そのため、GLP試験を行うことができないが、GLP基準に適合した試験施設で実施すること及び試験に供試した試験体を保存しておくことにより、GLPに準拠したと考えられる。

報告書作成年：2003年

公表の有無：なし

検体：ヒノキ葉粉末、ロット番号SFHI030519

供試動物：Sprague-Dawley系SPFラット、8週齢、体重：雄301～315g、雌203～220g、一群雌雄5匹

観察期間：14日間

投与方法：投与24時間以上前に供試動物の背部中央を剪毛した。投与当日に、粘着テープ上のパッドを脱イオン水で湿らせ、その上に被験物質を均一に載せた、この面を投与区画に当てて固定した。

観察・検査項目：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、臨床症状の観察を行い、体重は投与直前、投与後7および14日に測定した。観察期間終了時（投与14日後）に、組織の肉眼的病理検査を行った。

結 果 :

投 与 方 法	貼 付
投 与 量 (mg/kg)	2 0 0 0
LD ₅₀ (mg/kg)	雄 2 0 0 0 以上 雌 2 0 0 0 以上
死亡開始時間及び終了時間	死亡せず
症状発現時間及び消失時間	臨床症状は認められず
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2 0 0 0
死亡例の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	2 0 0 0

ウサギにおける皮膚刺激性試験 (資料No.6)

試験機関：(財) 残留農薬研究所

GLP試験省略

理由：GLP試験では、対象となる製品の成分及び濃度が保証されていることが前提条件となるが、ヒノキ葉は漢方薬のように複数の天然物質が絡み合っていて発揮される効果であると推測されるため、成分や濃度を保証することができない。そのため、GLP試験を行うことができないが、GLP基準に適合した試験施設で実施すること及び試験に供試した試験体を保存しておくことにより、GLPに準拠したと考えられる。

報告書作成年：2 0 0 3 年

公表の有無：なし

検体：ヒノキ葉粉末、ロット番号SFHI030519

供試動物：ニュージーランドホワイト種SPFウサギ、11週齢、体重：雌2383～2572 g、一群雌3匹

観察期間：72時間

投与方法：投与24時間前に供試動物の背側部を剪毛・剃毛した。皮膚に被験物質を直接投与し、その上に脱イオン水で湿らせたガーゼパッチを当てた。

観察・検査項目：パッチ除去後1、24、48および72時間後に、刺激性の変化の観察を行った。投与日から観察期間終了まで少なくとも1日1回、臨床症状の観察を行い、体重は投与直前および観察期間終了時に測定した。

結果：

投与方法	直接投与
投与量 (g)	0.5
皮膚刺激性変化	認められず
臨床症状	認められず
体重	全てで増加

モルモットにおける皮膚感作性試験（資料No.7）

試験機関：（財）残留農薬研究所

GLP試験省略

理由：GLP試験では、対象となる製品の成分及び濃度が保証されていることが前提条件となるが、ヒノキ葉は漢方薬のように複数の天然物質が絡み合っていて発揮される効果であると推測されるため、成分や濃度を保証することができない。そのため、GLP試験を行うことができないが、GLP基準に適合した試験施設で実施すること及び試験に供試した試験体を保存しておくことにより、GLPに準拠したと考えられる。

報告書作成年：2003年

公表の有無：なし

検体：ヒノキ葉粉末、ロット番号SFHI030519

供試動物：ハートレイ系SPFモルモット、6週齢、体重：雌340～408g、一群雌5匹

観察期間：6時間～30日間

投与方法：感作経皮試験として、投与前日に左肩甲部被毛を剪毛・剃毛した。脱イオン水で

調製した25%被験物質薬液をリント布パッチに滴下し、この面を投与部位の皮膚に当てた。貼付物は、6時間後に除去した。第2回貼付として、第1回貼付後7日に、同じ部位に第1回と同様な処置を行った。第3回添付として、第1回貼付後14日に、同じ部位に第1回と同様な処置を行った。惹起経皮試験として、第1回感作経皮試験後28日の前日に、左右側腹部の被毛を剪毛・剃毛した。処置は第1回と同様とした。

観察・検査項目：惹起における皮膚反応については、惹起経皮貼付後24および48時間に肉眼的に観察を行った。感作における皮膚反応については、第1回投与後1、8、15日に肉眼的に観察を行った。第1回感作経皮貼付日から惹起経皮貼付除去後48時間の観察終了日まで少なくとも1日1回臨床観察を行った。第1回感作経皮貼付日から惹起経皮貼付除去後48時間の観察終了日に体重を測定した。

結果：

投与方法	貼付
投与量 (ml)	0.2
皮膚感作率 (%)	0
皮膚反応強度	0
感作による皮膚反応	0
臨床症状	認められず
体重	全てで増加

ウサギにおける目刺激性試験（資料No.8）

試験機関：（財）残留農薬研究所

GLP試験省略

理由：GLP試験では、対象となる製品の成分及び濃度が保証されていることが前提条件となるが、ヒノキ葉は漢方薬のように複数の天然物質が絡み合っていて発揮される効果であると推測されるため、成分や濃度を保証することができない。そのため、GLP試験を行うことができないが、GLP基準に適合した試験施設で実施すること及び試験に供試した試験体を保存しておくことにより、GLPに準拠したと考えられる。

報告書作成年：2003年

公表の有無：なし

検体：ヒノキ葉粉末、ロット番号SFHI030519

供試動物：ニュージーランドホワイト種SPFウサギ、11週齢、体重：雌2412～2709g、一群雌3匹

観察期間：72時間

投与方法：微粉末化した被験物質を、左眼の下眼瞼粘膜面に投与した後、上下の眼瞼を1秒間閉じあわせた。A群では、投与後洗眼を行わず、B群では投与30秒後に30秒間微温湯で洗眼を行った。いずれの場合も、右眼を無処置対照眼とした。

観察・検査項目：投与後1、24、48および72時間に刺激性の観察を行った。投与日から観察期間終了まで少なくとも1日1回、臨床症状の観察を行い、体重は投与直前および観察期間終了時に測定した。

結果：

投与方法	貼付
投与量 (g)	0.1
角膜の刺激性	A群：軽度 B群：洗眼に効果あり
臨床症状	認められず
体重	全てで増加

作物残留及び環境残留に関する試験

データなし

理由：（財）残留農薬研究所及び旧農薬検査所に相談したところ、ヒノキ葉は漢方薬のように複数の天然物質が絡み合って発揮される効果であると推測されることから、主成分及びピペリトール以外の物質が同定されていない現時点では、土壌及び水中での挙動や変化が予測できず、物理的に試験を実施できないとの回答を得た。また、文献検索を行ったが、該当文献は無かった。文献検索には、JSTのJDream II を用いた。

⑤ 評価対象資材に含まれる物質の構造活性

調査機関：住友林業(株)筑波研究所

調査方法：JST（科学技術振興機構）が提供している科学文献情報検索データベース（JDream II）によりヒノキ葉に含まれる物質の構造活性を検索

報告書作成年：報告書なし

調査結果：活性に関する文献はなかった

関係文献の有無：なし

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



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 2-1-1, 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つ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. 馴化期間

7週齢にて購入後、動物を試験環境に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

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 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ，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一方式），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）に收容した。1ケージに收容する動物数は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 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 $\pm 20\%$ 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

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
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	2000	100
2 回目	2000	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

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 Mortality - Female rats

Dose (mg/kg)	Step	Time after administration										Final mortality			
		0.5	4 hrs	1	2	3	4	5	6	7	8-14 days				
2000	1st	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3 ^a
2000	2nd	0	0	0	0	0	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.

Table 2 Clinical observation - Incidence of signs in female rats

Clinical sign	Dose (mg/kg)			
	2000		2000	
	1st	tk	2nd	tk
Fate	fd	tk	fd	tk
No. of animals examined	0	3	0	3

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	
				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

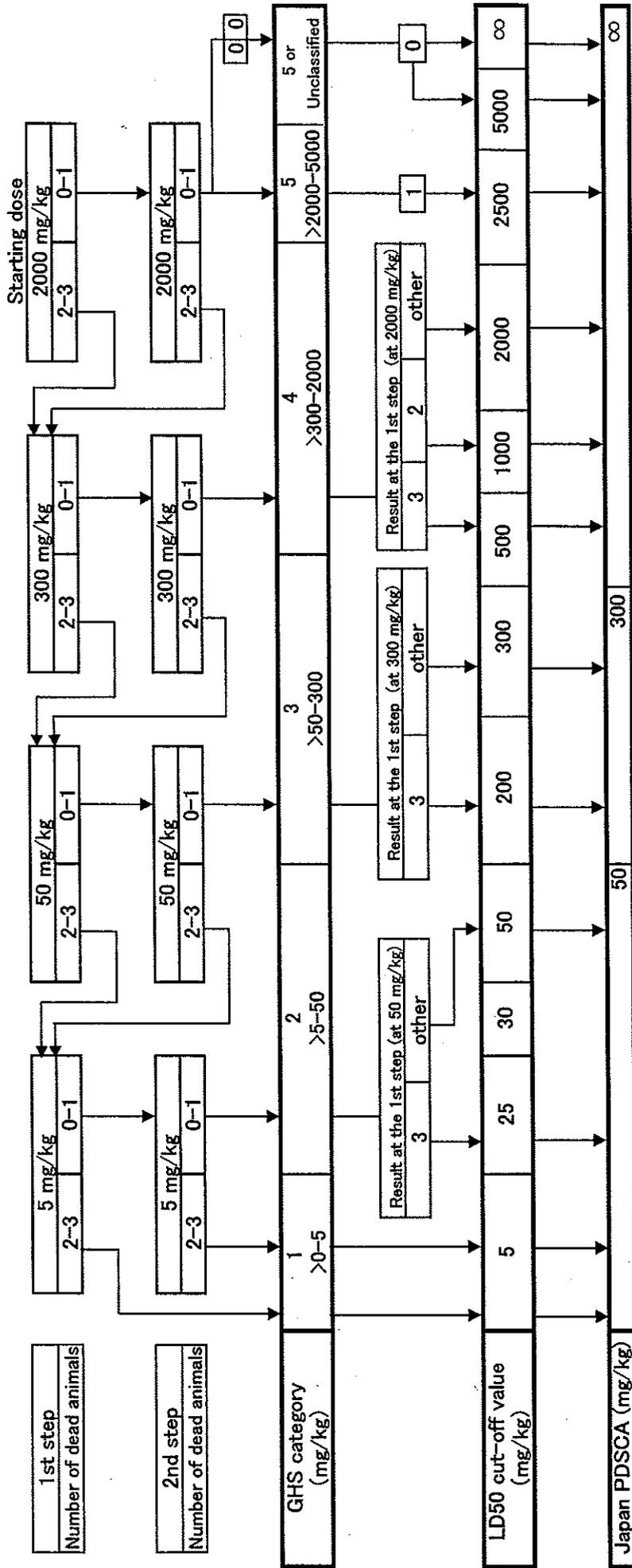
Site and lesion	Dose (mg/kg)			
	2000		2000	
	1st		2nd	
Fate	fd	tk	fd	tk
No. of animals examined	0	3	0	3

No abnormalities detected

- 3 - 3

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.

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



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： SFHIO30519
 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。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	tk
Fate	fd	tk
No. of animals examined	0	5

No abnormalities detected

5

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

(IET 03-0024)

Table 4 Clinical observation - Incidence of signs in female rats

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

No abnormalities detected

- 5

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

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

Dose (mg/kg)	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>				
<u>Animal number</u>	<u>Fate</u>	<u>Time of death</u>	<u>Time of signs noted</u>	<u>Clinical signs</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.

Appendix 5 Necropsy - Individual macroscopic lesions in male rats

			<u>Dose 2000 mg/kg</u>
<u>Animal number</u>	<u>Fate</u>	<u>Time of death</u>	<u>Macroscopic lesions</u>
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 2000 mg/kg</u>
<u>Animal number</u>	<u>Fate</u>	<u>Time of 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.

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つ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つたこと	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ト種の 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つ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つたこと

試験期間を通じて、予見する事ができなかつ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 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