



最終報告書(草案)

アニマルマーカのラットを用いる急性経口投与毒性試験

有限会社 フチガミ器械 委託

試験施設

財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所

〒257-8523 神奈川県秦野市落合 729-5

TEL 0463-82-4751



試験依頼書番号	10-依-854
試験委託者	有限会社フチガミ器械 (京都府向日市寺戸町瓜生1番地の11)
試験番号	A-10-053
被験物質	アニマルマーカ-
試験項目	ラットを用いる急性経口投与毒性試験
試験開始日	2011年3月7日
実験開始日	2011年3月29日
実験終了日	2011年4月15日
試験終了日	試験責任者の捺印日
試験資料保管場所	秦野研究所
保存期間	試験終了後5年間 その後の保存については試験委託者と協議する。
運営管理者	財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 所長 小島幸一

この報告書は、表題の試験について、試験計画書に従って確実に遂行されたものを正しく記載したものである。

2011年 月 日

試験責任者 松本亜紀 印



試験従事者

試験責任者

松本亜紀(毒性学研究室)

試験担当主任者

関 剛幸

試験担当者

投与・観察

関 剛幸、松本亜紀、大向英夫、藤原広和、青木聡子

病理学的検査

丸茂秀樹

動物飼育管理(検疫を含む)

堀内伸二、関 剛幸、松本亜紀、藤原広和

被験物質管理

三枝克彦、加藤初美

検体調製

稲田浩子、西垣嘉人



目次

要約.....	5
試験目的.....	5
試験法.....	5
動物愛護.....	5
材料と方法.....	6
1. 被験物質.....	6
2. 使用動物と飼育方法.....	6
3. 投与検体の調製.....	6
4. 投与方法.....	7
5. 観察と検査.....	7
6. データの解析.....	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及び試験計画書に従わなかつたこと.....	7
試験成績と結論.....	8
1. 死亡と一般状態.....	8
2. 体重.....	8
3. 病理学検査.....	8
4. 結論.....	8
添付資料.....	9
Table.....	10

(最終ページ:12 ページ)



要約

アニマルマーカの安全性評価の資料とするために、ラットを用いる急性経口投与毒性試験を実施した。

観察は投与日を観察第 1 日として観察第 15 日まで行った。第 1 段階として被験物質を 2000 mg/kg の用量で 3 匹の雌ラットに投与した。投与日の一般状態の観察で 3 例ともに自発運動の低下およびうずくまりが見られ、流涎と半眼がそれぞれ 1 例ずつに見られた。観察第 3 日までに死亡例がなかったため、第 2 段階も 2000 mg/kg を 3 匹に投与した。第 1 段階同様、投与日の一般状態の観察において 3 例ともに自発運動の低下およびうずくまりが見られた。2 例については、観察 2 時間までに回復したが、他の 1 例では観察 6 時間が経過しても症状が回復しなかった。この 1 例は、観察第 2 日以降観察第 6 日まで、被毛の汚れ、無便、排便量減少、立毛、頻呼吸、半眼および痩せが観察され、観察第 7 日には加えて緩徐呼吸、赤色尿、体温の低下、衰弱が見られ死亡した。死亡した 1 例の剖検所見は、肺は暗赤色調、脾臓は小型化し淡色調を呈していたほか、腺胃粘膜に黒色の付着物が観察され、胃および腸管内に内容物はほとんどみられなかった。食道や気管には肉眼的な異常所見は認められなかった。2000 mg/kg 投与の他の 5 例は観察終了日まで死亡は認められなかった。各測定日ごとの体重も順調に増加した。

以上の結果よりアニマルマーカの急性経口投与時の毒性は比較的強くない、毒性分類は GHS (Globally Harmonised Classification System) でクラス 5、LD50 区切り値(LD₅₀cut-off値)が 2500 mg/kg と判断された。

試験目的

アニマルマーカの安全性評価の資料とする目的で、ラットを用いる急性経口投与毒性試験を実施した。

試験法

本試験は、OECD 化学物質試験法ガイドライン「[423] Acute Oral Toxicity- Acute Toxic Class Method」(1996 年 3 月 22 日採択、2001 年 12 月 17 日改訂)に準拠し、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成 15 年 11 月 21 日、薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17、製局第 3 号、環企発第 031121004 号)を参考に実施した。

動物愛護

全ての実験操作は、「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和 48 年 10 月 1 日 法律第 105 号、平成 18 年 6 月 2 日一部改正)、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年



4月28日、環境省告示第88号)および「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年6月1日、科発第0601001号)を遵守し、「財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所動物実験に関する指針」(平成2年10月1日、平成22年10月1日改正)に基づいて実施した(動物実験承認番号: 1100399A)。なお、承認された動物実験計画からの変更はなかった。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質であるアニマルマーカ―[ロット番号:110209、製造年月日:2011年2月9日]は黄色の液体であり、有限会社フチガミ器械より提供され、使用まで被験物質受領保管室で保管した。

2. 使用動物と飼育方法

7週齢の Sprague-Dawley 系雌ラット[CrI:CD(SD)、SPF、日本チャールス・リバー、厚木飼育センター]18匹を購入(入荷日:2011年3月23日、入荷時体重:155.5g~175.1g、検疫終了時体重:183.6g~213.2g)し、検疫ならびに飼育環境への馴化のため入荷日を含めて6日間飼育した。検疫期間中1日1回、動物の一般状態を観察した。試験に影響を及ぼすと判断される異常が認められた動物は存在しなかったため、試験系の体重範囲を一定にするために、体重の上位1匹、下位2匹を除外し、15匹を3匹ずつの5群に体重別層化無作為抽出法により群分けを行った。

動物は、許容温度21.0~25.0℃、許容湿度40.0~75.0%、換気設定約15回/時、照明12時間(7~19時点灯)に制御された飼育室内で、金属製金網床ケージ(220w × 270d × 190h mm)に1匹ずつ收容し、固型飼料(CE-2、日本クレア)と水道水(秦野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した。供給した飼料および水の分析結果には試験に支障を来たす可能性のある混入物はなかった。

動物の識別は、検疫・馴化期間中はフェルトペンで尾に馴化番号を標識し、群分け後は、動物番号を標識した。飼育ケージには検疫・馴化期間中は、試験番号および馴化番号を性および入荷日を記入した動物カードを、群分け時には、試験番号、動物番号、投与量および投与年月日を記入し、飼育ケージに掛けた。試験に使用しなかった動物12匹(余剰動物を含む)は、2011年4月15日にペントバルビタールナトリウムで深麻酔後、放血し、安楽死させた。なお、投与日の動物の体重は下記の通りであった。

投与日(第1段階)	2011年3月29日	166.3~180.5g
投与日(第2段階)	2011年4月1日	174.0~190.0g

第2段階の投与日の体重範囲は先に投与した動物の平均体重の80~120%以内であった。

3. 投与検体の調製

被験物質は液体のためそのまま使用した。被験物質の1mLあたりの重量を3回測定し、その平均値を基に被験物質の比重(0.96)を求め、投与量を算出した。



4. 投与方法

「OECD 化学物質試験法ガイドライン」に拠り、投与経路はラット用胃管による強制経口投与とした。

動物を投与前日の 16 時から絶食させた後、投与直前に測定した体重を基に個体別に投与液量を算出し、ラット用胃管を用いて単回強制経口投与した。投与は第 1 段階(動物番号 F01001～F01003)を 2011 年 3 月 29 日、9 時 9 分～9 時 11 分間に 2000 mg/kg の用量で行った。その結果、死亡動物は認められなかったため、ガイドラインに従い(フローチャート参照)、第 2 段階(動物番号 F02004～F02006)2000 mg/kg の用量で 4 月 1 日、9 時 10 分～9 時 12 分間に投与した。第 2 段階で、投与後 7 日に 1 例死亡動物が認められたが、第 2 段階の残り 2 例の動物は一般状態に異常はなく、体重も増加していたことより、第 3 段階以降の投与は行わなかった。

投与段階	投与物質	投与量 (mg/kg)	濃度 (%)	投与容量 (mL/kg)
1	アニマルマーカ	2000	100	2.08
2	アニマルマーカ	2000	100	2.08

5. 観察と検査

投与日を観察第 1 日として第 15 日まで毎日、動物の一般状態の観察をした。投与日(観察第 1 日)の一般状態の観察は投与前に 1 回、投与後は 1 時間にわたり継続的に、その後は約 1 時間毎に投与後 6 時間まで全例について行った。観察第 2 日以降は毎日 1 回の頻度で観察した。体重は、投与直前、観察第 2、4、8、11 および 15 日に測定した。観察第 15 日にはペントバルビタール麻酔下でいずれの動物も放血致死させて剖検し、器官・組織の肉眼的観察を実施した。また、各投与段階の動物番号のもっとも若い 1 例(動物番号 F01001 および F02005)の主要器官・組織(脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、消化管(胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸および直腸))を 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定保存した。死亡例についても同様に剖検し、器官・組織の肉眼的観察を実施し、0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定保存した。

6. データの解析

投与用量毎の体重の平均値および標準偏差を算出した。

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及び試験計画書に従わなかったこと

本試験期間中に、「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及び試験計画書に従わなかったこと」はなかった。



試験成績と結論

1. 死亡と一般状態 (Table 1)

第 2 段階として投与した観察第 1 日の 1 例 (動物番号 F02004) は、投与後 20 分に自発運動の低下、投与後 25 分ではうずくまりが観察され、以降、投与後 6 時間まで自発運動の低下が継続的に見られた。観察第 2 日に被毛の汚れおよび無便、観察第 3 日に被毛の汚れおよび排便量の減少、観察第 4 および 5 日には排便量の減少、立毛、痩せ、頻呼吸、観察第 6 日には観察第 4 および 5 日に見られた症状に加えて半眼が、観察第 7 日では衰弱し体温の低下、緩徐呼吸、赤色尿がみられ死亡した。

その他の 2000 mg/kg 投与では自発運動の低下が投与後 34 分頃までに 3 例 (動物番号 F01001、F02005 および F02006) に見られた。投与後 25 分後にうずくまりと半眼が 1 例 (動物番号 F01002) に観察され投与後 2 時間には、うずくまりと半眼は回復し自発運動の低下のみとなった。また、投与後 34 分後に流涎と自発運動の低下が 1 例 (動物番号 F01003) に見られた。投与日の 2 時間以降から観察終了日まで異常は認められなかった。

2. 体重 (Table 2)

生存した 5 例は各測定日とも順調な増加を示した。

3. 病理学検査 (Table 3)

1) 死亡例の剖検所見

2000 mg/kg 投与第 2 段階の 1 例 (動物番号: F02004、死亡時体重: 132.0 g) は、投与後 7 日に死亡した。肺は暗赤色調で、脾臓は小型化および淡色調を呈していた。腺胃粘膜に黒色物の付着が観察されたが、内容物はほとんどみられなかった。また、食道および気管に、肉眼的な異常所見は認められなかった。

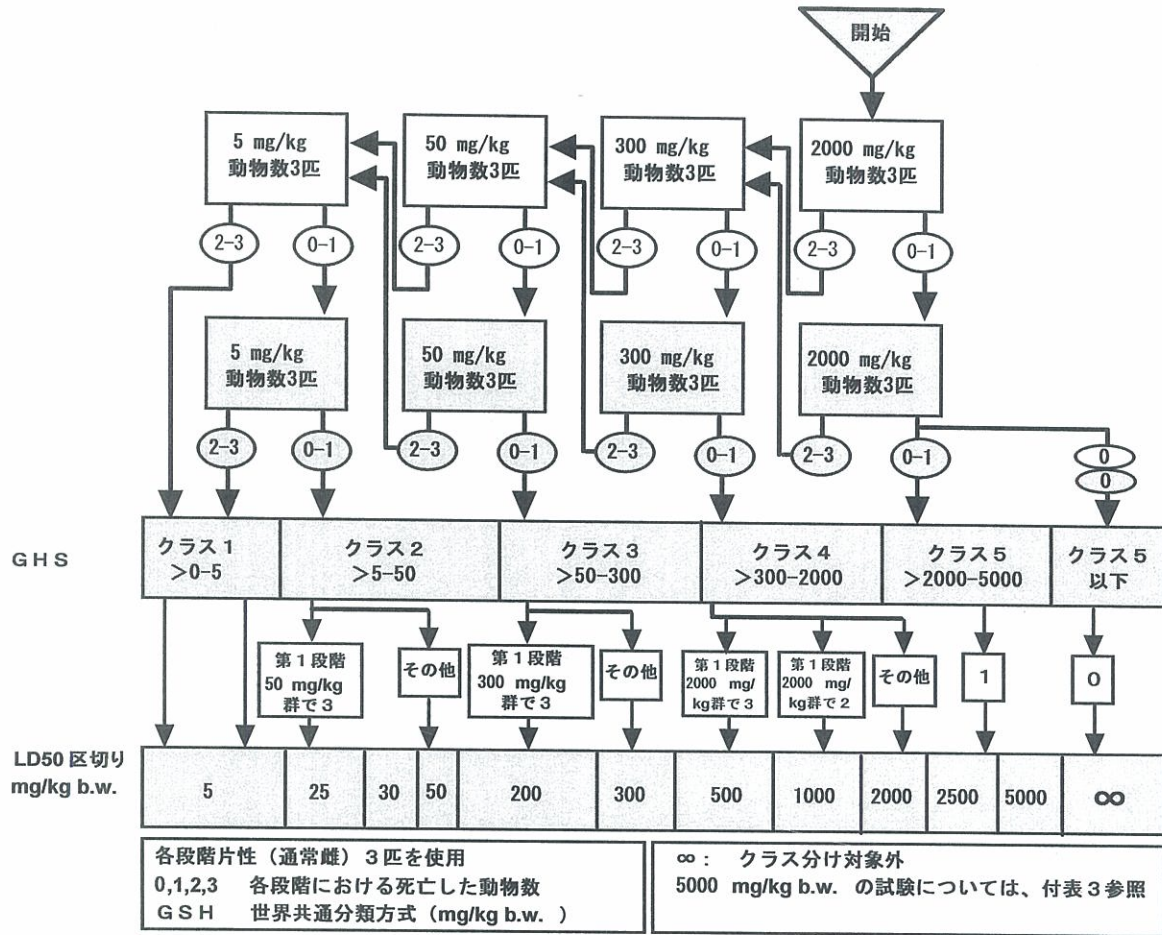
2) 観察期間終了時の剖検所見

生存例は被験物質の影響と思われる異常所見は認められなかった。

4. 結論

投与後 7 日に死亡した 1 例を剖検した結果、肺の暗赤色調、脾臓の小型化および淡色調、胃に内容物はなく、腺胃粘膜に黒色の付着物がみられた。また、その他の 2000 mg/kg 投与では、投与日に自発運動の低下、うずくまりおよび流涎が認められたが、観察第 2 日以降は一般状態に異常は認められず、体重の順調に増加し死亡例もなかった。

したがって、アニマルマーカの毒性分類は GHS (Globally Harmonised Classification System) でクラス 5、LD50 区切り値 (LD₅₀ cut-off 値) が 2500 mg/kg と判断された。



添付資料 1(フローチャート)

Table 1

Single dose toxicity study of ANIMAL MARKER by oral administration in rats

Clinical observation of females

Dose (mg/kg)	Step	Animal Nummer	Hours after administration						Days of observation															
			1	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
2000	Step1	F01001	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		F01002	b,d	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		F01003	a,c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Step2	F02004	a,b	a	a	a	a	a	a	e,f	e,g	g,h,i,j	g,h,i,j	d,g,h,i,j	d,g,i,k,l,m,n	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		F02005	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		F02006	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : No abnormality.
- a: Decrease in locomotor activity.
- b: Crouching position.
- c: Salivation.
- d: Incomplete eyelid opening.
- e: Soiled fur.
- f: No-feces.
- g: Decrease in amount of feces.
- h: Emaciation.
- i: Piloerection.
- j: Tachypnea.
- k: Exhaustion.
- l: Bradypnea.
- m: Reddish urine.
- n: Hypothermia.



Table 2

Single dose toxicity study of ANIMAL MERKER by oral administration in rats

Body weight changes (g) of females

Dose (mg/kg)	Animal Number	Days of observation					
		1 ^{a)}	2	4	8	15	
2000	F01001	175.3	194.8	213.7	222.9	232.4	242.7
	F01002	166.3	196.1	197.2	199.7	212.1	224.6
	F01003	180.5	204.5	224.8	238.7	247.4	256.7
	F02004	190.0	170.2	150.5	Died on day 7 of observation		
Step 2	F02005	188.7	211.8	228.1	237.2	245.6	255.5
	F02006	174.0	196.1	208.2	220.0	229.4	233.9
	Mean	179.1	195.6	203.8	223.7	233.4	242.7
	±S.D	8.3	12.8	25.9	14.1	12.8	12.4
	N	6	6	6	5	5	5

a): Day of administration

Table 3
 Single dose toxicity study of ANIMAL MERKER by oral administration in rats
 Macroscopic findings of female

Group	2000 mg/kg			2000 mg/kg		
	F01001	F01002	F01003	F02004	F02005	F02006
Fate	L	L	L	D	L	L
(Lung)						
Discoloration, dark reddish	-	-	-	+	-	-
(Stomach)						
Attachment, black content, mucosa	-	-	-	+	-	-
Decrease, content, lumen	-	-	-	+	-	-
(Intestine)						
Decrease, content, lumen	-	-	-	+	-	-
(Spleen)						
Small	-	-	-	+	-	-
Discoloration, pale colored	-	-	-	+	-	-

-: negative, +: positive

L : Lived to the end of the observation period, D : Died on day 7 of observation