

1 物理化学的性質並びに成分規格及び使用方法

名称	ヒノキ葉粉末						
原材料	ヒノキ葉						
成分	有効成分	ヒノキ葉					
	その他含	なし。					
含有規格	ヒノキ葉 100%						
製造方法	ヒノキ葉（細い枝を含む）をチップーシュレッダーで破砕した後、乾燥機で絶乾する。乾燥させた葉を、粉砕機を用いて数mmから粉末程度の状態に加工する。						
性状	資材に色は、原料の採集状況により違い、枝打ち直後であれば緑色、やや時間が経ったものであれば茶色となる。ヒノキ木材よりもヒノキ臭が強い。形状は数mmから粉末の状態のものを使用する。						
その他	有効成分はピペリトールほかとしており、特定はされていない。						
使用方法	適用農作物名	適用病虫害等	使用量等	使用時期	使用回数	使用方法	使用上の注意事項
	播種型以外（定植型）	一年生雑草	乾燥粉末で500g/m ² 以上	通年	制限なし	土壌に混和または散布後、散水	
普及状況	北関東以南を想定。未発売のため実績はない。						

2 薬効に関する資料の概要

作物名	栽培条件	適用雑草名	使用量	使用時期	使用方法	効果	試験場所	散布回数
パンジー・ビニルハウス		畑地一年生イネ科雑草/畑地一年生広葉雑草	400g,800g,1200g,1600g/m ²	定植後または定植前	土壌表面処理（定植後） 土壌混和処理	定植後処理については効果が認められる。	植調牛久	1回
チューリップ/クロッカス	圃場	畑地一年生イネ科雑草/畑地一年生	800g,1000g,1400g/m ²	植付後	土壌表面処理	効果不明	植調牛久	1回
はつかだいこん	圃場	畑地一年生イネ科雑草/畑地一年生	400g～2000g/m ²	播種後	土壌表面処理	効果が認められる	植調牛久	1回
移植水稻	水田	水田一年生雑草/水田多年生雑草	5g,10g,20g,40g,80g,160g,320g/m ²	雑草発生前または雑草発生始期	湛水散布	効果が認められる	植調牛久	1回
緑地管理	ガラス温室	一年生雑草	500g,1000g,1500g/m ²	雑草発生前	土壌混和処理	効果が認められる	植調牛久	1回



15日植調協第91号
平成15年10月15日

住友林業株式会社 殿

財団法人 日本植物調節剤研究協会
会 長 小 林 仁



非公開試験成績の報告について

貴社より委託がありました下記の薬剤について、試験成績をもってご報告致します。

記

薬 剤 名	対 象 作 物	試 験 場 所
SFC001	野菜花き	日本植物調節剤研究協会研究所
		計；1場所

試 験 成 績 報 告 書

平成15年10月

財団法人 日本植物調節剤研究協会

供試薬剤名：SFC-001粉末

試験場所：(財)日本植物調節剤研究協会研究所

担当者：村岡哲郎、田中十城

有効成分：ヒノキ葉の乾燥粉末 100%

試験のねらい：雑草の草種・葉量と除草効果の関係および作物への影響を検討する。

試験1. 雑草(畑雑草)の種類と除草効果の関係(試験担当：村岡)

I. 試験方法

試験期間：2002年11月～2003年1月

試験場所：植調研究所圃場温室内ポット

供試土壌：火山灰壤土(腐植含量7.7%、pH6.4、最大容水量91.6%)

試験規模：面積50cm²(2万分の1a)の発泡スチロールポット 3反復

供試雑草：一年生イネ科雑草・・・イシヒエ、スズメノカタビラ

一年生広葉雑草・・・ホアザケイトリ、シロザ、スベリヒユ

注)各ポットに1草種ずつ播種

施肥条件：基肥としてMMB野菜用化成を0.5g/pot 土壌混和

播種日：2002年11月25日(十分に灌水した床土上に30粒播種し、2mm程度に覆土)

供試薬剤：SFC-001粉剤(細かな粉状の製剤)

処理葉量：50, 100, 200, 400g/m²

処理方法：全面土壌処理(所定葉量を試験区内の土壌表面に均一散布)

薬剤処理日：発生前処理2002年11月26日

イネ科雑草1葉期処理2002年12月6日

処理時の土壌の状態：いずれも‘適湿’

温度条件：試験期間中の気温・・・15～25℃

灌水条件：灌水用シャワーを用い、1～2日間隔で灌水

調査方法：処理後、経時的に雑草の発生状況を観察し、2003年1月21日(発生前処理後56日目、イネ科雑草1葉期処理後46日目)に全個体を抜き取り、地上部生重を測定した。

II. 試験結果(表1)

1) 雑草発生前処理

畑土を詰めたポットに代表的な畑地一年生雑草の種子を播種し、雑草発生前(播種翌日)に葉量50, 100, 200, 400g/m²を土壌表面に均一散布した結果、イネ科雑草(イシヒエ、スズメノカタビラ)やシロザに対する除草効果は劣ったが、ホアザケイトリ、スベリヒユに対しては高葉量区を中心に明らかな出芽・苗立ち阻害作用が認められ、最高葉量の400g/m²では両草種の残草量が無処理区の7～12%に抑えられた。

2) イネ科雑草1葉期処理

発生前処理と同じ条件下で、雑草の発生期(イネ科雑草1葉期、広葉雑草子葉期)に葉量100, 200, 400g/m²を土壌表面に均一散布した結果、発生前処理に比べ全体的に抑制程度が劣る傾向が見られたが、ホアザケイトリ、スベリヒユに対しては高葉量区を中心に発芽・苗立ち阻害作用がみられ、最高葉量の400g/m²では両草種の残草量が無処理区の10～21%に抑えられた。一方、イネ科雑草(イシヒエ、スズメノカタビラ)やシロザに対する除草効果は劣った。

表 1. ポット試験結果 (試験 1)

処理時期	区No	薬剤名	製品g/m ²	残草量無処理区比% (調査日: 2003.1.21.)				
				イシビエ	スズメノカタビラ	ホソアザイトウ	シロザ	スベリヒユ
雑草発生前処理 (11/26)	1	SFC-001粉末	50	90	87	67	100	60
	2		100	75	83	67	100	35
	3		200	73	80	23	80	30
	4		400	50	65	12	47	7
	5	(比)トレファノサイド粒剤2.5	4	4	23	1	6	3
イネ科1葉期処理 (12/6) スズメノカタビラ: 1L アビュシロザ、スベリヒユ: 子葉 イシビエ (*12/24処理): 1-2L	6	SFC-001粉末	100	93	100	70	100	73
	7		200	70	87	38	92	33
	8		400	63	87	10	57	21
	9	(比)トレファノサイド粒剤2.5	4	32	20	8	37	5
無処理	N	無処理	—	23cm 茎数3本	9cm	5L 4cm	8L 13cm	4L 2cm
				: 残草量無処理区比 0~20% (効果: 大)				
				: 残草量無処理区比 21~40% (効果: 中)				

III. 所見

本剤は発生前から発生始期の雑草に対し出芽・苗立ちを阻害する作用を示したが、今回供試した 400g/m²以下の薬量では、その作用は一部の広葉雑草（ホソアザイトウ・スベリヒユ）にのみ強く認められ、イネ科雑草やシロザなど他の広葉雑草に対する作用力は弱かった。今後、使用薬量を決定するにあたっては、圃場条件下での検討が必要であるが、一年生雑草全般を対象とする場合には、より高い薬量を含めた検討が望まれる。

試験 2. 薬量および水分条件と除草効果の関係 (試験担当: 村岡)

I. 試験方法

試験期間: 2003 年 2 月~4 月

試験場所: 植調研究所圃場温室内ベッド

供試土壌: 沖積埴壌土 (腐植含量 4.0%, pH 5.6)

試験規模: 面積 1 m²/区 2 反復

供試雑草: 一年生イネ科雑草・・・ヒシバ、イシビエ、スズメノカタビラ

一年生広葉雑草・・・ホソアザイトウ、シロザ

注) 1つの試験区内に 5 種の雑草種子を混播

施肥条件: 無施肥

播種日: 2003 年 2 月 4 日 (薬剤処理直前に各草種 100 粒ずつを播種し、試験区の表土に混和)

供試薬剤および処理薬量: SFC-001 粉剤 (細かな粉状の製剤) 200, 400, 800 g/m²

処理方法: 全面土壌処理 (所定薬量を試験区内の土壌表面に均一散布)

薬剤処理日: 2003 年 2 月 4 日 (雑草発生前) 処理時の土壌の状態: 'やや乾'

温度条件: 試験期間中の気温・・・15~25℃

灌水条件: 灌水無し (乾燥) 条件・・・試験期間を通じて灌水を行わず (屋内のため降雨無し)

灌水有り (適湿) 条件・・・過乾にならぬよう 2 月 13 日, 2 月 24 日, 3 月 2 日,

3 月 10 日, 3 月 17 日, 3 月 26 日に灌水を実施

調査方法: 2003 年 3 月 2 日 (処理後 26 日目) に観察により各処理区の残草量無処理区比を草種別に調査し、2003 年 4 月 2 日 (処理後 57 日目) に全個体を抜き取り、草種別に地

上部生重を測定した。

II. 試験結果（表2）

1) 処理後26日目調査

地下温水配管により15℃以上に保温した圃場温室ベッドに一年生雑草の種子を播種し、雑草発生前に薬量200, 400, 800g/m²（試験1よりも高めに設定）を土壌表面に均一散布した。その結果、灌水無し（乾燥）条件下では、**ホソアケイトウ**に中程度の除草効果が見られたのみで、他の雑草に対する効果はみられなかったが、灌水有り（適湿）条件下では、400g/m²以上の薬量で**ホソアケイトウ**の発生を完全に抑え、**シロザ**や**ヒシバ**に対しても中から大程度の除草効果が認められた。ただし、**イヌビエ**、**スズメノカタビラ**に対しては、最高薬量の800g/m²でも効果は劣った。

2) 処理後57日目調査

シロザやイネ科雑草については、処理区において残存した個体の生育が旺盛となり、無処理区との残草量の差は小さくなった。一方、200g/m²区の**ホソアケイトウ**については、これらの雑草との競合により生育が抑制される結果となった。

表2. 圃場温室試験結果（試験2）

処理後26日目(2003.3.2.)における残草量

薬剤処理直後の灌水	区No	薬剤名	製品g/m ²	ヒシバ	イヌビエ	スズメノカタビラ	ホソアケイトウ	シロザ
無し	無1	無処理	—	2L	2L	2.5L	本葉1L	本葉1L
	無2	SFC-001粉末	200	100%	100%	100%	30%	50%
	無3		400	100%	100%	100%	25%	50%
	無4		800	50%	100%	100%	25%	50%
有り ※シャワー付きの散水ホースにて土壌表面に水が浮く程度に灌水	有1	無処理	—	2.2L	3L	3L	本葉1.5L	本葉1L
	有2	SFC-001粉末	200	50%	100%	100%	25%	50%
	有3		400	38%	78%	100%	0%	20%
	有4		800	33%	68%	100%	0%	18%

注) 無処理区欄の文字は雑草の生育ステージ(葉期)を表し、処理区の数字は残草量の無処理区比% (観察値)を表す。

：残草量無処理区比 0~20% (効果: 大)
：残草量無処理区比 21~40% (効果: 中)

処理後57日目(2003.4.2.)における残草量(生重g/m²)

薬剤処理直後の灌水	区No	薬剤名	製品g/m ²	ヒシバ	イヌビエ	スズメノカタビラ	ホソアケイトウ	シロザ
無し	無1	無処理	—	75.9	17.8	41.7	18.5	11.4
	無2	SFC-001粉末	200	74%	52%	118%	249%	60%
	無3		400	106%	72%	147%	110%	185%
	無4		800	149%	60%	127%	42%	77%
有り ※シャワー付きの散水ホースにて土壌表面に水が浮く程度に灌水	有1	無処理	—	180.9	78.8	30.7	6.9	22.9
	有2	SFC-001粉末	200	63%	58%	193%	2%	71%
	有3		400	84%	61%	198%	0%	66%
	有4		800	113%	62%	184%	0%	93%

注) 無処理区欄の数字は残草量(生重g/m²)を表し、処理区の数字は残草量の無処理区比%を表す。

：残草量無処理区比 0~20% (効果: 大)
：残草量無処理区比 21~40% (効果: 中)

III. 所見

最高薬量を800g/m²に上げ、水分(灌水)条件を変え、現場圃場に近い条件下で検討した結果、灌水無し(乾燥)条件下での効果は全体として低かったが、灌水有り(適湿)条件下では、**ホソアケイトウ**に対し高い除草効果が認められた。このことにより、本剤が十分に効果を発揮するためには、

ある程度の水分が必要であることが判った。一方、他の雑草に対する除草効果は最高薬量においても低い（イシ'エ、ス'メカビ'ウ）か、または抑草期間が1ヶ月程度と短かった（シザ'、ヒバ'）ことから、一年生雑草全般を対象と場合には、更に高い薬量を含めた検討が必要である。

試験3. パンジー栽培条件下における除草効果と作物に対する影響の検討（試験担当：村岡）

I. 試験方法

試験期間：2003年3月～5月

試験場所：植調研究所内ビニールハウス（無加温）

供試土壌：火山灰壤土（腐植含量7.7%、pH6.4、最大容水量91.6%）

試験規模：面積1m²/区 2反復

供試作物：パンジー（園芸店より購入した苗を1区当たり4株定植）

供試雑草：一年生イネ科雑草・・・ヒバ'、イシ'エ、ス'メカビ'ウ

一年生広葉雑草・・・オ'ア'イ'トリ、シザ'

注）パンジー定植前に、1つの試験区内に5種の雑草種子を各100粒ずつ播種

雑草播種日・パンジー定植日：2003年3月25日

施肥条件：パンジーの植え穴に家庭園芸用化成肥料（N:P:K=3:10:10）30g/m²を投入

供試薬剤：SFC-001粉剤（低コストタイプの粉砕が粗い製剤）

処理方法および薬量：

① 定植後土壌表面処理（パンジー定植直後に所定薬量を土壌表面に均一散布）

400, 800, 1200, 1600 g/m²

② 定植前土壌混和处理（パンジー定植直前に所定薬量を10cm深で土壌混和）

200, 400, 800 g/m²

薬剤処理日：2003年3月25日（雑草発生前）

処理時の土壌の状態：‘やや乾’

温度条件：試験期間中の気温・・・0～30℃（無加温ビニールハウス内）

灌水条件：灌水用シャワーを用い、過乾にならぬよう適宜灌水を実施

調査方法：除草効果については、5月23日（処理後59日目）に全雑草を抜き取り、草種別に地上部生重を測定した。また、パンジーに与える影響については、経時的に観察を行うとともに、3月28日、4月12日、5月16日に株長と開花数を調査した。

II. 試験結果（表3）

1) 除草効果

パンジー定植後土壌表面処理については、薬量800g/m²ではオ'ア'イ'トリのみに効果がみられ、他の雑草には効果が劣ったが、最高薬量の1600g/m²になると、ヒバ'にも出芽抑制による高い除草効果が認められ、また他の雑草についても発生数減少によるある程度の除草効果が認められ、草取り労力を軽減できる可能性が示された。

一方、土壌混和处理については、オ'ア'イ'トリに対して除草効果がみられたものの、他の雑草に対する効果は劣り、最高薬量の800g/m²でも除草効果は不十分な結果となった。

2) 作物（定植したパンジー）への影響

処理後の経時的な観察の結果、本剤処理による生育への影響は認められず、また株長や開花数

についても処理による影響は認められなかった。

表 3. ビニールハウス試験結果 (試験 3)

雑草に対する除草効果 (調査日: 2003.5.23.)

区No	薬剤名	処理方法	雑草種子 播種後の 耕起	製品 g/m ²	メシバ		イヌビエ		スズメノカタビラ		ホソアザミ		タチアザミ (イヌビエ & オオイヌビエ)	
					本数/m ²	生重g/m ²	本数/m ²	生重g/m ²	本数/m ²	生重g/m ²	本数/m ²	生重g/m ²	本数/m ²	生重g/m ²
1	無処理	—	—	—	41	72	46	297	54	18	14	162	13	271
2	SFC-001粉末	表面処理	無	400	100%	157%	44%	108%	71%	128%	41%	72%	92%	124%
3				800	69%	107%	51%	81%	46%	97%	19%	19%	38%	62%
4				1200	51%	71%	36%	67%	30%	73%	4%	20%	42%	53%
5				1600	15%	13%	23%	42%	24%	39%	0%	0%	42%	59%
6	無処理	—	—	—	55	94	26	200	53	22	13	67	9	195
7	SFC-001粉末	土壌混和 (耕起深 10cm)	有 (耕起深 10cm)	200	78%	131%	104%	110%	90%	85%	58%	109%	128%	112%
8				400	69%	126%	102%	175%	29%	34%	27%	17%	178%	116%
9				800	71%	132%	81%	79%	40%	30%	12%	2%	117%	125%

注) 処理区の数値は同じ後期条件の無処理区に対する比率%を示す

：無処理区比 0～20% (効果: 大)

：無処理区比 21～40% (効果: 中)

作物 (処理直前に定植したパンジー) に対する影響

区No	薬剤名	処理方法	雑草種子 播種後の 耕起	製品 g/m ²	株径cmの推移			株当たり開花数の推移			薬害程 度
					3月28日	4月12日	5月16日	3月28日	4月12日	5月16日	
1	無処理	—	—	—	13	21	34	1.4	5.3	14.3	—
2	SFC-001粉末	表面処理	無	400	13	21	35	1.5	4.8	14.5	無
3				800	13	22	37	1.8	5.9	18.8	無
4				1200	12	21	37	1.5	5.0	18.6	無
5				1600	12	20	36	1.5	4.9	19.3	無
6	無処理	—	—	—	13	21	35	1.6	5.6	13.0	—
7	SFC-001粉末	土壌混和 (耕起深 10cm)	有 (耕起深 10cm)	200	12	20	35	1.5	5.4	18.9	無
8				400	12	19	35	1.5	5.1	14.8	無
9				800	12	21	34	1.9	7.0	20.1	無
10	手取り除草	—	無	—	12	20	37	1.9	5.3	19.1	—

Ⅲ. 所見

低コストタイプの粉砕度が粗い製剤を用い、パンジー栽培条件を想定して検討を行った結果、1600g/m² (試験 2 の最高薬量よりも更に高い薬量) をパンジー定植後に土壌表面処理した場合には、一年生雑草全般に対し発生抑制作用による除草効果が認められた (写真 1～3 参照)。ただし、1600g/m² では地表を覆う本剤の厚さが 5mm 以上に達することから、ヒノキ葉のアレロパシー作用によってではなく、物理的に雑草の出芽を抑えている可能性も高いと考えられる。今後、他草種も含め、草種間の感受性の差についての更なる検討が望まれる。

現時点では、農業用としては薬量的にみて適用は難しいと思われる (特殊な問題雑草に効果が高いことが確認されたり、有効成分抽出によって低薬量化・低コスト化が図れたりする場合は別であるが)。一方、パンジーに対する薬害が認められず、また処理後の見た目も良く、ほのかにヒノキの香りがする点も好感が持てることから、家庭園芸などの場面において手取り除草の労力を軽減する資材として利用できる可能性はあると考える。

試験 4. 水田雑草に対する除草効果と移植水稻に及ぼす影響 (試験担当: 田中)

→ 成績書別添



写真1. 無処理区（試験3 5月16日）



写真2. パンジー定植後 800g/m²土壌表面処理区（試験3 5月16日）



写真3. パンジー定植後 1600g/m²土壌表面処理区（試験3 5月16日）

SFC-001粉末に関する基礎試験成績(水田雑草対象)

1. 目的

ヒノキ枝葉乾燥粉末の使用量と水田雑草に対する除草効果及び水稻に及ぼす影響について検討する。

2. 試験期間

平成14年11月～平成15年1月

3. 試験場所

植調研究所 圃場温室1号棟

4. 試験方法

1)試験規模

0.08㎡ 3区制

2)供試薬剤及び処理薬量

SFC-001 5g、10g、20g、40g、80g、160g、320g/㎡

参考)ソルネットIキロ粒剤(フenchlorol:4%) 1g/㎡

3)処理法

湛水状態でSFC-001の所定量を直接散布

4)水稻関係

品種:日本晴

移植:11月27日 1本/株の1区あたり6株移植

苗質:草丈 18.3cm、葉齢 2.0L、地上部乾物率 15.2%

5)対象雑草

ノビエ、コナギ、アゼナ、ホタルイ、ウリカワ、ミズガヤツリ

※移植前日にノビエ、コナギ、アゼナ及びホタルイ種子を所定量播種、ウリカワ及びミズガヤツリの塊茎を3個/区埋め込んだ

6)処理時期と雑草の状態

処理時期	処理日	ノビエ	コナギ	アゼナ	ホタルイ	ウリカワ	ミズガヤツリ	水稻
発生前	11月27日(+0)	発生前	発生前	発生前	発生前	発生前	発生前	2.0L
発生始	12月4日(+7)	0.5L	発生前	発生前	発生始	初生葉	発生始	2.3L

5)調査

経時的に達観調査

5. 試験結果

- ・本剤は、水面に散布後大部分は2日程度で沈下し、一部は浮遊したままとなった。
- ・今回の試験では、散布後3～4日後にジョロにより散水し浮遊したものもすべて沈下させた。
- ・緑色から黄褐色の本剤は、沈下後は徐々に黒色に変色した。
- ・80g/㎡以上の試験区では、試験終了時(処理後50日程度)でも黒色の残渣が目立った。
- ・160g/㎡以上の試験区では、散布後徐々に田面水が黒く濁り、160g/㎡では処理後10日間程度、320g/㎡では処理後20日間程度、土壌表面及び雑草の状態が確認できなかった。
- ・80g/㎡以上で、コナギ、広葉雑草、ミズガヤツリに対して高い除草効果がみられた。
- ・160g/㎡以上で、ノビエ、ホタルイに対して高い除草効果がみられた。
- ・320g/㎡薬量においても、ウリカワに対する効果は不十分であった。
- ・本剤処理による水稻生育への影響はほとんどみられなかった。

6. 考察

本剤160g/㎡以上であれば雑草発生始までの時期で、ある程度の除草効果が期待できるものの、使用量が極めて多い(米ぬかでの雑草防除に使用される米ぬか使用量の1.5倍以上)ことから、乾燥粉末の状態での現地圃場への散布は現実的ではない。160g/㎡以上の除草効果には遮光や堆積の影響も考慮する必要があるが、それらの影響がほとんど無い使用量40g/㎡でもコナギやミズガヤツリに対して抑制作用がみられることから、何らかの活性成分が存在する可能性が高い。従って活性成分の特定や抽出次第では有効活用の可能性もあると考えられる。

調査結果

①雑草関係

処理時期	薬剤名	薬量 (/m ²)	ヒエ				コナギ				広葉雑草				ホトライ			
			10	20	30	40	10	20	30	40	10	20	30	40	10	20	30	40
発生前	SFC-001	5g	100	100	100	100	—	100	100	100	—	—	100	100	100	100	100	100
		10g	100	100	100	100	—	100	100	100	—	—	100	100	100	100	100	100
		20g	90	92	97	100	—	100	100	100	—	—	100	100	100	100	100	100
		40g	30	65	86	100	—	60	70	70	—	—	20	40	100	100	100	100
		80g	20	60	70	85	—	0	5	10	—	—	1	3	65	95	98	100
		160g	—	10	20	20	—	0	0	1	—	—	0	0	—	30	30	60
		320g	—	0	0	0	—	0	0	0	—	—	0	0	—	0	0	0
	参)ソルネット	1g	0	0	0	0	—	0	0	0	—	—	0	0	0	0	0	0
発生始	SFC-001	5g	100	100	100	100	100	100	100	100	—	100	100	100	100	100	100	100
		10g	98	100	100	100	100	100	100	100	—	100	100	100	100	100	100	100
		20g	90	100	100	100	60	80	80	80	—	100	100	100	100	100	100	100
		40g	70	80	100	100	3	10	20	25	—	30	60	70	100	100	100	100
		80g	60	70	90	95	0	0	0	1	—	10	30	45	90	90	90	90
		160g	20	10	1	0	0	0	0	0	—	0	0	0	10	5	5	2
		320g	—	5	0	0	—	—	0	0	—	—	0	0	—	—	0	0
	参)ソルネット	1g	10	5	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	1	1	0	0

処理時期	薬剤名	薬量 (/m ²)	ウリカ				ミスガヤツリ			
			10	20	30	40	10	20	30	40
発生前	SFC-001	5g	100	100	100	100	100	100	100	100
		10g	100	100	100	100	50	65	90	100
		20g	100	100	100	100	5	15	35	60
		40g	90	98	100	100	0	1	5	20
		80g	90	95	100	100	0	0	0	1
		160g	—	70	100	100	—	0	0	0
		320g	—	70	100	100	—	0	0	0
	参)ソルネット	1g	30	50	60	80	1	2	5	10
発生始	SFC-001	5g	100	100	100	100	100	100	100	100
		10g	100	100	100	100	100	100	100	100
		20g	100	100	100	100	60	85	100	100
		40g	100	100	100	100	45	50	90	95
		80g	100	100	100	100	3	5	15	25
		160g	100	100	100	100	0	0	0	2
		320g	—	—	100	100	—	—	0	1
	参)ソルネット	1g	80	80	80	60	1	1	1	5

注1)雑草名下の数字は調査時期(処理後日数)

注2)除草効果欄は残草量の無処理区比(0:残草量0%~100:残草量100%)を表記した。

注3)無処理区の個体が発生前、もしくは薬剤の影響で田面水が濁り観察及び評価不能であったものは「—」で表記した。

②水稻関係

処理時期	薬剤名	薬量 (/m ²)	薬害		
			症状(回復性)	症状程度	薬害程度
発生前	SFC-001	5g	—	—	無
		10g	—	—	無
		20g	—	—	無
		40g	—	—	無
		80g	—	—	無
		160g	—	—	無
		320g	—	—	無
	参)ソルネット	1g	草丈抑制(速)	+	微
発生始	SFC-001	5g	—	—	無
		10g	—	—	無
		20g	—	—	無
		40g	—	—	無
		80g	—	—	無
		160g	—	—	無
		320g	—	—	無
	参)ソルネット	1g	草丈抑制(速)	+	微

注4)症状程度 —: 害徴がみられない、+: 害徴が現れるが問題ない、

++: 害徴が明らかで収量に影響がないと見込まれても実用化が微妙、

+++実用化にはかなり問題がある

注5)回復性 速: 20日以内に回復、中: 20~40日で回復、遅: 40日以上回復に要する

注6)薬害程度 無: 症状なし(推定減収率0%)、極微: 生育に影響ない(0%)、微: 回復大(0%)、小: 減収予想(1~5%)、

中: 減収予想(6~15%)、大: 減収予想(16%以上)

<参考資料1>

除草効果の概要

①処理後30日目

処理時期	薬剤名	薬量 (/m ²)	ノビエ	コナギ	アゼナ	ホタルイ	ウリカワ	ミズガヤツリ
発生前	SFC-001	5g	×	×	×	×	×	×
		10g	×	×	×	×	×	×
		20g	×	×	×	×	×	□
		40g	×	×	○	×	×	◎
		80g	×	◎	◎	×	×	●
		160g	○	●	●	□	×	●
		320g	●	●	●	●	×	●
	参)リネット	1g	●	●	●	●	×	◎
発生始	SFC-001	5g	×	×	×	×	×	×
		10g	×	×	×	×	×	×
		20g	×	×	×	×	×	×
		40g	×	○	×	×	×	×
		80g	×	●	□	×	×	○
		160g	◎	●	●	◎	×	●
		320g	●	●	●	●	×	●
	参)リネット	1g	●	●	●	●	×	◎

※除草効果の記号 ●：残草量0%、t：trace、◎：1～10%、○：11～20%、□：21～40%、△：41～60、×：61%以上

②処理後40日目

処理時期	薬剤名	薬量 (/m ²)	ノビエ	コナギ	アゼナ	ホタルイ	ウリカワ	ミズガヤツリ
発生前	SFC-001	5g	×	×	×	×	×	×
		10g	×	×	×	×	×	×
		20g	×	×	×	×	×	△
		40g	×	×	□	×	×	○
		80g	×	◎	◎	×	×	◎
		160g	○	◎	●	×	×	●
		320g	●	●	●	●	×	●
	参)リネット	1g	●	●	●	●	×	◎
発生始	SFC-001	5g	×	×	×	×	×	×
		10g	×	×	×	×	×	×
		20g	×	×	×	×	×	×
		40g	×	□	×	×	×	×
		80g	×	◎	△	×	×	□
		160g	●	●	●	◎	×	◎
		320g	●	●	●	●	×	◎
	参)リネット	1g	●	●	●	●	×	◎

※除草効果の記号 ●：残草量0%、t：trace、◎：1～10%、○：11～20%、□：21～40%、△：41～60、×：61%以上

<参考資料2>

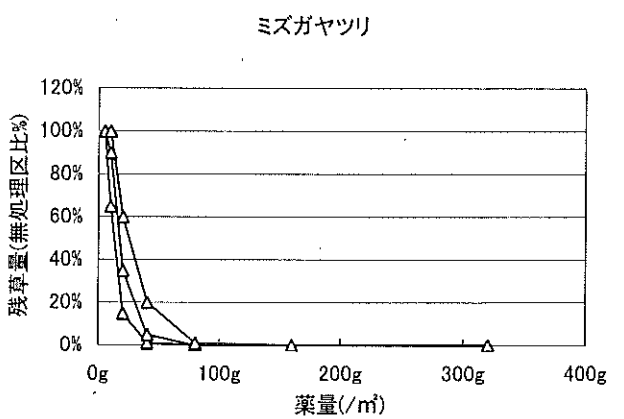
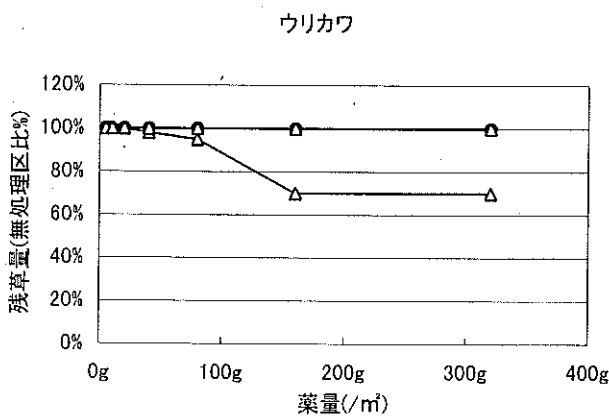
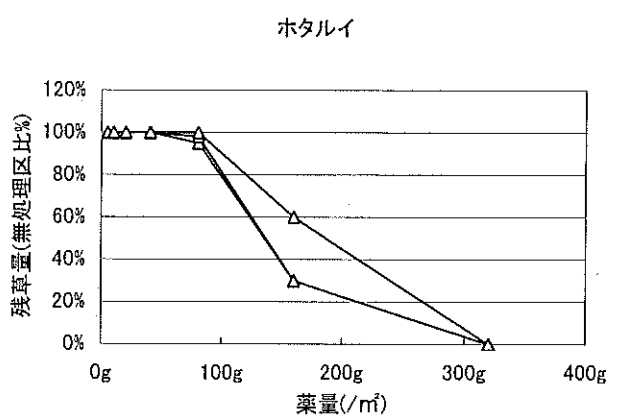
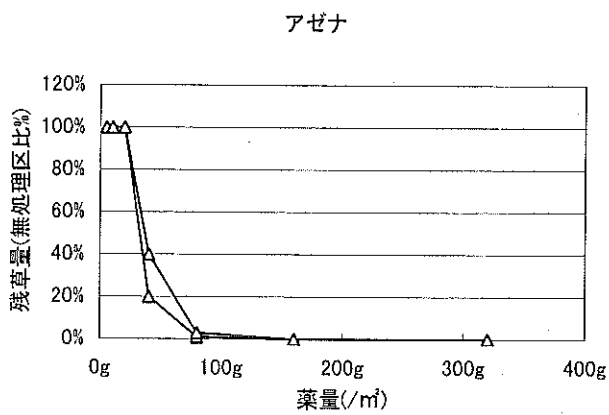
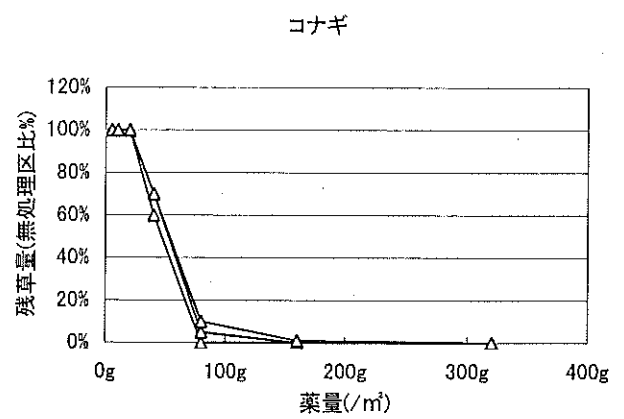
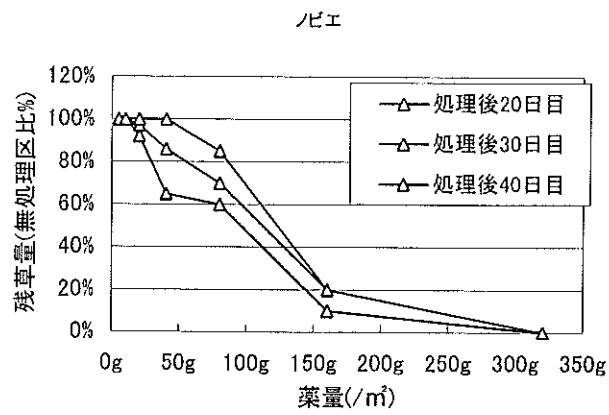


図1 雑草発生前処理でのSCF-001の薬量と調査時期別残草量

<参考資料3>

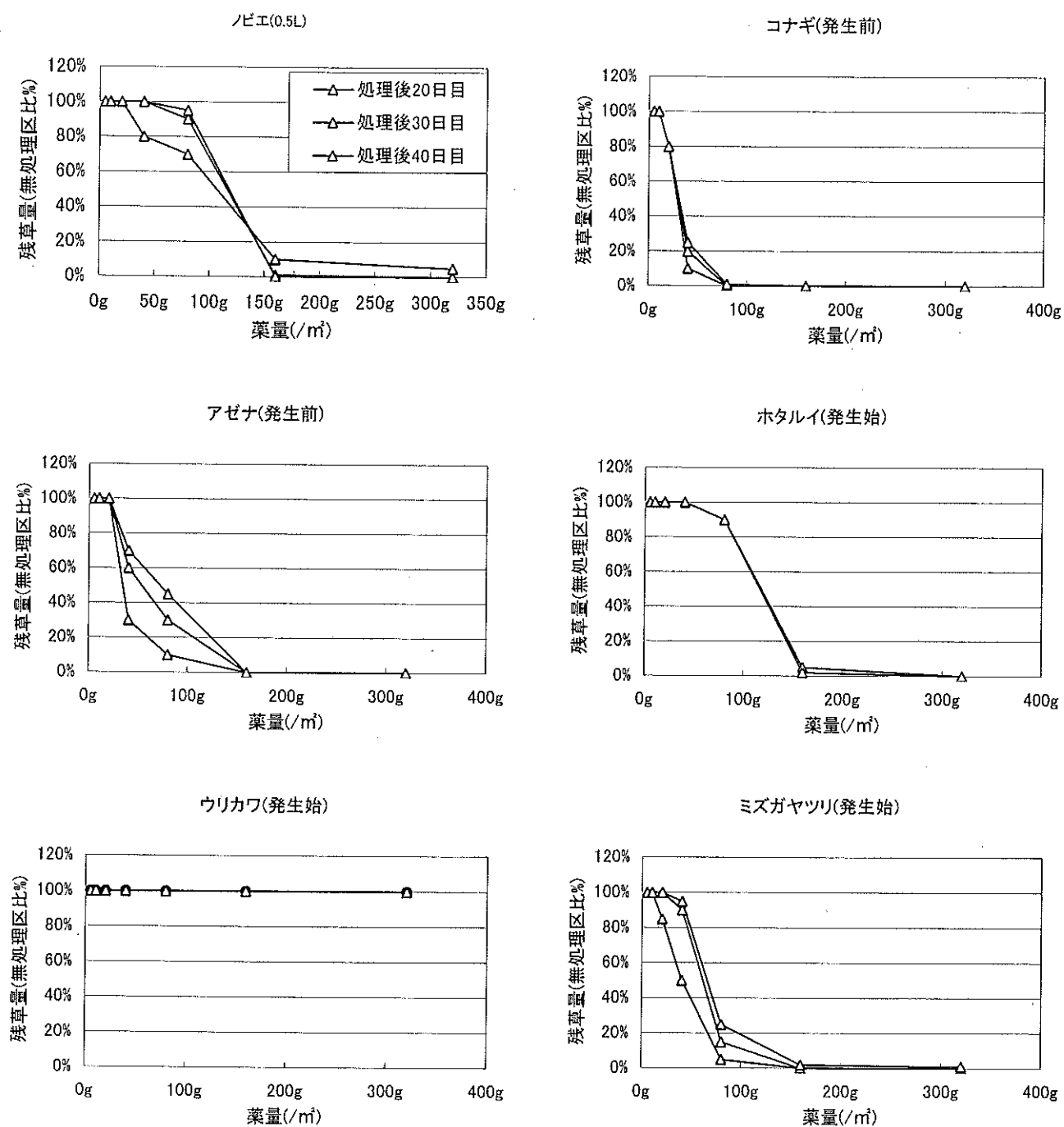


図2 雑草発生始処理でのSCF-001の薬量と調査時期別残草量

平成16年度

**非農耕地関係除草剤・生育調節剤
試験成績集録**

平成 17 年 1 月

財団法人 日本植物調節剤研究協会

A. 除草剤

薬 剤 名 有効成分および 含有率(%) [委託者]	試験の 種 類 新・継 の 別	試験担当場所 (数)	試 験 設 計 [対象雑草] 処理時期 ;薬量g・mL<水量L>/10a ;処理方法等	備 考	頁
17. MCP-Na液 MCPAナトリウム塩 19.5% [2,4-D協議会]	適用性 新規	植調北海道 新潟畜産研 植調研 岡山北部 (4)	[一年生広葉雑草、多年生広葉 雑草、スギナ] 生育期(草丈30cm以下) ; 400, 600g<70~100L> ; 茎葉処理 対)MCP液 750mL<100L>		158
18. NH-402粒 イソカ 1% [日本農薬]	適用性 新規	植調北海道 植調岩手 新潟畜産研 植調研 植調福岡 (5)	[一年生雑草] 生育初期(草丈20cm以下) ; 15, 20, 25kg ; 土壌処理 対)カサランカ粒 15kg		168
19. NHS-50粒 塩素酸ナトリウム 50% [三草会]	適用性 継続	<東日本G研> <奥武蔵CC> <花屋敷GC> (3)	[雑類] 生育期(秋期) ; 30, 45, 60kg ; 土壌処理		-
20. NNK-007AL液 ピラフルフェンシド 0.0064% グリホサートイソプロピルアミン 塩 1.2% [日本農薬]	適用性 新規	植調十勝 茨城大学 宇都宮大学 島根農試 新中国G研 (5)	[一年生雑草、多年生雑草] ; 生育期(草丈50cm以下) ; 25mL/m ² (250mL/10a) <原液散布> ; 茎葉処理 対)サンカ-ボ-ル007 1000mL<100L>		180
	適用性 新規	植調十勝 植調研 宇都宮大学 岡山北部 福岡豊前 (5)	[スギナ] ; 生育期(草丈30cm以下) ; 25, 50mL/m ² (250, 500mL/10a) <原液散布> ; 茎葉処理 対)サンカ-ボ-ル007 1000, 2000mL<100L>		190
21. NOJ-120顆粒水和 トリフロキシメスフロキサナトリウム 塩 72% [シンシエンタージャパン]	適用性 継続	東日本G研 植調研 新中国G研 (3)	[一年生雑草、多年生広葉雑草] 生育期(草丈30cm以下) ; 6, 9, 12g<100L> ; 茎葉処理 対)カーメックスD水和 1000g<100L>		200
22. NP-63液 メコプロップP 52% [日本曹達]	適用性 継続	植調十勝 植調研 島根農試 岡山北部 福岡豊前 (5)	[一年生広葉雑草、多年生広葉 雑草、スギナ] 生育期(草丈30cm以下) ; 350mL<100, 200L>, 500, 750mL<100L> ; 茎葉処理 対)2,4Dゾータ塩 800g<200L>		206
23. NUH-141液 グリホサートイソプロピルアミン 塩 3% MCPAイソプロピルアミン塩 6.5% [ニューファム]	適用性 継続	植調十勝 茨城大学 東日本G研 岡山北部 新中国G研 (5)	[一年生雑草、多年生雑草、スギナ] 生育期(草丈30cm以下) ; 1000, 2000mL<100L> ; 茎葉処理 対)三共の草枯らし 1000mL<100L>		218
24. SFC-0401粉 ヒノキ葉粉末 [住友林業]	作用性 新規	植調研 (1)	[一年生雑草、多年生雑草] 発生前 ; 500, 800, 1000kg ; 土壌処理(被覆)		228

供試薬剤名：SFC-0401 粉剤

試験担当場所：(財)日本植物調節剤研究協会研究所

ロット No. SF0301, NN040413

担当者：村岡哲郎

有効成分・含有率：ヒノキ葉粉末・100%

試験のねらい：雑草の草種、薬量と除草効果の関係について検討する

試験1. 雑草の種類と除草効果の関係 (ポット試験)

I. 試験方法

試験期間：2002年11月～2003年1月

試験場所：植調研究所圃場温室内ポット

供試土壌：火山灰壤土（腐植含量7.7%、pH6.4、最大容水量91.6%）

試験規模：面積50cm² (2万分の1a)の発泡スチロールポット 3反復

供試雑草：一年生イネ科雑草・・・イヌビエ、スズメノカタビラ

一年生広葉雑草・・・ホアガイトリ、シロザ、スベリヒユ

注) 各ポットに1草種ずつ播種

施肥条件：基肥としてMMB野菜用化成を0.5g/pot 土壌混和

播種日：2002年11月25日（十分に灌水した床土上に30粒播種し、2mm程度に覆土）

供試薬剤：SFC-0401 粉剤（ロット No. NN040413）

処理薬量：50, 100, 200, 400g/m²

処理方法：全面土壌処理（所定薬量を試験区内の土壌表面に均一散布）

薬剤処理日：発生前処理 2002年11月26日

イネ科雑草1葉期処理 2002年12月6日

処理時の土壌の状態：いずれも「適湿」

温度条件：試験期間中の気温・・・15～25℃

灌水条件：灌水用シャワーを用い、1～2日間隔で灌水

調査方法：処理後、経時的に雑草の発生状況を観察し、2003年1月21日（発生前処理後56日目、イネ科雑草1葉期処理後46日目）に全個体を抜き取り、地上部生重を測定した。

II. 試験結果 (表1)

1) 雑草発生前処理

畑土を詰めたポットに畑地一年生雑草の種子を播種し、雑草発生前（播種翌日）に薬量50～400g/m²を土壌表面に均一散布した（被覆厚は400g/m²で1～2mmとなった）結果、ホアガイトリ、スベリヒユに対して高薬量区を中心に明らかな出芽・苗立ち阻害作用が認められ、最高薬量の400g/m²では両草種の残草量が無処理区の7～12%に抑えられた。一方、イネ科雑草（イヌビエ、スズメノカタビラ）やシロザに対する除草効果は400g/m²でも不十分であった。

2) イネ科雑草1葉期処理

発生前処理と同じ条件下で、雑草の発生期（イネ科雑草1葉期、広葉雑草子葉期）に薬量100, 200, 400g/m²を土壌表面に均一散布した結果、発生前処理に比べ全体的に抑制程度が劣る傾向が見られたが、ホアガイトリ、スベリヒユに対しては高薬量区を中心に枯殺作用がみられ、最高薬量の400g/m²では両草種の残草量が無処理区の10～21%に抑えられた。一方、イネ科雑草（イヌビエ、スズメノカタビラ）やシロザに対する除草効果は400g/m²でも不十分であった。

表1. ポット試験結果

処理時期	区No	薬剤名	製品g/m ²	残草量無処理区比% (調査日:2003.1.21.)				
				イヌビエ	スズメノカタビラ	ホソアケイトウ	シロザ	スベリヒユ
雑草発生前処理(11/26)	1	SFC-0401粉	50	90	87	67	100	60
	2		100	75	83	67	100	35
	3		200	73	80	23	80	30
	4		400	50	65		47	
	5	(比)トリアノサイト粒剤2.5	4		23			
イネ科1葉期処理(12/6)	6	SFC-0401粉	100	93	100	70	100	73
スズメノカタビラ:1L	7		200	70	87	38	92	33
アビユ、シロザ、スベリヒユ:子葉	8		400	63	87		57	21
イヌビエ(*12/24処理):1-2L	9	(比)トリアノサイト粒剤2.5	4	32			37	
無処理	N	無処理	—	23cm 茎数3本	9cm	5L 4cm	8L 13cm	4L 2cm

:残草量無処理区比 0~20%(効果:大)

:残草量無処理区比 21~40%(効果:中)

III. 所見

本剤は発生前から発生始期の雑草に対し出芽抑制作用や枯殺作用を示したが、今回供試した400g/m²以下の薬量では、その作用は一部の広葉雑草（ホソアケイトウ・スベリヒユ）にのみ強く認められ、イネ科雑草やシロザに対する作用力は弱かった。

試験2. 薬量および水分条件と除草効果の関係（圃場温室試験）

I. 試験方法

試験期間:2003年2月~4月

試験場所:植調研究所圃場温室内ベッド

供試土壌:沖積埴壌土（腐植含量4.0%、pH5.6）

試験規模:面積1m²/区 2反復

供試雑草:一年生イネ科雑草・・・ヒシバ、イヌビエ、スズメノカタビラ

一年生広葉雑草・・・ホソアケイトウ、シロザ

注)1つの試験区内に5種の雑草種子を混播

施肥条件:無施肥

播種日:2003年2月4日(薬剤処理直前に各草種100粒ずつを播種し、試験区の表土に混和)

供試薬剤および処理薬量:SFC-0401粉剤(ロットNo. NN040413)200,400,800g/m²

処理方法:全面土壌処理(所定薬量を試験区内の土壌表面に均一散布)

薬剤処理日:2003年2月4日(雑草発生前) 処理時の土壌の状態:‘やや乾’

温度条件:試験期間中の気温・・・15~25℃

灌水条件:灌水無し(乾燥)条件・・・試験期間を通じて灌水を行わず(屋内のため降雨無し)

灌水有り(適湿)条件・・・2月4日、2月13日、2月24日、3月2日、3月10日、

3月17日、3月26日に灌水を実施

調査方法:2003年3月2日(処理後26日目)に観察により各処理区の残草量無処理区比を草種別に調査し、2003年4月2日(処理後57日目)に全個体を抜き取り、草種別に地上部生重を測定した。

II. 試験結果 (表 2)

地下温水配管により 15℃以上に保温した圃場温室ベッドに一年生雑草の種子を播種し、雑草発生前に薬量 200, 400, 800g/m² (試験 1 よりも高めに設定) を土壌表面に均一散布した。その結果、処理後 26 日目の時点で、灌水無し (乾燥) 条件下ではホアオゲイトウに中程度の除草効果が見られたのみで、他の雑草に対する効果はみられなかったが、灌水有り (適湿) 条件下では、400g/m²以上の薬量でホアオゲイトウの発生を完全に抑え、シロザやヒシバに対しても中から大程度の除草効果が認められた。ただし、イヌビエ、スズメノカタビラに対しては、最高薬量の 800g/m²でも効果は劣った。その後、処理後 57 日目調査時点では、シロザやイネ科雑草など処理区において残存した個体の生育が旺盛となり、無処理区との残草量の差は小さくなった。

表 2. 圃場温室試験結果

処理後26日目(2003.3.2.)における残草量

薬剤処理後の灌水	区No	薬剤名	製品g/m ²	ヒシバ	イヌビエ	スズメノカタビラ	ホアオゲイトウ	シロザ
無し	無1	無処理	—	2L	2L	2.5L	本葉1L	本葉1L
	無2	SFC-0401粉	200	100%	100%	100%	30%	50%
	無3		400	100%	100%	100%	25%	50%
	無4		800	50%	100%	100%	25%	50%
有り ※シャワー付きの散水ホースにて土壌表面に水が浮く程度に灌水	有1	無処理	—	2.2L	3L	3L	本葉1.5L	本葉1L
	有2	SFC-0401粉	200	50%	100%	100%	25%	50%
	有3		400	38%	78%	100%		
	有4		800	33%	68%	100%		

注) 無処理区欄の文字は雑草の生育ステージ(葉期)を表し、処理区の数字は残草量の無処理区比%(観察値)を表す。

■: 残草量無処理区比 0~20%(効果: 大)

■: 残草量無処理区比 21~40%(効果: 中)

処理後57日目(2003.4.2.)における残草量(生重g/m²)

薬剤処理後の灌水	区No	薬剤名	製品g/m ²	ヒシバ	イヌビエ	スズメノカタビラ	ホアオゲイトウ	シロザ
無し	無1	無処理	—	75.9	17.8	41.7	18.5	11.4
	無2	SFC-0401粉	200	74%	52%	118%	249%	60%
	無3		400	106%	72%	147%	110%	185%
	無4		800	149%	60%	127%	42%	77%
有り ※シャワー付きの散水ホースにて土壌表面に水が浮く程度に灌水	有1	無処理	—	160.9	78.8	30.7	6.9	22.9
	有2	SFC-0401粉	200	63%	58%	193%	24%	71%
	有3		400	84%	61%	198%	0%	66%
	有4		800	113%	62%	184%	0%	93%

注) 無処理区欄の数字は残草量(生重g/m²)を表し、処理区の数字は残草量の無処理区比%を表す。

■: 残草量無処理区比 0~20%(効果: 大)

■: 残草量無処理区比 21~40%(効果: 中)

III. 所見

最高薬量を 800g/m²に上げ、水分(灌水)条件を変え、現場圃場に近い条件下で検討した結果、灌水無し(乾燥)条件下での効果は全体として低かったが、灌水有り(適湿)条件下では、ホアオゲイトウに対し高い除草効果が認められた。このことにより、本剤が十分に効果を発揮するためには、処理後の水分供給(灌水または降雨)が必要と考えられる。一方、他の雑草に対する除草効果は最高薬量においても低い(イヌビエ、スズメノカタビラ)か、または抑草期間が1ヶ月程度と短かった(シロザ、ヒシバ)ことから、一年生雑草全般を対象とする場合には、更に高い薬量が必要と思われる。

試験3. 処理方法と除草効果の関係およびパンジー（移植苗）に対する影響の検討（ビニールハウス試験）

I. 試験方法

試験期間：2003年3月～5月

試験場所：植調研究所内ビニールハウス（無加温）

供試土壌：火山灰壤土（腐植含量7.7%、pH6.4、最大容水量91.6%）

試験規模：面積1㎡/区 2反復

供試作物：パンジー（2003年3月25日に園芸店より購入した苗を1区当たり4株定植）

供試雑草：一年生イネ科雑草・・・*ヒシバ*、*イヌビエ*、*スズメノカタビラ*

一年生広葉雑草・・・*ホトアケイトウ*、*シロサ*

注）パンジー定植前に1試験区内に5種の雑草種子を各100粒ずつ播種

施肥条件：パンジーの植え穴に家庭園芸用化成肥料（N:P:K=3:10:10）30g/㎡を投入

供試薬剤：SFC-0401粉剤（ロットNo. SF0301）

処理方法および薬量：

- ① 定植後土壌表面処理（パンジー定植直後に所定薬量を土壌表面に均一散布）

400, 800, 1200, 1600 g/㎡

- ② 定植前土壌混和处理（パンジー定植直前に所定薬量を10cm深で土壌混和）

200, 400, 800 g/㎡

薬剤処理日：2003年3月25日（耕起・苗定植後 雑草発生前）

処理時の土壌の状態：‘やや乾’

灌水条件：灌水用シャワーを用い、過乾にならぬよう適宜灌水を実施

調査方法：除草効果については、5月23日（処理後59日目）に全雑草を抜き取り、草種別に地上部生重を測定した。また、パンジーに与える影響については、経時的に観察を行うとともに、3月28日、4月12日、5月16日に株長と開花数を調査した。

II. 試験結果（表3）

1) 除草効果

パンジー定植後の土壌表面処理については、薬量800g/㎡では*ホトアケイトウ*のみに効果がみられたが、最高薬量の1600g/㎡になると、*ヒシバ*やその他の雑草についても発生本数を減少させる効果が認められた（写真1）。

一方、土壌混和处理については、400g/㎡以上の薬量で*ホトアケイトウ*に対して除草効果がみられたものの、他の雑草に対する除草効果は、最高薬量の800g/㎡でも不十分な結果であった。

2) パンジー（移植苗）への影響

本剤処理による生育への影響は認められず、また株長や開花数についても処理による影響は認められなかった。

表3. ビニールハウス試験結果

雑草に対する除草効果(調査日:2003.5.23.)

区No	薬剤名	処理方法	雑草種子 播種後の 耕起	製品 g/m ²	パシパ		イシエ		スズメカササ		ホソオケイトウ		97類 (イシエ&オオイシエ)	
					本数/m ²	生重g/m ²	本数/m ²	生重g/m ²	本数/m ²	生重g/m ²	本数/m ²	生重g/m ²	本数/m ²	生重g/m ²
1	無処理	—	無	—	41	72	46	297	54	18	14	162	13	271
2	SFC-0401粉	表面処理		400	100%	157%	44%	108%	71%	128%	41%	72%	92%	124%
3				800	69%	107%	51%	81%	46%	97%	19%	19%	38%	62%
4				1200	51%	71%	36%	67%	30%	73%	4%	20%	42%	53%
5				1600	15%	13%	23%	42%	24%	39%	0%	0%	42%	59%
6	無処理	—	有 (耕起深 10cm)	—	55	94	26	200	53	22	13	67	9	195
7	SFC-0401粉	土壌混和 (耕起深 10cm)		200	78%	131%	104%	110%	90%	85%	58%	109%	128%	112%
8				400	69%	126%	102%	175%	29%	34%	27%	17%	178%	115%
9				800	71%	132%	81%	79%	40%	30%	12%	2%	117%	125%

注)処理区の数値は同じ後期条件の無処理区に対する比率%を示す

無処理区比 0~20% (効果:大)
無処理区比 21~40% (効果:中)

作物(処理直前に定植したパンジー)に対する影響

作物(処理直前に定植したパンプキン)に対する影響											
区No	薬剤名	処理方法	雑草種子 播種後の 耕起	製品 g/m ²	株径cmの推移			株当たり開花数の推移			薬害程度
					3月28日	4月12日	5月16日	3月28日	4月12日	5月16日	
1	無処理	—	無	—	13	21	34	1.4	5.3	14.3	—
2	SFC-0401粉	表面処理		400	13	21	35	1.5	4.8	14.5	無
3				800	13	22	37	1.8	5.9	18.8	無
4				1200	12	21	37	1.5	5.0	18.6	無
5				1600	12	20	36	1.5	4.9	19.3	無
6	無処理	—	有 (耕起深 10cm)	—	13	21	35	1.6	5.6	13.0	—
7	SFC-0401粉	土壌混和 (耕起深 10cm)		200	12	20	35	1.5	5.4	18.9	無
8				400	12	19	35	1.5	5.1	14.8	無
9				800	12	21	34	1.9	7.0	20.1	無
10	手取り除草	—	無	—	12	20	37	1.9	5.3	19.1	—

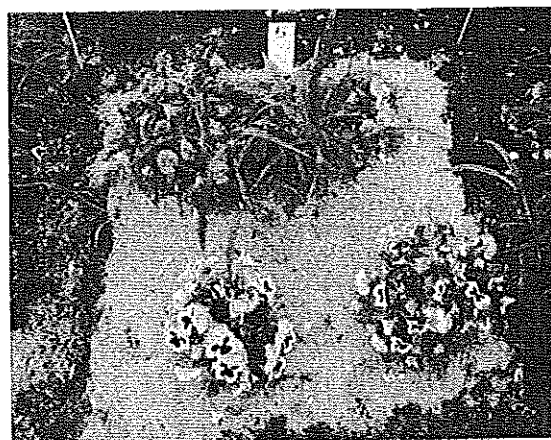


写真1. パンジー定植後土壌表面処理による SFC-0401 粉剤の除草効果

左: 無処理 (2003 年 5 月 16 日) 右: SFC-0401 粉剤 1600g/m²

Ⅲ. 所見

パンジー栽培条件を想定して検討を行った結果、1600g/m²をパンジー定植後に土壌表面処理した場合には、一年生雑草全般に対し発生抑制作用による除草効果が認められ、草取り労力を軽減できる可能性が示された。一方、土壌混和処理(最高薬量 800g/m²)については一部の草種(ホソオケイトウ)に効果が認められたが、薬量や混和深などについて更なる検討が必要である。

試験4. 秋冬期圃場条件下における除草効果と観賞用植物（球根類）に対する影響の検討

I. 試験方法

試験期間：2003年11月～4月

試験場所：植調研究所内畑圃場（畑 No.4）

供試土壌：火山灰壤土（腐植含量 7.7%、pH 6.4、最大容水量 91.6%）

試験規模：面積 1 m²/区 2 反復

供試作物：チューリップ（球根 6 個/区）、クロッカス（球根 3 個/区）

耕起・球根植え付け日：2003年11月17日

供試雑草：一年生イネ科雑草・・・スズメノカタビラ 一年生広葉雑草・・・ハコベ、ホトケナギ

注) いずれも試験開始時に種子を播き込んだが、自然発生する個体も多かった

施肥条件：無施肥

供試薬剤：SFC-0401 粉剤（ロット No. SF0301）

処理方法および薬量：球根植え付け後に所定薬量を土壌表面に均一散布

800, 1000, 1400 g/m²

比較薬剤：トリフルリン乳剤 200ml/10a < 水量 100 リットル/10a >

薬剤処理日：2003年11月17日（耕起・球根植え付け後 雑草発生前）

処理時の土壌の状態：‘やや乾’

灌水条件：①処理直後灌水あり区・・・本剤処理直後に灌水用シャワーにて十分に灌水
その後は自然降雨のみ

②処理直後灌水なし区・・・試験期間を通じ自然降雨のみ

調査方法：除草効果については、4月8日（処理後 143 日目）に全雑草を抜き取り、草種別に本数、地上部生重を測定した。また、チューリップ、クロッカスに与える影響については、経時的に観察調査を行った。

II. 試験結果（表4）

1) 処理時の様子

処理時には風速 1～3m/秒の風が吹いていたため、本剤については処理時に若干の飛散がみられた。また、処理直後の灌水を行わなかった区については、処理翌日以降においても風による剤の飛散移動が見られた。

2) 除草効果

処理直後の灌水の有無にもかかわらず、800g/m²以上の薬量で、スズメノカタビラ、ハコベ、ホトケナギに対して高い除草効果が認められた。また、本剤処理区では、無処理区や比較剤区に比べて土壌表面が乾燥する現象が認められた。本試験では、無処理区も含め、乾燥と霜柱によって出芽後の雑草が枯死する現象が認められたことから、本剤は土壌表層部分（幼植物の根域）の乾燥を促すことで雑草の発生・苗立を減少させている可能性がうかがわれた。

3) チューリップおよびクロッカス（球根類）への影響

チューリップに対しては、本剤処理による生育・開花への悪影響は認められなかった。一方、クロッカスに対しては、生育への影響は認められなかったが、本剤処理により開花が数日早まる傾向が認められた（写真2）。

表4. 秋冬期圃場試験結果(試験4)

処理後143日後(2004.4.8.)における無処理区比残草量と観賞用植物(球根類)に対する影響

区No	薬剤名	薬量 g/10a	灌水条件	スズメノカタビラ		ハコベ		ホトケノザ		チューリップ	クロッカス
				本数/区	生重g/区	本数/区	生重g/区	本数/区	生重g/区	被害程度	被害程度
1	無処理	-	処理直後の灌水+自然降雨	60	2.5	196	101.3	55	29.1	-	-
2	SFC-0401粉	800		1%	0%	0%	0%	139%	28%	無	無(開花早まる)
3		1000		0%	0%	6%	0%	118%	12%	無	無(開花早まる)
4		1400		0%	0%	1%	0%	100%	19%	無	無(開花早まる)
5	無処理	-	自然降雨のみ	13	0.7	182	144.9	57	64.9	-	-
6	SFC-0401粉	800		0%	0%	2%	0%	96%	4%	無	無(開花早まる)
7		1000		0%	0%	2%	0%	102%	4%	無	無(開花早まる)
8		1400		0%	0%	1%	0%	51%	2%	無	無(開花早まる)
9	比トリフルリン乳	200ml		0%	0%	0%	0%	6%	0%	無	無

: 無処理区比 0~20% (効果 極大~大)

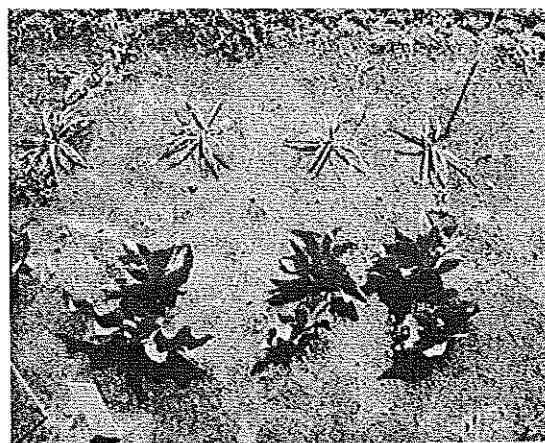
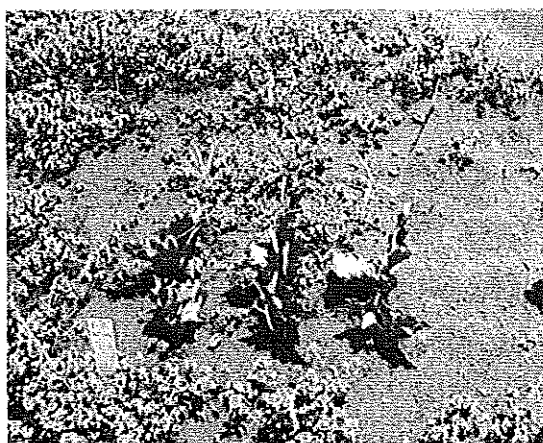


写真2. 球根類植付後土壌表面処理によるSFC-0401粉剤の除草効果

左: 無処理 (2003年5月16日) 4月上旬
右: SFC-0401粉剤 800g/m² (処理直後灌水有り)

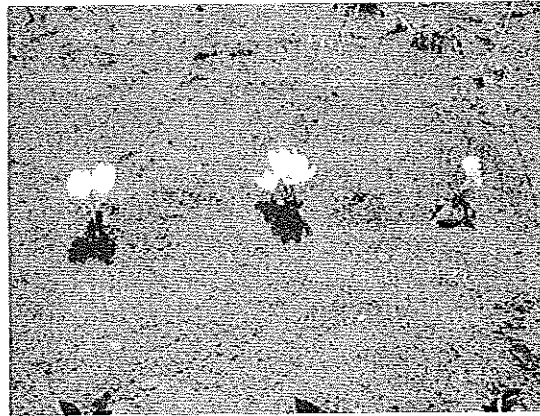
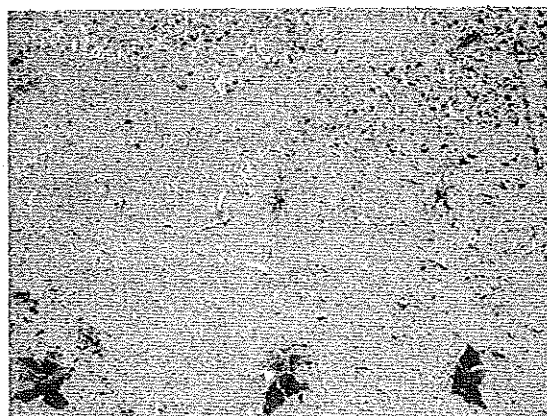


写真3. SFC剤・0401粉剤土壌表面処理によるクロッカスの開花促進効果

左: 無処理 (2003年5月16日) 3月中旬
右: SFC-0401粉剤 1000g/m² (処理直後灌水有り)

III. 所見

秋期圃場(火山灰土壌)にチューリップ、クロッカスの球根を植え付けた後、本剤を土壌表面に散布した結果、800g/m²以上の薬量にて冬雑草(スズメノカタビラ、ハコベ、ホトケノザ)の発生を翌春ま

での長期間にわたって抑制した。植え付けた球根類に対する悪影響も認められなかったことから、公園や家周りでの秋冬期の花壇等への適用が考えられるが、土壌の乾燥しやすさが除草効果に関係している可能性もあるため、他の土壌条件下での効果の確認が望まれる。

試験5. 夏期圃場条件下における除草効果とハツカダイコン（播種作物）に対する影響の検討

I. 試験方法

試験期間：2004年6月～8月

試験場所：植調研究所内畑圃場（畑 No.3）

供試土壌：火山灰壤土（腐植含量 7.7%、pH 6.4、最大容水量 91.6%）

試験規模：面積 1 m²/区 2 反復

供試作物：ハツカダイコン（10 粒/区） 2004 年 6 月 25 日に耕起・播種

供試雑草：一年生イネ科雑草・・・*ヒシバ* 一年生広葉雑草・・・*スベリヒユ*、*イシビユ*
注）いずれも自然発生

施肥条件：無施肥

供試薬剤：SFC-0401 粉剤（ロット No. NN040413）

処理方法および薬量：耕起・作物播種後に所定薬量を土壌表面に均一散布

400, 600, 800, 1000, 1200, 1600, 2000 g/m²

比較薬剤：トリフルリン乳剤 200 ml/10 a < 水量 100 リットル/10 a >

薬剤処理日：2004 年 6 月 25 日（雑草発生前）

処理時の土壌の状態：‘やや乾’

灌水条件：本剤処理直後にじょうろにて十分に灌水し、その後は試験終了時まで灌水せず

調査方法：8 月 5 日（処理後 41 日目）に雑草およびハツカダイコンを抜き取り、草種別に本数、地上部生重を測定した。

II. 試験結果（表 5 参照）

1) 除草効果

夏期の圃場で耕起後に自然発生してくる一年生雑草に対する除草効果を調べた結果、400 g/m²以上の薬量で*イシビユ*に、800 g/m²以上の薬量で*スベリヒユ*に対して高い除草効果が認められたが、イネ科雑草の*ヒシバ*に対しては最高薬量の 2000 g/m²でも効果不十分であった。ただし、*ヒシバ*については、耕起前に発生していた個体が完全にすき込まれずに再生するものもみられたことから、種子発生個体に限れば 2000 g/m²である程度高い除草効果が得られる可能性はある。

2) ハツカダイコン（播種作物）への影響

播種したハツカダイコンは、1000 g/m²以上の薬量で苗立数が減少し、2000 g/m²では苗立が完全に抑えられる結果となった。

表5. 春夏期圃場試験－1 結果

処理後41日後(2004.8.5.)における無処理区比残草量とダイコン(播種作物)に対する影響

区No	薬剤名	薬量 g/m ²	メシバ		スベリヒユ		イヌビユ		ダイコン	
			本数/m ²	生重g/m ²	本数/m ²	生重g/m ²	本数/m ²	生重g/m ²	本数/m ²	生重g/m ²
1	無処理	—	13	353	53	1185	47	353	78%	30%
9	完全除草	—	—	—	—	—	—	—	5	68
2	SFC-0401粉	400	80%	40%	48%	82%	22%	13%	67%	44%
3		600	168%	188%	34%	54%	0%	0%	78%	59%
4		800	140%	88%	20%	49%	6%	6%	67%	51%
5		1000	92%	94%	8%	17%	3%	0%	33%	32%
6		1200	64%	85%	6%	22%	3%	2%	11%	18%
7		1600	108%	181%	5%	8%	2%	0%	11%	24%
8		2000	24%	90%	1%	3%	1%	1%	0%	0%
10	(参考)トリフルリン乳	200ml/10a	12%	0%	8%	39%	12%	13%	100%	94%

: 無処理区比 0~20% (効果 極大~大)

Ⅲ. 所見

耕起した圃場に本剤を土壌表面に散布した結果、1000g/m²以上の薬量にて一年生広葉雑草(イヌビユ、スベリヒユ)の発生を40日程度抑制できたが、イネ科雑草(メシバ)に対しては、その倍の2000g/m²でも効果不十分であった。一方、播種した作物(ハツカダイコン)については、1000g/m²以上の薬量で明らかな苗立阻害を受けることが判った。

まとめ

非農耕地用除草剤としては、処理薬量が多く、比重が軽い体積もかさばり、また効果のある草種も限られるなど、一般的な非農耕地での使用には向いていないと考えられるが、パンジーやチューリップ、クロッカスなど移植苗や球根類などの観賞用植物に対する影響が少なく、処理後の見た目や香りなど好感が持てる点もあることから、公園や家周りなどでこのような観賞用植物を栽植する場面で手取り除草の労力を軽減する資材として利用できる可能性はある。薬量としては秋冬期500~1000g/m²、春夏期1000~2000g/m²程度が適当と考える。



18日植調協第50号
平成18年7月25日

住友林業株式会社 殿

財団法人 日本植物調節剤研究協会
会 長 小 林 仁



非公開試験成績の報告について

貴社より委託がありました下記の薬剤について、試験成績をもってご報告致します。

記

薬 剤 名	対 象 作 物	試 験 場 所
SF-0512粉	緑地管理	植調研究所
		計 ; 1 場所

試 験 成 績 報 告 書

平成18年7月

財団法人 日本植物調節剤研究協会

平成 17 年度 除草資材試験成績

財団法人日本植物調節剤研究協会研究所

試験担当 金久保秀輝

資材名：SF-0512 粉（ヒノキ葉粉末）

試験目的：一年生雑草を対象に雑草発生前の土壌混和处理での有効草種を検討する。

試験時期：平成 18 年 1 月～3 月

A. 試験方法

1. 試験場所 植調研究所内 ガラス温室

2. 供試資材および試験設計

資材名	処理量(g/m ²)	処理時期	処理方法
SF-0512 粉	500	雑草発生前	土壌表層5cm部に均一に混和
	1000		
	1500		

3. 試験規模 0.015 m² プラスチックポット 2 反復

4. 供試土壌 火山灰壤土（腐植含量 7.7%、粘土含量 6.7%）、土深 5cm/ポット

5. 資材処理 1 月 27 日 面積相当量をポット内土壌全体に均一に混和した。

6. 検定草種 イヌビエ、エノコログサ、オヒシバ、スズメノカタビラ、メヒシバ（イネ科）、アメリカセンダングサ、ノボロギク、ハキダメギク（キク科）、イヌガラシ、カラシナ（アブラナ科）、オランダミミナグサ、ハコベ（ナデシコ科）、イヌタデ（タデ科）、エノキグサ（トウダイグサ科）、カヤツリグサ（カヤツリグサ科）、シロザ（アカザ科）、スベリヒユ（スベリヒユ科）、ツユクサ（ツユクサ科）、ホソアオゲイトウ（ヒユ科）、ヤエムグラ（アカネ科）、ヤハズソウ（マメ科）

7. 雑草播種 1 月 27 日播種

ヒノキ葉粉末を混和した後、雑草種子を土壌表面に播種し、表層から 1cm 程度を軽く混和した。

8. 管 理 雑草播種後は十分に灌水し、その後は表層が乾く度（2～3 日毎）に灌水を行った。

3 月 15 日に追肥（液肥灌注）を行った。

9. 調 査 適宜観察調査を行い、成績は処理後 19 日、33 日、61 日目の残草量対無処理区比(%)を記載した。

10. 温度条件 温室内は最低温度を 20℃に設定し、その温度を下回らない条件で試験を実施した。

また日中の高温時は一時的に窓を開け換気を行った。

B. 試験結果および考察

1. 試験結果

雑草名	処理量 (g/m ²)	除草効果(残草量対無処理区比%)			無処理(ノット) 上:本数、下:生重
		処理後19日目	処理後33日目	処理後61日目	
イヌビエ (イネ科)	500	13	10	18	320
	1000	18	13	20	16.56
	1500	13	10	15	
エノログサ (イネ科)	500	7	7	14	34
	1000	10	10	13	3.04
	1500	8	8	10	
オヒシバ (イネ科)	500	6	5	2	92
	1000	3	2	2	2.54
	1500	2	1	t	
スズメノカタビラ (イネ科)	500	15	10	9	199
	1000	6	4	4	2.2
	1500	6	5	5	
メシバ (イネ科)	500	13	9	6	391
	1000	15	8	7	8.32
	1500	10	8	6	
アメリカセンダングサ (キク科)	500	—	20	30	25
	1000	—	4	20	1.78
	1500	—	0	13	
ノボロギク (キク科)	500	7	3	6	72
	1000	5	3	6	4.6
	1500	5	3	5	
ハキダメギク (キク科)	500	3	2	1	40
	1000	t	t	t	3.72
	1500	0	0	0	
イヌガラシ (アブラナ科)	500	0	0	2	10
	1000	0	0	4	2.7
	1500	0	0	0	
カラシナ (アブラナ科)	500	13	20	23	128
	1000	7	8	12	5.46
	1500	3	4	4	
オランダミナグサ (ナデシコ科)	500	0	t	t	100
	1000	0	0	0	3.48
	1500	0	0	0	
ハコベ (ナデシコ科)	500	3	3	3	443
	1000	2	2	1	668
	1500	1	2	t	
イヌタデ (タデ科)	500	0	3	4	10
	1000	0	2	t	0.93
	1500	0	2	t	
エノキグサ (トウダイグサ科)	500	9	15	15	85
	1000	10	15	13	4.92
	1500	4	8	8	
カヤツリグサ (カヤツリグサ科)	500	20	4	3	62
	1000	6	2	t	1.15
	1500	0	t	t	
シロサ (アカサ科)	500	t	t	t	93
	1000	t	t	t	2.14
	1500	t	t	t	

注)アメリカセンダングサの処理後19日目は無処理区も未発生。無処理区採取調査は処理後61日目調査。

網掛  は対無処理区比10%以下、 は11~20%を示す。

試験結果続き

雑草名	処理量 (g/m ²)	除草効果(残草量対無処理区比%)			無処理(/ポット) 上:本数、下:生重
		処理後19日目	処理後33日目	処理後61日目	
スベリヒユ (スベリヒユ科)	500	t	1	t	120
	1000	t	t	t	0.88
	1500	0	0	t	
ツユクサ (ツユクサ科)	500	15	50	45	24
	1000	20	55	70	10.55
	1500	18	60	70	
ホソアオゲイトウ (ヒユ科)	500	t	1	1	72
	1000	t	t	t	1.22
	1500	0	0	t	
ヤエムグラ (アカネ科)	500	3	8	8	98
	1000	t	6	6	4.82
	1500	0	3	3	
ヤハスソウ (マメ科)	500	50	50	40	60
	1000	55	55	40	4.38
	1500	40	40	30	

注) 無処理区抜取調査は処理後61日目調査。

網掛  は対無処理区比10%以下、 は11~20%を示す。

2. 各草種に対する除草効果

処理量 (g/m ²)	除草効果				
	極大		大	中	小
500	オシバ スズメノカタビラ メシバ ノボロギク ハキダメキク イヌガラシ オランダミナグサ	ハコベ イヌタデ カヤツリグサ シロサ スベリヒユ ホソアオゲイトウ ヤエムグラ	イヌビエ エノコログサ エノキグサ	アメリカセンダングサ カラシナ ヤハスソウ	ツユクサ
1000	オシバ スズメノカタビラ メシバ ノボロギク ハキダメキク イヌガラシ オランダミナグサ	ハコベ イヌタデ カヤツリグサ シロサ スベリヒユ ホソアオゲイトウ ヤエムグラ	イヌビエ エノコログサ アメリカセンダングサ カラシナ エノキグサ	ヤハスソウ	ツユクサ
1500	エノコログサ オシバ スズメノカタビラ メシバ ノボロギク ハキダメキク イヌガラシ カラシナ オランダミナグサ	ハコベ イヌタデ エノキグサ カヤツリグサ シロサ スベリヒユ ホソアオゲイトウ ヤエムグラ	イヌビエ アメリカセンダングサ	ヤハスソウ	ツユクサ

注) 除草効果 極大: 残草量対無処理区比0~10%、大: 同11~20%、中: 同21~40%、小: 同41%以上

3. 考察

S F-0512 粉剤 (ヒノキ葉粉末) の 500、1000、1500g/m² の 3 処理量について土壌混和处理を行い、一年生雑草 13 科 21 草種に対する雑草発生前処理での除草効果について検討を行った。

対象雑草に発生防止および発生後の生育抑制効果が認められた。

アメリカセンダングサ、カラシナに対しては 500g 処理では発生防止効果が弱く、発生後の生育もみられ除草効果が劣ったが、1000g 以上で発生防止効果が強く高い効果が認められた。ツユクサ、ヤハズソウに対しては 1500g/m² の処理量でも無処理区と同程度の発生および生育がみられ効果は不十分であった。

イネ科雑草は各処理量ともに処理後 10 日頃から無処理区と同等量の発生が認められたが、その後の生育は抑制され残草量は少なかった。

以上より、ツユクサ、ヤハズソウに対し効果が劣る傾向であったが、その他の草種に対しては処理量 1000g(標準量)以上を土壌混和することで発生防止効果が認められ、除草資材として実用性があると考えられる。

本試験では、処理後の残効期間については十分な評価が出来なかったため、この点についてさらに検討する必要があると考えられる。

3 安全性に関する資料の概要

(1) 薬害

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)	2 0 0 0
LD ₅₀ (mg/kg)	雌 2 0 0 0 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	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

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JDreamⅡ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
L D 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：7 2 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㈱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 - 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）に収容した。1ケージに収容する動物数は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 / 3 ^a
2000	2nd	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	
	Step		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.

Table 3 Body weight - Individual values in female rats

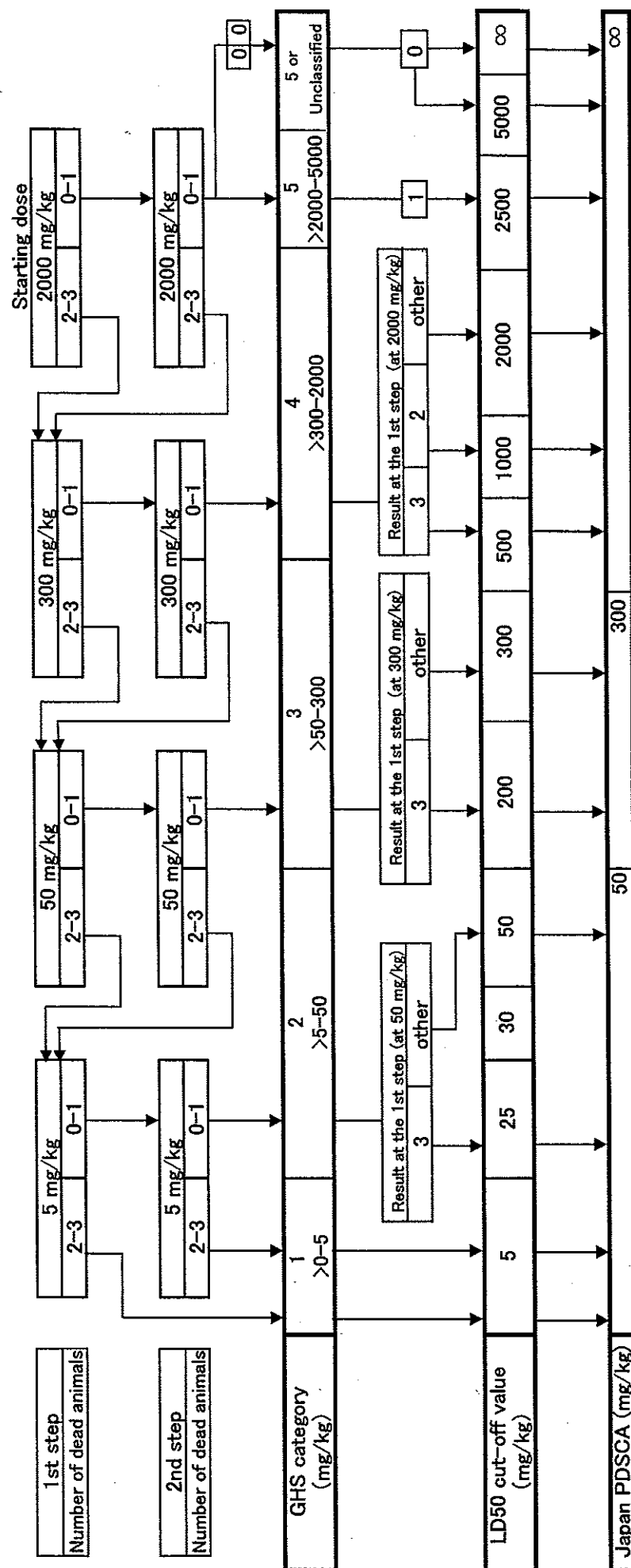
Dose (mg/kg)	Step	Animal number	Before administration	Days after administration	
				7	14
2000	1st	101	177	219	238
		102	184	224	244
		103	172	212	221
2000	2nd	104	184	224	240
		105	169	198	210
		106	173	204	227

Table 4 Necropsy - Incidence of macroscopic lesion in female rats

Site and lesion	Dose (mg/kg)		2000		2000	
	Step		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

			<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>
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.

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

ヒノキ葉粉末のモルモットにおける
皮膚感作性試験
・Buehler 法・
(試験番号 IET 03-0027)

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 / 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：ヒノキ葉粉末のモルモットにおける皮膚感作性試験

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，2-1-6，2000年）

記録等の保管

当該試験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. 被験物質および陽性対照物質の投与液調製	8
4.4. 投与群および使用動物数	9
4.5. 投与方法	9
4.6. 皮膚反応の観察	10
4.7. 皮膚感作率の算出	10
4.8. 皮膚反応強度の算出	11
4.9. 皮膚感作性の評価	11
4.10. 臨床症状	11
4.11. 体重測定	11
5. 試験成績	12
5.1. 惹起による皮膚反応	12
5.2. 感作による皮膚反応	12
5.3. 臨床症状	13
5.4. 体重	13
6. 考察および結論	14
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	15

目次 (続き)

	頁
8. 参考文献	16

TABLE

1. Summary of skin reaction for the challenge phase	17
---	----

APPENDICES

1. Score of skin reaction for the challenge phase - Individual data	18
2. Score of skin reaction for the induction phase - Individual data	22
3. Clinical signs - Individual data	26
4. Body weight - Individual values	30

1. 要約

ヒノキ葉粉末をハートレイ系 SPF 雌モルモットの皮膚に投与し、その皮膚感作性を検索した。試験はモルモットを用いた Buehler 法^{a)}に従い実施した。皮膚反応の採点は Magnusson and Kligman の基準^{b)}に従った。感作陽性対照物質としては DNCB (2,4-dinitrochlorobenzene) を用いた。

投与群は、被験物質投与群（感作・惹起とも被験物質を投与する群）、被験物質に対する陰性対照群（感作では被験物質を用いず、惹起でのみ被験物質を投与する群）、DNCB 投与群（感作・惹起とも DNCB を投与する群）および DNCB に対する陰性対照群（感作では DNCB を用いず、惹起でのみ DNCB を投与する群）の 4 群を設定した。被験物質投与群には 20 匹、その陰性対照群には 10 匹、DNCB 投与群には 10 匹、およびその陰性対照群には 5 匹の動物を供試した。感作および惹起経皮貼付濃度は、被験物質でいずれも 25% (w/v)、DNCB でそれぞれ 1.0 および 0.1% (w/v) とした。惹起経皮貼付除去後 24 および 48 時間に皮膚反応を観察し、皮膚感作率および皮膚反応強度を算出した。

被験物質投与群では 20 例全例が評点 0（肉眼的に変化なし）であった。一方、被験物質に対する陰性対照群では 10 例全例とも評点 0 であったことから、被験物質投与群における感作陽性の評点基準を評点 1（散在性の軽度の紅斑）以上とした。その結果、本被験物質の皮膚感作率は 0% と算出され、感作性評価区分では I（微弱）に分類された。

DNCB 投与群では 10 例全例が評点 2（中等度およびび漫性の紅斑）であった。一方、DNCB に対する陰性対照群では 5 例全例とも評点 0 であったことから、評点 1 以上を陽性と判定した。この結果、DNCB の皮膚感作率は 100% と算出され、感作性評価区分では V（極度）に分類された。

皮膚反応強度において、各群の惹起経皮貼付除去後 24 および 48 時間の観察時における 1 匹当たりの平均皮膚反応強度（点数の総和／供試動物数）は、被験物質投与群では除去後 24 および 48 時間とも 0、被験物質に対する陰性対照群では両観察時とも 0 であった。一方、DNCB 投与群では除去後 24 時間で 2.00、48 時間で 1.90、DNCB に対する陰性対照群で両観察時とも 0 であった。

以上の結果から、モルモットを用いた皮膚感作性試験（Buehler 法）において、本被験物質の皮膚感作性は陰性であると判定した。

2. 試験目的

当該試験はヒノキ葉粉末の皮膚感作性を検索するため、モルモットの Buehler 法を用いて行った。

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

試験には日本チャールス・リバー株式会社筑波飼育センターにより生産されたハートレイ系 SPF モルモット (Crj:Hartley) の雌動物を用いた。動物は 5 週齢にて購入し (入荷動物数 50 匹, 入荷時体重範囲 298 ~ 334 g), 試験環境に 8 日間検疫・馴化した。検疫・馴化期間中に体重増加および健康状態を確認したが異常が認められなかったため, 6 週齢にて試験に供した。第 1 回感作経皮貼付時における動物の体重の平均値 (最小値~最大値) は 379 g (340 ~ 408 g) であった。第 1 回感作経皮貼付終了後余剰動物 5 匹は試験より除外した。

4.2. 動物飼育管理

4.2.1. 飼育方法

室温 23℃, 湿度 55%, 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設置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 5 匹ずつ収容し, 飼育した。各ケージには試験番号, 被験物質名, 試験の種類, 投与群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

飼料には保証飼料である固型飼料 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により自由に摂取させた。

水は急速濾過・活性炭吸着装置と次亜塩素酸ナトリウムにより浄化・殺菌した井戸水を自動給水装置 (トキワ科学器械株式会社) および給水瓶により自由に摂取させた。

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。

4.2.3. 動物の群分けおよび個体識別

入荷時に無作為に各ケージに分配した動物について、馴化期間終了時に試験供試動物の選定を行った後、原則としてケージ番号の小さい順に各群に振り分ける方法で、各陰性対照群との体重の平均値がほぼ同様になるように、群分けを行った。

ケージ内での各動物の個体識別は、ピクリン酸飽和70%エタノール溶液に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 右前肢	No. 2 左前肢	No. 3 右後肢
No. 4 左後肢	No. 5 無染色	

4.3. 被験物質および陽性対照物質の投与液調製

被験物質および陽性対照物質は調製前に乳鉢等により微粉末化して用いた。被験物質および陽性対照物質の投与液は、感作あるいは惹起経皮貼付直前に調製した。

4.3.1. 被験物質

本試験に先立ち、被験物質の予備調製で被験物質を脱イオン水 (G-10C, オルガノ株式会社, を用いて製造) に混合した時に 50% (w/v) 濃度では脱イオン水との混合が十分できないことから投与不可能と判断した。しかし、25%以下の濃度では懸濁可能であることを確認した。したがって、本試験では賦形剤として感作および惹起投与とも脱イオン水を選択し、25%以下の濃度で感作および惹起経皮貼付濃度を決定するための予備試験を行ったところ以下の成績を得た。

被験物質投与前日にモルモットの左右側腹部被毛を電気バリカンおよび電気カミソリにて剪毛、剃毛した。被験物質を6匹の動物に閉塞経皮貼付により6時間経皮投与した。すなわち、被験物質を脱イオン水で懸濁することにより調製した 1% (w/v) および 25% 濃度の薬液を3匹の動物の左右側腹部皮膚に、5% および 10% 濃度の薬液を3匹の動物の左右側腹部皮膚に、各濃度それぞれ 0.2 ml 投与した。貼付除去後 24 時間に観察、採点を行った。閉塞貼付、観察および採点は本試験と同様の方法で行った。その結果、25%以下の濃度で刺激性変化は認められなかった。

したがって、本試験における感作経皮貼付濃度および惹起経皮貼付濃度とも 25% (w/v) を選択することにした。

4.3.2. 陽性対照物質

陽性対照物質として DNCB (2,4-dinitrochlorobenzene) (Lot No. FHH01, 純度 99.0%, 東京化成工業株式会社) を用いた。陽性対照物質の感作経皮貼付薬液には、当研究所の背

景データに基づき、80%エタノール（和光純薬工業株式会社）に溶解した1%（w/v）濃度のDNCB溶液を用い、惹起経皮貼付薬液には、アセトン（和光純薬工業株式会社）に溶解した0.1%（w/v）濃度のDNCB溶液を用いた。

4.4. 投与群および使用動物数

投与群は、感作・惹起とも本被験物質を投与する被験物質投与群（A群）、感作投与では被験物質を用いず、惹起でのみ被験物質を投与する被験物質に対する陰性対照群（B群）、感作・惹起ともDNCBを投与するDNCB投与群（C群）および感作投与ではDNCBを用いず、惹起でのみDNCBを投与するDNCBに対する陰性対照群（D群）の4群とし、A群では20匹（動物番号1～20）、B群では10匹（動物番号21～30）、C群では10匹（動物番号31～40）、D群では5匹（動物番号41～45）の動物を試験に用いた。

4.5. 投与方法

4.5.1. 第1回感作経皮貼付

投与前日に供試動物全例の左肩甲部被毛を電気バリカンおよび電気カミソリにて剪毛および剃毛し、投与区画（2×2 cm）を設けた。

A群では5×5 cmの閉塞性サージカルテープ（Blenderm®, 3M Co.）上にのせたリント布パッチ（2×2 cm）に25%濃度の被験物質の感作経皮貼付薬液を注射筒を用いて0.2 ml滴下し、この面を投与部位の皮膚にあてた。C群ではサージカルテープ上にのせたリント布に1%濃度のDNCBの貼付薬液0.2 mlをピペットを用い滴下し、このリント布面を剪毛・剃毛した左肩部の投与部位にあてた。その上をサージカルテープ（Transpore®, 3M Co.; 7.5×40 cm）で動物の胴体をしっかりと巻き、閉塞貼付した。

B群では被験物質の感作経皮貼付薬液の溶媒である脱イオン水0.2 mlを用い、D群ではDNCBの感作経皮貼付薬液の溶媒である80%エタノール0.2 mlを用いAおよびC群と同様の閉塞貼付を行った。

各群とも貼付物は6時間後に除去した。

4.5.2. 第2回感作経皮貼付

投与は第1回感作経皮貼付後7日に行い、各群とも第1回感作経皮貼付と同じ部位に同様の処置を行った。

4.5.3. 第3回感作経皮貼付

投与は第1回感作経皮貼付後14日に行い、各群とも第1回感作経皮貼付と同じ部位に同様の処置を行った。

4.5.4. 惹起経皮貼付

投与は第1回感作経皮貼付後28日に行った。投与前日に供試動物全例について左右側腹部の被毛を剪毛・剃毛し、左右の投与区画(2×2 cm)2ヵ所を設けた。

AおよびB群では25%濃度の被験物質の惹起経皮貼付薬液0.2 mlを、CおよびD群では0.1%濃度のDNCBの惹起経皮貼付薬液0.2 mlを、左側腹部の投与区画に閉塞貼付した。閉塞貼付は感作経皮貼付と同様に、各群とも閉塞性サージカルテープ(5×5 cm)上にのせたリント布に惹起経皮貼付薬液0.2 mlを滴下し、この塗布面を貼付部位の皮膚にあて投与した。

AおよびB群の右側腹部には被験物質の惹起経皮貼付薬液の溶媒である脱イオン水0.2mlを、またCおよびD群の右側腹部にはDNCBの惹起経皮貼付薬液の溶媒であるアセトン0.2 mlを用い、左側腹部と同様の処置を行った。

これら貼付物が皮膚から外れないように、粘着性伸縮包帯(7.5×40 cm, Silkytex®, アルケア株式会社)で胴体をしっかりと巻いた。

各群とも貼付物は6時間後に除去した。

4.6. 皮膚反応の観察

4.6.1. 惹起における皮膚反応の観察

観察は惹起経皮貼付除去後24および48時間に行い、48時間の時点で観察を終了した。

惹起経皮貼付除去後24時間の観察の約3時間前に左右側腹部の被毛を剃毛した。各群の全例について惹起による側腹部皮膚の紅斑、浮腫の程度を肉眼的に観察し、以下に示す基準に従って採点した。

	点数
肉眼的に変化なし	0
散在性の軽度の紅斑	1
中等度およびび漫性の紅斑	2
重度の紅斑および浮腫	3

4.6.2. 感作における皮膚反応

第1回感作投与後1, 8, 15日(3回の各感作投与の翌日)に供試動物全例の感作貼付部位における紅斑および浮腫の程度を肉眼的に観察し、惹起における皮膚反応採点基準(4.6.1. 惹起における皮膚反応の観察)に用いた基準に従って採点した。

4.7. 皮膚感作率の算出

各動物において、惹起経皮貼付除去後24および48時間の観察時に採点された点数のうち、最高点をその動物の評点とした。被験物質投与群および陽性対照物質投与群において、それぞれの陰性対照群に認められた最高評点より高い値の評点(ただし評点1以上)を示し

たものを感作陽性動物とした。皮膚感作率は〔(感作陽性動物数／使用動物数) × 100〕として算出した。

4.8. 皮膚反応強度の算出

惹起経皮貼付除去後24および48時間の観察時期ごとに各動物の点数を総和し、これを供試動物数で除することにより、各群の両観察時期における1匹当たりの平均皮膚反応強度を算出した。

4.9. 皮膚感作性の評価

得られた皮膚感作率を以下に示す基準⁶⁾に当てはめ、皮膚感作性を評価した。

感作率 (%)	区分	程度
0 - 8	I	微弱
9 - 28	II	軽度
29 - 64	III	中等度
65 - 80	IV	重度
81 - 100	V	極度

4.10. 臨床症状

全動物について第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回ケージの外から観察した。

4.11. 体重測定

第1回感作経皮貼付前と惹起経皮貼付除去後48時間の観察終了時にすべての動物の体重を測定した。

5. 試験成績 (Table 1, Appendices 1 - 4)

各群の惹起による皮膚反応強度と皮膚感作率を Table 1に、惹起による皮膚反応の個体別の点数をAppendix 1に、感作による皮膚反応の個体別の点数をAppendix 2に示す。各動物の臨床症状をAppendix 3に、体重をAppendix 4に示す。

5.1. 惹起による皮膚反応

5.1.1. 皮膚感作率

被験物質投与群では20例中全例が評点0（肉眼的に変化なし）であった。一方、被験物質に対する陰性対照群では10例全例とも評点0であったことから、被験物質投与群における感作陽性の評点基準を評点1（散在性の軽度の紅斑）以上とした。その結果、本被験物質の皮膚感作率は0%と算出された。

DNCB投与群では10例中全例が評点2（中等度および慢性の紅斑）であった。一方、DNCBに対する陰性対照群では5例全例とも評点0であったことから、評点1以上を陽性と判定した。この結果、DNCBの皮膚感作率は100%と算出された。

5.1.2. 皮膚反応強度

各群の惹起経皮貼付除去後24および48時間の観察時における1匹当たりの平均皮膚反応強度は、被験物質投与群では除去後24および48時間とも0、被験物質に対する陰性対照群では両観察時とも0であった。一方、DNCB投与群では除去後24時間では2.00、48時間では1.90、DNCBに対する陰性対照群で両観察時とも0であった。

5.2. 感作による皮膚反応

被験物質投与群における第1回感作投与後1, 8, 15日の観察では20例全例とも評点0（肉眼的に変化なし）であった。被験物質に対する陰性対照群の観察では、いずれの感作投与後においても10例全例とも評点0であった。

一方、DNCB投与群における第1回感作投与後1日の観察では10例中7例が評点1、3例が評点2であった。第1回感作投与後8日の観察では10例中2例が評点2、7例が評点3（重度の紅斑および浮腫）、15日の観察では10例全例が評点3（重度の紅斑および浮腫）であった。

これら皮膚反応に加え、DNCB投与群では第1回感作投与後8および15日に感作投与部位の痂皮が8例に観察された。その他の動物ではこれらの皮膚反応は観察されなかった。

5.3. 臨床症状

DNCB投与群において、背部皮膚の痂皮が第1回感作投与後6日に8例、15日に10例全例に観察された。背部皮膚のびらん・潰瘍が第1回感作投与後21日に4例、24日に3例認められた。これら症状は第1回感作投与後27日に2例が消失したが、8例は30日（観察終了時）まで認められた。その他の群の動物では観察期間を通して症状は観察されなかった。

5.4. 体重

惹起経皮貼付除去後48時間の観察終了時において、すべての動物で第1回感作経皮貼付前と比べ体重が増加した。

6. 考察および結論

本試験において、被験物質投与群の皮膚感作率は0%であったことから、本被験物質の皮膚感作性は区分Iの微弱に分類された。また、貼付除去後24および48時間の平均皮膚反応強度はともに0であった。

一方、DNCB投与群の皮膚感作率は100%であったことから、皮膚感作性は区分Vの極度と分類された。各観察時期の皮膚反応強度は明確な反応（貼付除去後24時間で2.00, 48時間で1.90）を示した。これらのことは当該試験の信頼性を十分保証しているものと考えられる。

DNCB投与群の感作投与部位における皮膚反応の観察では、第1回感作投与後1日の皮膚反応よりも8および15日では皮膚反応が増強した。これら感作皮膚部位での皮膚反応はDNCBの累積性の皮膚刺激などによるものと思われた。

以上のことから、モルモットを用いた皮膚感作性試験（Buehler 法）において、本被験物質は皮膚感作性が陰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。

8. 参考文献

- a) Ritz, H.L. and Buehler, E.V. (1980) Planning, conduct, and interpretation of guinea pig sensitization patch tests. In "Current Concepts in Cutaneous Toxicity" (Drill, V.A. and Lazar, P., eds.), pp. 25-40, Academic Press, New York.
- b) Magnusson, B. and Kligman, A. M. (1969). The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. J. Invest. Dermatol., 52:268-276.

Table 1 Summary of skin reaction for the challenge phase

Group	N	Intensity of skin reaction		Sensitization rate	
		24 hr ^a	48 hr ^a	Fraction	%
Test substance-treated group	20	0	0	0/20	0
Negative control group to test substance	10	0	0	-	
DNCB- treated group	10	2.00	1.90	10/10	100
Negative control group to DNCB	5	0	0	-	

N: No. of animals examined.

a: Time after the challenge.

Appendix 1- 1 Score of skin reaction for the challenge phase - Individual data

Test substance- treated group

Animal number	Score of skin reaction at:		Decision of sensitization
	24 hr ^a	48 hr ^a	
1	0	0	-
2	0	0	-
3	0	0	-
4	0	0	-
5	0	0	-
6	0	0	-
7	0	0	-
8	0	0	-
9	0	0	-
10	0	0	-
11	0	0	-
12	0	0	-
13	0	0	-
14	0	0	-
15	0	0	-
16	0	0	-
17	0	0	-
18	0	0	-
19	0	0	-
20	0	0	-
Intensity of skin reaction	0	0	

a: Time after the challenge.

- : Negative.

Score of skin reaction: 0, No reaction;

1, Scattered mild redness;

2, Moderate and diffuse redness;

3, Intense redness and swelling.

Appendix 1- 2 Score of skin reaction for the challenge phase - Individual data

Negative control group to test substance

Animal number	Score of skin reaction at:	
	24 hr ^a	48 hr ^a
21	0	0
22	0	0
23	0	0
24	0	0
25	0	0
26	0	0
27	0	0
28	0	0
29	0	0
30	0	0
Intensity of skin reaction	0	0

a: Time after the challenge.

Score of skin reaction: 0, No reaction;

1, Scattered mild redness;

2, Moderate and diffuse redness;

3, Intense redness and swelling.

Appendix 1- 3 Score of skin reaction for the challenge phase - Individual data

DNCB- treated group

Animal number	Score of skin reaction at:		Decision of sensitization
	24 hr ^a	48 hr ^a	
31	2	2	+
32	2	2	+
33	2	2	+
34	2	2	+
35	2	2	+
36	2	2	+
37	2	2	+
38	2	2	+
39	2	2	+
40	2	1	+
Intensity of skin reaction	2.00	1.90	

a: Time after the challenge.

+: Positive.

Score of skin reaction: 0, No reaction;

1, Scattered mild redness;

2, Moderate and diffuse redness;

3, Intense redness and swelling.

Appendix 1- 4 Score of skin reaction for the challenge phase -
 Individual data
 Negative control group to DNCB

Animal number	Score of skin reaction at:	
	24 hr ^a	48 hr ^a
41	0	0
42	0	0
43	0	0
44	0	0
45	0	0
Intensity of skin reaction	0	0

a: Time after the challenge.

Score of skin reaction: 0, No reaction;

1, Scattered mild redness;

2, Moderate and diffuse redness;

3, Intense redness and swelling.

Appendix 2- 1 Score of skin reaction for the induction phase - Individual data

Test substance- treated group

Animal number	Score of skin reaction on:			Other skin reactions
	Day 1	Day 8	Day 15	
1	0	0	0	NAD
2	0	0	0	NAD
3	0	0	0	NAD
4	0	0	0	NAD
5	0	0	0	NAD
6	0	0	0	NAD
7	0	0	0	NAD
8	0	0	0	NAD
9	0	0	0	NAD
10	0	0	0	NAD
11	0	0	0	NAD
12	0	0	0	NAD
13	0	0	0	NAD
14	0	0	0	NAD
15	0	0	0	NAD
16	0	0	0	NAD
17	0	0	0	NAD
18	0	0	0	NAD
19	0	0	0	NAD
20	0	0	0	NAD

Day 0 = The day of first induction.

Score of skin reaction: 0, No reaction;

1, Scattered mild redness;

2, Moderate and diffuse redness;

3, Intense redness and swelling.

NAD: No abnormalities detected.

Appendix 2- 2 Score of skin reaction for the induction phase - Individual data

Negative control group to test substance

Animal number	Score of skin reaction on:			Other skin reactions
	Day 1	Day 8	Day 15	
21	0	0	0	NAD
22	0	0	0	NAD
23	0	0	0	NAD
24	0	0	0	NAD
25	0	0	0	NAD
26	0	0	0	NAD
27	0	0	0	NAD
28	0	0	0	NAD
29	0	0	0	NAD
30	0	0	0	NAD

Day 0 = The day of first induction.

Score of skin reaction: 0, No reaction;

1, Scattered mild redness;

2, Moderate and diffuse redness;

3, Intense redness and swelling.

NAD: No abnormalities detected.

Appendix 2- 3 Score of skin reaction for the induction phase - Individual data

DNCB- treated group

Animal number	Score of skin reaction on:			Other skin reactions
	Day 1	Day 8	Day 15	
31	2	3	3	Scab (Days 8, 15)
32	1	3	3	Scab (Days 8, 15)
33	1	2	3	NAD
34	1	2	3	NAD
35	1	3	3	Scab (Days 8, 15)
36	1	3	3	Scab (Days 8, 15)
37	2	3	3	Scab (Days 8, 15)
38	1	3	3	Scab (Days 8, 15)
39	2	3	3	Scab (Days 8, 15)
40	1	3	3	Scab (Days 8, 15)

Day 0 = The day of first induction.

Score of skin reaction: 0, No reaction;

1, Scattered mild redness;

2, Moderate and diffuse redness;

3, Intense redness and swelling.

NAD: No abnormalities detected.

Appendix 2- 4 Score of skin reaction for the induction phase - Individual data

Negative control group to DNCB

Animal number	Score of skin reaction on:			Other skin reactions
	Day 1	Day 8	Day 15	
41	0	0	0	NAD
42	0	0	0	NAD
43	0	0	0	NAD
44	0	0	0	NAD
45	0	0	0	NAD

Day 0 = The day of first induction.

Score of skin reaction: 0, No reaction;

1, Scattered mild redness;

2, Moderate and diffuse redness;

3, Intense redness and swelling.

NAD: No abnormalities detected.

Appendix 3- 1 Clinical signs - Individual data

Test substance- treated group

Animal number	Day of signs noted ^a	Clinical signs
1	0- 30	No abnormalities detected
2	0- 30	No abnormalities detected
3	0- 30	No abnormalities detected
4	0- 30	No abnormalities detected
5	0- 30	No abnormalities detected
6	0- 30	No abnormalities detected
7	0- 30	No abnormalities detected
8	0- 30	No abnormalities detected
9	0- 30	No abnormalities detected
10	0- 30	No abnormalities detected
11	0- 30	No abnormalities detected
12	0- 30	No abnormalities detected
13	0- 30	No abnormalities detected
14	0- 30	No abnormalities detected
15	0- 30	No abnormalities detected
16	0- 30	No abnormalities detected
17	0- 30	No abnormalities detected
18	0- 30	No abnormalities detected
19	0- 30	No abnormalities detected
20	0- 30	No abnormalities detected

a: The day after first induction (Day 0 = The day of first induction).

Appendix 3- 2 Clinical signs - Individual data

Negative control group to test substance

Animal number	Day of signs noted ^a	Clinical signs
21	0- 30	No abnormalities detected
22	0- 30	No abnormalities detected
23	0- 30	No abnormalities detected
24	0- 30	No abnormalities detected
25	0- 30	No abnormalities detected
26	0- 30	No abnormalities detected
27	0- 30	No abnormalities detected
28	0- 30	No abnormalities detected
29	0- 30	No abnormalities detected
30	0- 30	No abnormalities detected

a: The day after first induction (Day 0 = The day of first induction).

Appendix 3- 3 Clinical signs - Individual data

DNCB- treated group

Animal number	Day of signs noted ^a	Clinical signs
31	6- 30	Scab in the dorsal region
32	6- 30	Scab in the dorsal region
	21- 23	Erosion and/or ulcer in the dorsal resion
33	15- 30	Scab in the dorsal region
	21- 23	Erosion and/or ulcer in the dorsal resion
34	15- 26	Scab in the dorsal region
35	6- 30	Scab in the dorsal region
	21- 30	Erosion and/or ulcer in the dorsal resion
36	6- 30	Erosion and/or ulcer in the dorsal resion
	24- 30	Erosion and/or ulcer in the dorsal resion
37	6- 30	Scab in the dorsal region
	24- 30	Erosion and/or ulcer in the dorsal resion
38	6- 30	Scab in the dorsal region
	21- 30	Erosion and/or ulcer in the dorsal resion
39	6- 26	Scab in the dorsal region
40	6- 30	Scab in the dorsal region
	24- 30	Erosion and/or ulcer in the dorsal resion

a: The day after first induction (Day 0 = The day of first induction).

Appendix 3- 4 Clinical signs - Individual data

Negative control group to DNCB

Animal number	Day of signs noted ^a	Clinical signs
41	0- 30	No abnormalities detected
42	0- 30	No abnormalities detected
43	0- 30	No abnormalities detected
44	0- 30	No abnormalities detected
45	0- 30	No abnormalities detected

a: The day after first induction (Day 0 = The day of first induction).

Appendix 4- 1 Body weight - Individual values

Test substance- treated group			Negative control group to test substance		
Animal number	Body weight (g)		Animal number	Body weight (g)	
	(A)	(B)		(A)	(B)
1	382	556	21	369	553
2	391	600	22	373	580
3	388	573	23	348	501
4	374	538	24	367	499
5	392	594	25	375	500
6	395	542	26	399	618
7	372	538	27	401	584
8	361	511	28	399	600
9	340	500	29	353	550
10	362	546	30	379	587
11	375	611			
12	370	535			
13	377	526			
14	381	605			
15	374	535			
16	381	551			
17	392	583			
18	367	499			
19	408	647			
20	376	570			
Mean	378	558	Mean	376	557
S.D.	15	39	S.D.	19	44

(A): At the first induction.

(B): 48 hr after the challenge.

S.D.: Standard deviation.

Appendix 4- 2 Body weight - Individual values

DNCB- treated group			Negative control group to DNCB		
Animal number	Body weight (g)		Animal number	Body weight (g)	
	(A)	(B)		(A)	(B)
31	381	564	41	383	604
32	372	506	42	399	655
33	390	544	43	390	592
34	396	577	44	370	574
35	375	530	45	394	573
36	387	580			
37	386	614			
38	380	518			
39	379	589			
40	373	549			
Mean	382	557	Mean	387	600
S.D.	8	34	S.D.	11	34

(A): At the first induction.

(B): 48 hr after the challenge.

S.D.: Standard deviation.

ヒノキ葉粉末のウサギにおける
眼刺激性試験
(試験番号 IET 03-0026)

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眼刺激性試験

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，2-1-5，2000 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. 眼刺激性の評価	9
5. 試験成績	10
5.1. 眼刺激性変化	10
5.2. 臨床症状	10
5.3. 体重	11
6. 考察および結論	12
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	13

目次 (続き)

	頁
TABLES	
1. Summary of eye irritation scores - Group mean values -----	14
2. Scores of eye irritation - Individual values -----	15
3. Other ocular irritation changes -----	17
4. Clinical sign - Individual data -----	18
5. Body weight - Group mean and individual values -----	19
APPENDIX	
1. Scoring of eye irritation -----	20

1. 要約

ヒノキ葉粉末をニュージーランドホワイット種の SPF 雌ウサギ 6 匹の眼に投与し、眼刺激性を評価した。眼刺激性試験は農林水産省の毒性試験指針 (12 農産第 8147 号, 2-1-5, 2000 年) に従い実施した。動物は、被験物質投与後洗眼しない群 (A 群) および 投与 30 秒後に洗眼する群 (B 群) の 2 群に分け、A および B 群とも 3 匹を用いた。

角膜の刺激性変化: 散在性またはび慢性の混濁 (角膜混濁程度 1) が A 群の 2 例に投与後 24 時間の観察で認められた。混濁の範囲は角膜全体の 1/2 以下であった。この角膜の混濁は、投与後 72 時間までに消失した。B 群では観察期間中に角膜の刺激性変化は認められなかった。

虹彩の刺激性変化: A および B 群では観察期間中に虹彩の刺激性変化は認められなかった。

結膜の発赤: 一部の血管が明らかに充血する程度の発赤 (発赤評点 1) が、A 群の全例および B 群の 1 例に投与後 1 時間の観察で認められた。この結膜の発赤は、A 群の 2 例では投与後 24 時間にび慢性の深紅色の紅斑 (発赤評点 2) に変化し、投与後 72 時間までにすべて消失した。B 群では投与後 24 時間までに消失した。

結膜の浮腫: 正常を超える腫脹 (結膜浮腫評点 1) が B 群の 1 例に、眼瞼の外反を伴った明らかな腫脹 (結膜浮腫評点 2) が A 群の全例に投与後 1 時間の観察で認められた。この結膜の浮腫は A 群では投与後 48 時間までに、B 群では投与後 24 時間までに消失した。

その他の眼刺激性変化: 眼瞼および眼瞼に接する被毛を湿潤する分泌物が、A 群の全例に投与後 1 時間の観察で認められた。この分泌物は投与後 48 時間までに消失した。B 群では観察期間中に分泌物は認められなかった。

以上の結果から、本被験物質はウサギの眼粘膜に対し軽度の刺激性があると判定した。また、投与 30 秒後の洗眼に明確な効果が認められた。

2. 試験目的

ヒノキ葉粉末の眼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 03-0025 用動物を含め 12 匹, 入荷時体重範囲: 1956 ~ 2197 g), 飼育環境に 11 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 6 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。被験物質投与約 24 時間前にフルオレスセインおよびスリットランプを用いた眼検査により正常眼動物を選択し, 11 週齢で試験に供した。動物は, 被験物質投与後洗眼しない群(A群)および投与 30 秒後に洗眼する群(B群)の 2 群を設定し, A群では 3 匹 (動物番号 1~3), B群では 3 匹 (動物番号 4~6) を用いた。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 2501 g (2412~2709 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, 投与群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. 動物の群分けおよび個体識別

入荷時に動物を生産業者にて識別された仮番号に従いケージに分配した。馴化期間終了時に試験供試動物の選定を行った後、ケージ番号の小さい順に各群に振り分けた。

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 0.1 g を投与した。

4.3.2. 被験物質の投与方法

被験物質の投与は、左眼の下眼瞼粘膜面に行った。すなわち、左側の下眼瞼を穏やかに眼球から引き離し、その結膜嚢内に被験物質を投与した。その後、被験物質の損失を防ぐために上下の眼瞼を 1 秒間閉じあわせた。なお、B 群における洗眼は投与 30 秒後に、30 秒間微温湯にて行った。いずれの群も右眼を無処置対照眼とした。

4.4. 観察

4.4.1. 観察期間

観察は投与後 1, 24, 48 および 72 時間に行った。刺激性変化が消失したため観察を投与後 72 時間で終了した。

4.4.2. 刺激性変化の採点方法

角膜、虹彩および結膜の被験物質による刺激性変化をスリットランプを用いて観察した。採点は農林水産省の指針に従った(Appendix 1 参照)。

また、角膜の混濁の範囲 (=A) を以下の基準に従って採点した。

	評点
A = 0	0
$0 < A \leq 1/4$	1
$1/4 < A \leq 1/2$	2
$1/2 < A \leq 3/4$	3
$3/4 < A \leq 1$	4

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. 眼刺激性の評価

眼刺激性の評価は(a)刺激性反応の種類, (b)反応の強さ, (c)反応が可逆性または非可逆性であるか, (d)反応がみられた動物の割合, 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：角膜の混濁が認められず, その他の陽性の刺激性変化は投与後7日以内に消失する。
- * 中等度の刺激性：角膜の混濁が投与後7日以内に消失するが, その他の陽性の刺激性変化は7日目も持続している。
- * 重度の刺激性：角膜の混濁が7日目以内に消失しない。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

眼刺激性変化の投与群別の評点の平均値を Table 1 に、その個体別成績を Table 2 に、その他の眼刺激性変化を Table 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. 眼刺激性変化 (Tables 1 - 3)

5.1.1. 角膜の刺激性変化

散在性またはび慢性の混濁（角膜混濁程度 1）が A 群の 2 例に投与後 24 時間の観察で認められた。混濁の範囲は角膜全体の 1/2 以下であった。この角膜の混濁は、投与後 72 時間までに消失した。B 群では観察期間中に角膜の刺激性変化は認められなかった。

5.1.2. 虹彩の刺激性変化

A および B 群では観察期間中に虹彩の刺激性変化は認められなかった。

5.1.3. 結膜の発赤

一部の血管が明らかに充血する程度の発赤（発赤評点 1）が、A 群の全例および B 群の 1 例に投与後 1 時間の観察で認められた。この結膜の発赤は、A 群の 2 例では投与後 24 時間にび慢性の深紅色の紅斑（発赤評点 2）に変化し、投与後 72 時間までにすべて消失した。B 群では投与後 24 時間までに消失した。

5.1.4. 結膜の浮腫

正常を超える腫脹（結膜浮腫評点 1）が B 群の 1 例に、眼瞼の外反を伴った明らかな腫脹（結膜浮腫評点 2）が A 群の全例に投与後 1 時間の観察で認められた。この結膜の浮腫は A 群では投与後 48 時間までに、B 群では投与後 24 時間までに消失した。

5.1.5. その他の眼刺激性変化

眼瞼および眼瞼に接する被毛を湿潤する分泌物が、A 群の全例に投与後 1 時間の観察で認められた。この分泌物は投与後 48 時間までに消失した。B 群では観察期間中に分泌物は認められなかった。

5.2. 臨床症状 (Table 4)

A および B 群では投与後 72 時間までの臨床症状の観察で、被験物質投与によると思われる異常は認められなかった。

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. 考察および結論

非洗眼群（A群）では、角膜および結膜において刺激性変化が認められた。その程度は角膜混濁評点 1, 結膜発赤評点 1 ないし 2, 結膜浮腫評点 2 であった。被験物質投与に関連するその他の眼刺激性変化として眼瞼および眼瞼に接する被毛を湿潤する分泌物が認められた。これら刺激性変化の程度は軽度であり投与後 72 時間までにすべて消失したことから、本被験物質は軽度の刺激性があると判定した。

投与 30 秒後に洗眼する群（B群）では結膜にのみ刺激性変化が認められ、その程度は結膜発赤評点 1, 結膜浮腫評点 1 であった。これらの刺激性変化は投与後 24 時間までにすべて消失した。A群で観察された角膜の刺激性変化および眼瞼および眼瞼に接する被毛を湿潤する分泌物は認められなかった。洗眼群における結膜の刺激性変化は非洗眼群のそれと比べ程度が軽く、発現期間も短かったことより、投与 30 秒後の洗眼に明確な効果があると判断した。

以上のことから、本被験物質はウサギの眼粘膜に対し軽度の刺激性があると判定した。また、投与 30 秒後の洗眼に明確な効果が認められた。

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 eye irritation scores - Group mean values

Group	N	Ocular site	Ocular lesion	Time after application				
				1	24	48	72	hr
A (Eyes unirrigated)	3	Cornea	Opacity	0	0.7	0.3	0	
		Iris		0	0	0	0	
		Conjunc-	Redness	1.0	1.7	0.7	0	
		tivae	Chemosis	2.0	1.7	0	0	
B (Eyes irrigated 30 seconds after application)	3	Cornea	Opacity	0	0	0	0	
		Iris		0	0	0	0	
		Conjunc-	Redness	0.3	0	0	0	
		tivae	Chemosis	0.3	0	0	0	

N: Number of animals examined.

Table 2-1 Scores of eye irritation - Individual values

Group	Animal number	Ocular site ^{a)}	Time after application				
			1	24	48	72 hr	
A (Eyes un- irrigated)	1	Cornea	0	1	0	0	
		Opacity					
		Area ^{b)}	0	2	0	0	
			0	0	0	0	
	2	Iris					
		Conjunctivae	1	2	1	0	
		Redness					
		Chemosis	2	2	0	0	
	3	Cornea	0	1	1	0	
		Opacity					
		Area	0	2	1	0	
			0	0	0	0	
		Iris					
		Conjunctivae	1	2	1	0	
		Redness					
		Chemosis	2	2	0	0	
		Cornea	0	0	0	0	
		Opacity					
		Area	0	0	0	0	
			0	0	0	0	
		Iris					
		Conjunctivae	1	1	0	0	
		Redness					
		Chemosis	2	1	0	0	

a):See Appendix 1.

b):Opacity area:

	score
Zero	0
One quarter (or less), but not zero	1
Greater than one quarter, but less than half	2
Greater than half, but less than three quarters	3
Greater than three quarters, up to whole area	4

Table 2-2 Scores of eye irritation - Individual values

Group	Animal number	Ocular site ^{a)}	Time after application				
			1	24	48	72 hr	
B	4	Cornea	Opacity	0	0	0	0
		Iris Conjunctivae	Area ^{b)}	0	0	0	0
			Redness	0	0	0	0
			Chemosis	0	0	0	0
(Eyes irrigated 30 seconds after application)	5	Cornea	Opacity	0	0	0	0
		Iris Conjunctivae	Area	0	0	0	0
			Redness	1	0	0	0
			Chemosis	1	0	0	0
	6	Cornea	Opacity	0	0	0	0
		Iris Conjunctivae	Area	0	0	0	0
			Redness	0	0	0	0
			Chemosis	0	0	0	0

a): See Appendix 1.

b): Opacity area:

	score
Zero	0
One quarter (or less), but not zero	1
Greater than one quarter, but less than half	2
Greater than half, but less than three quarters	3
Greater than three quarters, up to whole area	4

Table 3 Other ocular irritation changes

Group	Animal number	Time after application			
		1	24	48	72 hr
A (Eyes unirrigated)	1	D	D	-	-
	2	D	D	-	-
	3	D	-	-	-
B (Eyes irrigated 30 seconds after application)	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
	6	-	-	-	-

D: Discharge with moistening of the lids and hairs, just adjacent to lids.

Table 4 Clinical sign - Individual data

Group	Animal number	Day after application			
		0	1	2	3
A (Eyes unirrigated)	1	N	N	N	N
	2	N	N	N	N
	3	N	N	N	N
B (Eyes irrigated 30 seconds after application)	4	N	N	N	N
	5	N	N	N	N
	6	N	N	N	N

N: No abnormalities detected.

Table 5 Body weight - Group mean and individual values

Group	Animal number	Body weight (g)	
		Before application	At the final observation
A (Eyes unirrigated)	1	2709	2802
	2	2433	2542
	3	2572	2634
	Mean	2571	2659
	S.D.	138	132
	4	2434	2552
B (Eyes irrigated 30 seconds after application)	5	2412	2453
	6	2445	2543
	Mean	2430	2516
	S.D.	17	55

S.D.: Standard deviation.

Appendix 1 Scoring of eye irritation

I Cornea		Score
(i) Opacity - degree of density (area most dense taken for reading)		
No ulceration or opacity	0	
Scattered or diffuse areas of opacity (other than slight dulling of normal luster), details of iris clearly visible	1	
Easily discernible translucent area, details of iris slightly obscured	2	
Nacreous area, no details of iris visible, size of pupil barely discernible	3	
Opaque cornea, iris not discernible through the opacity	4	
II Iris		
Normal	0	
Markedly deepened rugae, congestion, swelling, moderate circumcorneal hyperemia, or injection, any of these or combination of any thereof, iris still reacting to light (sluggish reaction is positive)	1	
No reaction to light, hemorrhage, gross destruction (any or all of these)	2	
III Conjunctivae		
(i) Redness (refers to palpebral and bulbar conjunctivae, excluding cornea and iris)		
Blood vessels normal	0	
Some blood vessels definitely hyperemic (injected)	1	
Diffuse, crimson color, individual vessels not easily discernible	2	
Diffuse beefy red	3	
(ii) Chemosis - lids and/or nictitating membranes		
No swelling	0	
Any swelling above normal (includes nictitating membranes)	1	
Obvious swelling with partial eversion of lids	2	
Swelling with lids about half closed	3	
Swelling with lids more than half closed	4	

（３）水産動植物に対する安全性

魚類急性毒性試験 （資料 No.9）

試験機関：（財）化学物質評価研究機構〔G L P 対応〕

報告書作成年：２００５年

公表の有無：なし

検体：ヒノキ葉粉末、ロット番号 SF040901

供試生物：コイ、一群各１０匹

試験方法：半止水式、 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ （水温）

試験結果： LC50 : mg/l

観察時間（h）	24	48	72	96
魚類	>60.0	>60.0	57.8	32.5

ミジンコ類急性遊泳阻害試験 （資料 No.9）

試験機関：（財）化学物質評価研究機構〔G L P 対応〕

報告書作成年：２００５年

公表の有無：なし

検体：ヒノキ葉粉末、ロット番号 SF040901

供試生物：オオミジンコ（*Daphnia magna*）、20 頭

試験方法：止水式、 $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ （水温）

試験結果： EC50 : mg/l

観察時間（h）	24	48
ミジンコ	>320	102

藻類生長阻害試験 （資料 No.10）

試験機関：（財）化学物質評価研究機構〔G L P 対応〕

報告書作成年：２００５年

公表の有無：なし

検体：ヒノキ葉粉末、ロット番号 SF040901

供試生物： *Pseudokirchneriella subcapitata*、3 連／試験区

試験方法：旋回振とう、23 ± 2℃（培養温度）

試験結果：

検出指標	EC50(mg/l)	NOEC(mg/l)
生長曲線下面積	12.5(4.62～33.9)	1.56
24～48時間生長速度	18.3	1.56
24～72時間生長速度	29.0	6.25

陳 述 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 住友林業株式会社

試験の表題 SF0409のコイによる96時間急性毒性試験

試験番号 93508

本最終報告書(写し)は、原本を正確にコピーしたものです。

2005 年 2 月 16 日

試験責任者 穴井 真紀子
穴 井 真紀子

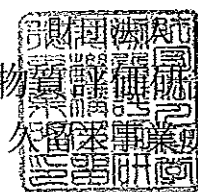
受理番号	E04-3508
試験番号	93508

最 終 報 告 書

SF0409のコイによる96時間急性毒性試験

2005 年 2 月 16 日

化学物質評価研究機構



陳 述 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 住友林業株式会社

試験の表題 SF0409のコイによる96時間急性毒性試験

試験番号 93508

上記試験は以下のGLPに従って実施したものです。

- (1) 「農薬の毒性に関する試験の適正実施に係る基準」(11農産第6283号平成11年10月1日)
- (2) 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)

また、本最終報告書は生データを正確に反映しており、試験データが有効であることを確認しています。

2005 年 2 月 16 日

試験責任者 穴井真紀子
穴 井 真紀子

信 頼 性 保 証 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 住友林業株式会社

試験の表題 SF0409 のコイによる 96 時間急性毒性試験

試験番号 93508

本最終報告書は、試験の方法、手順が正確に記載され、試験結果は生データを正確に反映していることを保証します。

なお、検閲の結果については、下記の通り試験責任者及び運営管理者に報告しました。

検閲内容	検閲日	報告日 (試験責任者及び運営管理者)
試験計画書草案	2005 年 1 月 19 日	2005 年 1 月 19 日
試験計画書	2005 年 1 月 19 日	2005 年 1 月 19 日
暴露開始時	2005 年 1 月 24 日	2005 年 1 月 28 日
暴露開始後	2005 年 1 月 28 日	2005 年 1 月 28 日
生データ、最終報告書草案	2005 年 2 月 10 日	2005 年 2 月 16 日
最終報告書	2005 年 2 月 16 日	2005 年 2 月 16 日

2005 年 2 月 16 日

信頼性保証業務担当者 春口 寿子
春 口 寿 子

目 次

	頁
要 約	5
1. 表 題	6
2. 試験委託者	6
3. 試験施設	6
4. 試験目的	6
5. 試験法	6
6. 適用 GLP	6
7. 試験日程	6
8. 資料の保管	7
9. 試験関係者	7
10. 最終報告書の承認	7
11. 被験物質	8
12. 試験材料と方法	9
13. 試験結果	12
14. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる事項	12
試験結果の表及び図	
表1 累積死亡率	13
表2 観察された症状	13
表3-1 試験液の溶存酸素濃度	14
表3-2 試験液のpH	14
表3-3 試験液の水溫	15
表4 コイに対するLC50	15
図1 96時間における濃度－累積死亡率	16
付属資料 試験用水の水質	
別添資料 予備試験結果	

要 約

SF0409のコイによる96時間急性毒性試験

<試験条件>

- ・被験物質：SF0409
- ・試験生物：コイ(*Cyprinus carpio*)
- ・暴露期間：96時間
- ・試験濃度：60.0、42.9、30.6、21.9(公比1.4)及び9.94 mg/L(公比2.2)の5濃度区及び対照区
- ・試験生物数：10尾／試験区
- ・試験用水：脱塩素水道水
- ・試験方式：半止水式(換水頻度；1回／2日)
- ・試験液の調製：被験物質を試験用水に直接添加して調製
- ・試験液量：50 L／試験区
- ・水 温：23±1℃
- ・照 明：室内灯、16時間明／8時間暗
- ・給 餌：無給餌
- ・エアレーション：あり

<結 果>

- ・96時間LC50(半数致死濃度)：32.5 mg/L(95%信頼限界；27.7～37.8 mg/L)
- ・96時間100%死亡最低濃度：60.0 mg/L
- ・96時間0%死亡最高濃度：9.94 mg/L
- ・NOEC(最大無影響濃度)：9.94 mg/L
(上記濃度は、設定濃度に基づく値)

1. 表 題
SF0409のコイによる96時間急性毒性試験
2. 試験委託者
名 称 住友林業株式会社
所 在 地 (〒100-8270)東京都千代田区丸の内 1-8-1
3. 試験施設
名 称 財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所
所 在 地 (〒839-0801)福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号
TEL (0942) 34-1500
4. 試験目的
被験物質の魚類に対する短期的影響を調べる。
5. 試験法
本試験は以下の試験法に従って行った。
 - (1) 「農薬の登録申請に係る試験成績について(別添)農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針 水産動植物への影響に関する試験魚類急性毒性試験(2-7-1)(平成12年11月24日付け 12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知)」
 - (2) 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」に定める “Fish, Acute Toxicity Test (Guideline 203, 1992)”
6. 適用GLP
本試験は以下の基準を適用した。
 - (1) 「農薬の毒性に関する試験の適正実施に係る基準」(11農産第6283号平成11年10月1日)
 - (2) 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」 (November 26, 1997)
7. 試験日程
 - 1) 試験開始日 2005 年 1 月 19 日
 - 2) 実験開始日 2005 年 1 月 24 日
 - 3) 実験完了日 2005 年 1 月 28 日
 - 4) 試験完了日 2005 年 2 月 16 日

8. 資料の保管

1) 被験物質

被験物質*を保管用容器に入れ密栓後、農薬登録取得後5年間、久留米事業所
試料保管室に保管する。保管期間経過後の処置は試験委託者と協議の上決定す
る。ただし、保管中に品質が著しく変化する物質の保管期間は、その品質が保
管に耐えうる期間とし、廃棄に際しては試験委託者の承認を得る。

* 試験番号93506、93507及び93508についての共用保管試料とする。

2) 生データ、資料等

生データ、試験計画書、その他必要な資料等は最終報告書と共に、農薬登録
取得後15年間、久留米事業所資料保管室に保管する。保管期間終了後の取扱い
については、保管期間終了前に試験委託者と協議する。

9. 試験関係者

試験責任者 穴 井 真紀子
所属 試験第四課

試験担当者 穴 井 真紀子、楢 崎 みゆき、井 上 仁 美

10. 最終報告書の承認

試験責任者

2005年2月16日
氏 名 穴 井 真紀子
穴 井 真紀子

11. 被 験 物 質

試験委託者提供資料による被験物質情報を以下に示す。

- 1) 名 称
ヒノキ防草材
- 2) 略 称
SF0409
- 3) ロット番号
SF040901
- 4) 外 観
粗粉末状、緑色
- 5) 成分及び含有量
不明 (ヒノキ葉の乾燥粉末)
- 6) 安 定 性
水、その他の溶媒、熱、光等に対して安定
- 7) 提 供 者
住友林業株式会社
- 8) 被験物質の確認
受領した被験物質の貼付ラベル及び送付案内の記載内容等が、試験委託者提供の被験物質情報と一致することを確認した。
- 9) 保 管 条 件
試験中の被験物質は室温暗所で保管した。

12. 試験材料と方法

1) 試験生物

(1) 種

コイ (*Cyprinus carpio*)

(2) 生物種選択の理由

テストガイドラインに推奨されている種類である。

(3) 大きさ

全長 5.0 ± 1.0 cm

生物の大きさについては5.(1)に定める規定値を適用した。

(4) 購入先

杉島養魚場(〒866-0024 熊本県八代市郡築一番町 123-2)

(5) 試験生物の順化

生物は供試12日前までに入手した。その後試験条件と同じ水質(脱塩素水道水)、水温($23 \pm 1^\circ\text{C}$)及び明暗周期(16時間明/8時間暗)下で9日間以上順化した。餌はコイ用配合餌料(2C)を1日当り平均魚体重の約2%量与え、供試24時間前から給餌は行わなかった。供試前7日間の死亡率は5%未満であった。また、試験系の再現性を確認するために実施(2005年1月11日～1月15日に実施)した試験生物による基準物質[硫酸銅(Ⅱ)五水和物、試薬特級、和光純薬工業株式会社]の96時間LC50は 0.0778 mg/Lであった。この値は久留米事業所におけるバックグラウンドデータの規定範囲内(平均 $\pm 2 \times$ 標準偏差： $0.0687 \sim 0.318$ mg/L)であった[平均 $\pm$ 標準偏差は 0.194 ± 0.062 mg/L($n=27$)]。

(6) 群分け

無作為に抽出を行った。

2) 試験用水

十分にエアレーションし、温度調節した脱塩素水道水を用いた。使用時に、残留塩素濃度が 0.02 mg/L以下であることを確認した。定期的に測定した試験用水の水質測定結果を付属資料に示す。

3) 試験器具及び装置

(1) 試験器具

50L容ガラス製水槽(縦60.0 cm、横29.5 cm、深さ36.0 cm)

また、ゴミの進入や試験液の蒸散を防ぐため蓋をした。

(2) 試験装置

恒温槽：プラスチック製水槽(加熱冷却装置、佐藤工業株式会社製 加温冷却ユニット HCA250型)

4) 試験条件

(1) 暴露条件

① 方式

被験物質を含む試験液へ試験生物を暴露した。

試験は暴露開始48時間後に試験液の全量を交換する半止水式で行った。

②期 間
96時間

③試験濃度

試験は5濃度区[60.0、42.9、30.6、21.9(公比1.4)及び9.94 mg/L(公比2.2)]で行った。試験濃度及び公比は予備試験結果から決定した。予備試験結果を別添資料に示す。

④対 照 群

被験物質を含まない試験用水のみの対照区を設けた。

⑤試験生物数

10尾／試験区

⑥試験液量

50 L／試験区

(2) 環境条件

①水 温

23±1℃

②溶存酸素濃度(DO)

暴露期間中、試験水温での飽和溶存酸素濃度の60%以上で行った。また、暴露期間中、緩やかなエアレーションを行った。

③pH

試験はpHを調整せずに行った。

④照 明

室内灯による16時間明／8時間暗

⑤給 餌

暴露期間中、給餌を行わなかった。

5) 試験液の調製法

試験容器に入れた試験用水に必要な量の被験物質を添加後、攪拌して調製した。各試験区の調製量に対する被験物質添加量を以下に示す。

試験区(mg/L)	被験物質添加量(g/50 L)
対照区	—
9.94	0.497
21.9	1.095
30.6	1.53
42.9	2.145
60.0	3.00

6) 観察と測定

(1) 試験生物の状態

死亡と症状を暴露開始3、24、48、72及び96時間後に観察した。観察可能な動き(吻、鰓蓋の動き等)がなく、ガラス棒で尾柄部に軽く触れ反応がない個体を死亡とみなした。死亡した個体は確認した時点で、速やかにとり除いた。

(2) 試験生物の全長、体重

暴露終了後、対照区の試験生物について全長、体重を測定した。

(3) 試験液の状態

試験液の状態を暴露開始時及び換水前(48時間後)に観察した。

(4) 水 質

試験液の溶存酸素濃度、pH及び水温を暴露開始時、換水前後及び暴露終了時に測定した。24及び72時間後の水質も測定した。また、全個体が死亡した濃度区については、全個体死亡を確認した時点で測定した。溶存酸素濃度は溶存酸素計58型(Yellow Springs Instruments Co., Inc.)、pHはガラス電極式水素イオン濃度計HM-21P型(東亜ディーケーケー)、水温は検定済ガラス製棒状温度計で測定した。

7) 結果の処理

結果の算出には設定濃度を用いた。

(1) LC50*の算出法

72及び96時間についてはProbit法により算出した。また、それらの95%信頼限界も算出した。なお、24及び48時間については、本試験濃度範囲で50%以上の累積死亡率が得られなかったため、LC50は「>試験最高濃度」と表示した。

*LC50 (Median Lethal Concentration) : 暴露期間において試験生物の50%を死亡させる被験物質濃度を示す。

(2) NOEC(最大無影響濃度)の評価

暴露期間中、対照群と比較して何ら影響が認められない試験最高濃度区をNOEC(No Observed Effect Concentration)とした。

8) 有効性基準

(1) 暴露期間中、対照群における死亡率は10%を超えてはならない。

(2) 暴露期間中の溶存酸素濃度は、試験水温での飽和溶存酸素濃度の60%以上でなければならない。

9) 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 規則Bによった。

13. 試験結果

1) 死亡率

96時間における100%死亡最低濃度は60.0 mg/Lであった。0%死亡最高濃度は9.94 mg/Lであった。各時間での累積死亡率を表1、96時間における濃度－累積死亡率曲線を図1に示す。なお、暴露終了時における対照群の死亡率は0%であり、有効性基準(10%を超えない)を満たしていた。

2) 症状等の観察結果

以下の観察結果は全て対照群との比較に基づくものである。暴露期間中に観察された症状は出血及び活動度の低下であった。対照群では症状は認められなかった。暴露期間中における症状の観察結果を表2に示す。

3) 大きさ[平均値±標準偏差(n=10)]

全長 5.3±0.18 cm

体重 1.6±0.19 g

4) 試験液の観察と測定結果

(1) 試験液の状態

暴露開始時は無色透明で浮遊物及び沈殿物がみられた。その状態は換水前まで変わらなかった。

(2) 試験液の水質

暴露期間中に測定した溶存酸素濃度は6.6～8.8 mg/L、pHは7.3～7.9、水温は22.7～22.9℃であった。試験液の水質を表3-1、3-2及び3-3に示す。なお、溶存酸素濃度は有効性基準(試験水温での飽和濃度の60%以上*)を満たしていた。

* 22～24℃の飽和溶存酸素濃度：8.53～8.25 mg/L(JIS K 0102)

5) LC50

SF0409のコイに対する48時間LC50は>60.0 mg/Lであった。96時間LC50は32.5 mg/L (95%信頼限界：27.7～37.8 mg/L)であった。24時間毎のLC50、95%信頼限界及びLC50算出法を表4に示す。

6) NOEC

暴露期間中に観察された症状及び死亡の結果から、SF0409のコイに対するNOECは9.94 mg/Lであった。

14. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる事項

当該事項はなかった。

表1 累積死亡率

設定濃度 (mg/L)	累積死亡率 (%)				
	3時間	24時間	48時間	72時間	96時間
対照区	0	0	0	0	0
9.94	0	0	0	0	0
21.9	0	0	0	0	10
30.6	0	0	10	10	30
42.9	0	0	0	30	90
60.0	0	0	10	50	100

表2 観察された症状

設定濃度 (mg/L)	観 察 結 果				
	3時間	24時間	48時間	72時間	96時間
対照区	—	—	—	—	—
9.94	—	—	—	—	—
21.9	—	—	—	RA	HEM
30.6	—	—	—	RA	HEM RA
42.9	—	—	RA	RA	HEM RA
60.0	—	—	RA	RA	

—は症状が認められなかったことを示す。

空欄は全個体が死亡したことを示す。

症状の略称

HEM(Hemorrhage) : 出血

RA(Reduced activity) : 活動度の低下

表3-1 試験液の溶存酸素濃度

設定濃度 (mg/L)	0時間	24時間	48時間		72時間	96時間
	開始時		換水前	換水後		終了時
対照区	8.8	7.8	7.4	8.8	8.0	8.2
9.94	8.8	7.9	7.4	8.7	7.9	7.5
21.9	8.8	8.2	7.1	8.7	7.9	7.2
30.6	8.8	8.1	7.3	8.7	7.9	7.3
42.9	8.8	8.2	7.6	8.7	7.7	7.2
60.0	8.8	8.1	7.0	8.7	7.3	6.6*

単位：mg/L

*全個体の死亡を確認した時点で測定した値を示す。

表3-2 試験液のpH

設定濃度 (mg/L)	0時間	24時間	48時間		72時間	96時間
	開始時		換水前	換水後		終了時
対照区	7.9	7.5	7.6	7.8	7.4	7.3
9.94	7.8	7.5	7.7	7.7	7.4	7.4
21.9	7.7	7.6	7.5	7.6	7.5	7.4
30.6	7.7	7.6	7.5	7.6	7.5	7.3
42.9	7.6	7.6	7.5	7.6	7.5	7.3
60.0	7.6	7.6	7.4	7.6	7.4	7.3*

*全個体の死亡を確認した時点で測定した値を示す。

表3-3 試験液の水温

設定濃度 (mg/L)	0時間	24時間	48時間		72時間	96時間
	開始時		換水前	換水後		終了時
対照区	22.7	22.8	22.8	22.7	22.8	22.7
9.94	22.8	22.8	22.8	22.7	22.8	22.7
21.9	22.8	22.9	22.8	22.7	22.8	22.7
30.6	22.9	22.9	22.8	22.7	22.8	22.7
42.9	22.9	22.8	22.8	22.7	22.8	22.7
60.0	22.9	22.8	22.8	22.7	22.8	22.7*

単位：℃

*全個体の死亡を確認した時点で測定した値を示す。

表4 コイに対するLC50

暴露時間	LC50 (mg/L)	95%信頼限界(mg/L)	LC50算出法
24時間	>60.0	—	—
48時間	>60.0	—	—
72時間	57.8	46.0～121	Probit法
96時間	32.5	27.7～37.8	Probit法

—は得られなかったことを示す。

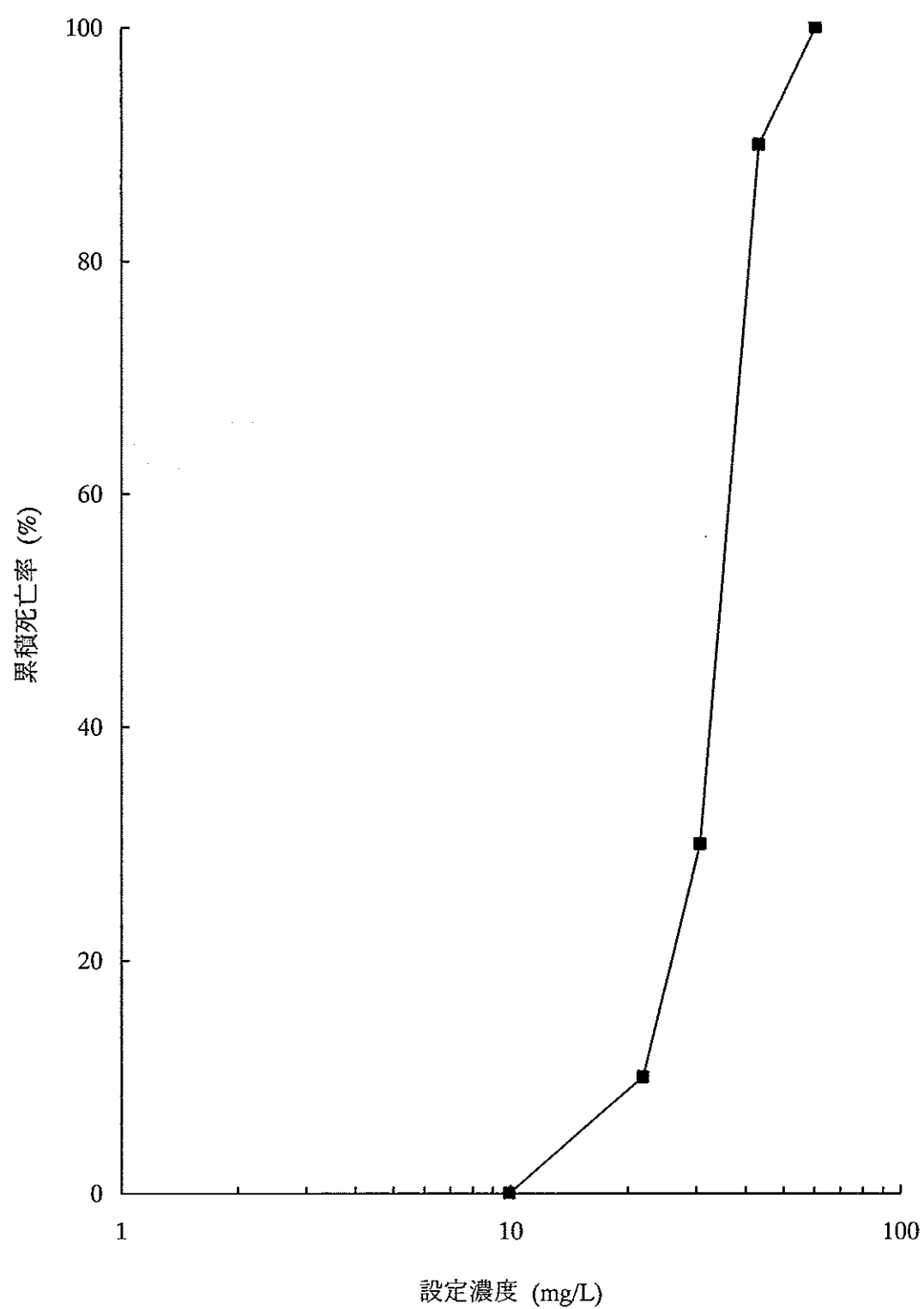


図1 96時間における濃度－累積死亡率

付属資料

試験用水の水質

試験用水の水質(採水日：2005年1月5日)

項 目	単位	検査結果	定量下限
カルシウム、マグネシウム等(硬度)	mg/L	38.8	0.1
浮遊物質	mg/L	1未満	1
pH	—	7.3(22℃)	—
有機体炭素	mg/L	0.3	0.1
化学的酸素要求量	mg/L	0.9	0.5
遊離塩素	mg/L	不検出	0.01
アンモニウム態窒素	mg/L	不検出	0.01
シアン	mg/L	不検出	0.01
アルカリ度	mg/L	36	1
電気伝導率	mS/m	15.8	—
有機りん	mg/L	不検出	0.1
アルキル水銀	mg/L	不検出	0.0005
水銀	mg/L	不検出	0.0005
カドミウム	mg/L	不検出	0.001
六価クロム	mg/L	不検出	0.02
鉛	mg/L	不検出	0.005
ヒ素	mg/L	不検出	0.001
ホウ素	mg/L	不検出	0.02
フッ素	mg/L	不検出	0.1
鉄	mg/L	不検出	0.01
銅	mg/L	不検出	0.005
コバルト	mg/L	不検出	0.001
マンガン	mg/L	不検出	0.01
亜鉛	mg/L	不検出	0.01
アルミニウム	mg/L	不検出	0.001
ニッケル	mg/L	不検出	0.001
銀	mg/L	不検出	0.0001
硫酸イオン	mg/L	17.7	0.1
塩化物イオン	mg/L	15	1
ナトリウム	mg/L	13.5	0.01
カリウム	mg/L	3.3	0.01
カルシウム	mg/L	11.0	0.01
マグネシウム	mg/L	2.8	0.01
1,2-ジクロロプロパン	mg/L	不検出	0.0001
クロロタロニル	mg/L	不検出	0.0001
プロピザミド	mg/L	不検出	0.0001
クロルニトロフェン	mg/L	不検出	0.0001
シマジン	mg/L	不検出	0.001
チオベンカルブ	mg/L	不検出	0.0001
ダイアジノン	mg/L	不検出	0.0001
イソキサチオン	mg/L	不検出	0.0001
フェニトロチオン	mg/L	不検出	0.0001
EPN	mg/L	不検出	0.0001
ジクロルボス	mg/L	不検出	0.0001
イプロベンホス	mg/L	不検出	0.0001
PCB	mg/L	不検出	0.0005

別添資料

予備試験結果

予備試験結果

<生物への影響>

濃度区 (mg/L)	左：累積死亡率(%)				右：症状の有無(有：*、無：－)					
	3 時間		24 時間		48 時間		72 時間		96 時間	
10.0	0	－	0	－	0	－	0	－	0	－
30.0	0	－	0	－	0	－	0	－	0	*
60.0	0	－	0	－	0	*	100		100	
100	0	－	0	－	100		100		100	

空欄は全個体が死亡したことを示す。

暴露方式：半止水式(換水 1 回/2 日)

生物数/試験液量：2 尾/10 L

エアレーション：緩やかなエアレーション有り

試験液調製法：試験用水に被験物質を直接添加後攪拌したものを試験液とした。

陳 述 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 住友林業株式会社

試験の表題 SF0409のオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験

試験番号 93507

本最終報告書(写し)は、原本を正確にコピーしたものです。

2005年2月8日

試験責任者

野坂俊樹

野坂俊樹

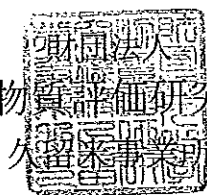
受理番号	E04-3507
試験番号	93507

最 終 報 告 書

SF0409のオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験

2005 年 2 月 8 日

化学物質評価研究機構



陳 述 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 住友林業株式会社

試験の表題 SF0409のオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験

試験番号 93507

上記試験は以下のGLPに従って実施したものです。

- (1) 「農薬の毒性に関する試験の適正実施に係る基準」(11農産第6283号平成11年10月1日)
- (2) 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)

また、本最終報告書は生データを正確に反映しており、試験データが有効であることを確認しています。

2005年2月8日

試験責任者 野坂俊樹
野坂俊樹

信 頼 性 保 証 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 住友林業株式会社

試験の表題 SF0409 のオオミジンコによる 48 時間急性遊泳阻害試験

試験番号 93507

本最終報告書は、試験の方法、手順が正確に記載され、試験結果は生データを正確に反映していることを保証します。

なお、検閲の結果については、下記の通り試験責任者及び運営管理者に報告しました。

検閲内容	検閲日	報告日 (試験責任者及び運営管理者)
試験計画書草案	2005 年 1 月 18 日	2005 年 1 月 18 日
試験計画書	2005 年 1 月 19 日	2005 年 1 月 19 日
試験計画書の修正	2005 年 2 月 1 日	2005 年 2 月 1 日
暴露開始時	2005 年 1 月 24 日	2005 年 1 月 26 日
暴露開始後	2005 年 1 月 26 日	
生データ、最終報告書草案	2005 年 2 月 7 日	2005 年 2 月 7 日
最終報告書	2005 年 2 月 8 日	2005 年 2 月 8 日

2005 年 2 月 8 日

信頼性保証業務担当者 松 尾 千 代 香
松 尾 千 代 香

目 次

	頁
要 約	5
1. 表 題	6
2. 試験委託者	6
3. 試験施設	6
4. 試験目的	6
5. 試験法	6
6. 適用GLP	6
7. 試験日程	6
8. 資料の保管	7
9. 試験関係者	7
10. 最終報告書の承認	7
11. 被験物質	8
12. 試験材料と方法	9
13. 試験結果	12
14. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる事項	12
試験結果の表及び図	
表1 遊泳阻害率	13
表2 観察された症状	14
表3 試験液の水質	14
表4 オオミジンコに対するEC50	15
図1 48時間における濃度－遊泳阻害率曲線	16
付属資料 試験用水の水質	
別添資料 予備試験結果	

要 約

SF0409のオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験

<試験条件>

- ・被験物質：SF0409
- ・試験生物：オオミジンコ(*Daphnia magna*)
- ・暴露期間：48時間
- ・試験濃度：5濃度区；320、160、80、40及び20 mg/L(公比2.0)及び対照区
- ・試験生物数：20頭／試験区(5頭×4試験容器)
- ・試験用水：脱塩素水道水
- ・試験方式：止水式
- ・試験液の調製：被験物質を直接添加して調製
- ・試験液量：400 mL／試験区(100 mL×4試験容器)
- ・水温：20±1℃
- ・照明：室内灯、16時間明／8時間暗
- ・給餌：無給餌
- ・エアレーション：なし

<結果>

- ・48時間EC50(半数遊泳阻害濃度)：102 mg/L(95%信頼限界；80～160 mg/L)
- ・48時間100%遊泳阻害最低濃度：160 mg/L
- ・48時間0%遊泳阻害最高濃度：40 mg/L
- ・NOEC(最大無影響濃度)：40 mg/L
(上記濃度は、設定濃度に基づく値)

1. 表 題
SF0409のオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験
2. 試験委託者
名 称 住友林業株式会社
所 在 地 (〒100-8270)東京都千代田区丸の内 1-8-1
3. 試験施設
名 称 財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所
所 在 地 (〒839-0801)福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号
TEL (0942) 34-1500
4. 試験目的
被験物質のミジンコ類に対する短期的影響を調べる。
5. 試験法
本試験は以下の試験法に従って行った。
(1) 「農薬の登録申請に係る試験成績について(別添)農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針 水産動植物への影響に関する試験 ミジンコ類急性遊泳阻害試験(2-7-2-1)(平成12年11月24日付け 12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知)」
(2) 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」に定める “*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test (Guideline 202, April 4, 1984)”
6. 適用GLP
本試験は以下の基準を適用した。
(1) 「農薬の毒性に関する試験の適正実施に係る基準」(11農産第6283号平成11年10月1日)
(2) 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」 (November 26, 1997)
7. 試験日程
 - 1) 試験開始日 2005 年 1 月 19 日
 - 2) 実験開始日 2005 年 1 月 24 日
 - 3) 実験完了日 2005 年 1 月 26 日
 - 4) 試験完了日 2005 年 2 月 8 日

8. 資料の保管

1) 被験物質

被験物質*を保管用容器に入れ密栓後、農薬登録取得後5年間、久留米事業所試験料保管室に保管する。保管期間経過後の処置は試験委託者と協議の上決定する。ただし、保管中に品質が著しく変化する物質の保管期間は、その品質が保管に耐えうる期間とし、廃棄に際しては試験委託者の承認を得る。

* 試験番号93506、93507及び93508についての共用保管試験料とする。

2) 生データ、資料等

生データ、試験計画書、その他必要な資料等は最終報告書と共に、農薬登録取得後15年間、久留米事業所資料保管室に保管する。保管期間終了後の取扱いについては、保管期間終了前に試験委託者と協議する。

9. 試験関係者

試験責任者 野 坂 俊 樹
所属 試験第四課

試験担当者 田 中 真里子、廣 尾 ゆみか、井 上 仁 美

10. 最終報告書の承認

試験責任者

2005年2月8日

氏 名 野坂俊樹
野 坂 俊 樹

11. 被 験 物 質

試験委託者提供資料による被験物質情報を以下に示す。

- 1) 名 称
ヒノキ防草材
- 2) 略 称
SF0409
- 3) ロット番号
SF040901
- 4) 外 観
粗粉末状、緑色
- 5) 成分及び含有量
不明 (ヒノキ葉の乾燥粉末)
- 6) 安 定 性
水、その他の溶媒、熱、光等に対して安定
- 7) 提 供 者
住友林業株式会社
- 8) 被験物質の確認
受領した被験物質の貼付ラベル及び送付案内の記載内容等が、試験委託者提供の被験物質情報と一致することを確認した。
- 9) 保 管 条 件
試験中の被験物質は室温暗所で保管した。

12. 試験材料と方法

1) 試験生物

(1) 種

オオミジンコ (*Daphnia magna* Clone A)

(2) 生物種選択の理由

テストガイドラインに推奨されている種類である。

(3) 供給源

英国Sheffield大学(所在地 Sheffield S10 2UQ, United Kingdom)より分譲された*Daphnia magna*(Clone A)の子孫で、久留米事業所で継代飼育している成体より産出された幼体を用いた。幼体を産出する成体は、試験条件と同じ水質(脱塩素水道水)、水温($20\pm 1^{\circ}\text{C}$)及び明暗周期(16時間明/8時間暗)下で飼育したもの(26日齢)で成体の生存率が100%の群(ロット)を使用した。継代飼育中はミジンコ1頭当たり*Chlorella vulgaris*を0.1~0.2 mgC(有機炭素含量)/日の割合で1日に1回給餌した。また、試験系の再現性を確認するために実施(2004年12月15日~12月17日に実施)した基準物質(二クロム酸カリウム、試薬特級、和光純薬工業株式会社)の急性遊泳阻害試験の48時間EC50は0.283 mg/Lであった。この値は久留米事業所におけるバックグラウンドデータの規定範囲内(平均 $\pm 2 \times$ 標準偏差: 0.110~0.351 mg/L)であった[平均 $\pm$ 標準偏差は 0.231 ± 0.060 mg/L($n=47$)]。

(4) 幼体の選別

生後24時間以内の幼体を用いた。

(5) 群分け

無作為に抽出を行った。

2) 試験用水

十分にエアレーションし、温度調節した脱塩素水道水を用いた。使用時に、残留塩素濃度が0.02 mg/L以下であることを確認した。定期的に測定した試験用水の水質測定結果を付属資料に示す。

3) 試験器具及び装置

(1) 試験器具

試験容器: 100 mLガラスビーカー

また、ゴミの進入や試験液の蒸散を防ぐため蓋をした。

(2) 試験装置

恒温槽: プラスチック製水槽(加熱冷却装置、佐藤工業株式会社製 加温冷却ユニット HCA250型)

4) 試験条件

(1) 暴露条件

① 方式

被験物質を含む試験液へ試験生物を暴露した。

試験は試験液の交換をしない止水式で行った。

- ②期 間
48時間

③試験濃度

試験は5濃度区[320、160、80、40及び20 mg/L(公比2.0)]で行った。試験濃度及び公比は予備試験結果から決定した。予備試験結果を別添資料に示す。なお、試験濃度は被験物質秤量操作を考慮し、有効数字2桁での表示とした。

④対 照 群

被験物質を含まない試験用水のみの対照区を設けた。

⑤試験生物数

20頭／試験区(5頭×4試験容器)

⑥試験液量

400 mL／試験区(100 mL×4試験容器)

(2) 環 境 条 件

①水 温

20±1℃

②溶存酸素濃度(DO)

暴露期間中、試験水温での飽和溶存酸素濃度の60%以上を保つ条件で行った。また、暴露期間中、エアレーションは行わなかった。

③pH

試験はpHを調整せずに行った。

④照 明

室内灯による16時間明／8時間暗

⑤給 餌

暴露期間中、給餌を行わなかった。

5) 試験液の調製法

必要量の被験物質と試験用水を試験容器で混合し、攪拌して調製した。各試験区の調製量に対する被験物質添加量を以下に示す。

試験区(mg/L)	被験物質添加量(mg/100 mL)
対照区	—
20	2.0
40	4.0
80	8.0
160	16
320	32

6) 観察と測定

(1) 試験生物の状態

暴露開始24及び48時間後に遊泳阻害及び症状を観察した。試験液を穏やかに動かした後、15秒間泳げない場合を遊泳阻害されたとみなした。

(2) 試験液の状態

試験液の状態を暴露開始時及び終了時に観察した。

(3) 水 質

試験液の溶存酸素濃度、pH及び水温を暴露開始時及び終了時に測定した。暴露開始時は別途調製した試験液について測定し、暴露終了時には各試験区につき4試験容器のうち1試験容器について測定した。溶存酸素濃度は溶存酸素計58型(Yellow Springs Instruments Co., Inc.)、pHはガラス電極式水素イオン濃度計HM-14P型(東亜ディーケーケー)、水温は検定済ガラス製棒状温度計で測定した。

7) 結果の処理

結果の算出には設定濃度を用いた。

(1) EC50*の算出法

48時間についてはBinomial法により算出した。また、その95%信頼限界を算出した。なお、24時間については本試験濃度範囲で50%以上の遊泳阻害率が得られなかったため、EC50は「>試験最高濃度」と表示した。

* EC50 (Median Effective Concentration)：暴露期間において試験生物の50%に影響を与える被験物質濃度を示す。影響の指標は遊泳阻害による。

(2) NOEC(最大無影響濃度)の評価

暴露期間中、対照群と比較して何ら影響が認められない試験最高濃度区をNOEC(No Observed Effect Concentration)とした。

8) 有効性基準

(1) 暴露期間中、対照群のミジンコにおいて、10%を超えて遊泳阻害されたり、水面に浮いたりしてはならない。

(2) 溶存酸素濃度は暴露期間中、試験水温での飽和溶存酸素濃度の60%以上でなければならない。

9) 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 規則Bによった。

13. 試験結果

1) 遊泳阻害率

48時間における100%遊泳阻害最低濃度は160 mg/L、0%遊泳阻害最高濃度は40 mg/Lであった。24及び48時間での遊泳阻害率を表1、48時間における濃度－遊泳阻害率曲線を図1に示す。なお、暴露期間中の対照群において水面に浮いた個体はみられず、遊泳阻害率は0%であり、有効性基準(10%を超えない)を満たしていた。

2) 症状等の観察結果

以下の観察結果は全て対照群との比較に基づくものである。暴露期間中に観察された症状は嗜眠状態、遊泳阻害及び活動度の低下であった。また、80～320 mg/L区でミジンコの体表に被験物質と思われる物質の付着がみられた。対照群では症状は認められなかった。暴露期間中における症状の観察結果を表2に示す。

3) 試験液の観察と測定結果

(1) 試験液の状態

暴露開始時は20及び40 mg/Lのみ無色透明で、その他の濃度区は褐色澄明であった。また、全濃度区において沈殿物、浮遊物及び不溶分が観察された。色調、沈殿物、浮遊物及び不溶分の度合いは濃度依存的であった。暴露終了時も同様であった。

(2) 試験液の水質

暴露期間中に測定した溶存酸素濃度は7.6～8.7 mg/L、pHは7.4～7.8、水温は20.0～20.3℃であった。試験液の水質を表3に示す。なお、溶存酸素濃度は有効性基準(試験水温での飽和濃度の60%以上*)を満たしていた。

* 19～21℃の飽和溶存酸素濃度：9.01～8.68 mg/L、JIS K 0102

4) EC50

SF0409のオオミジンコに対する24時間EC50は>320 mg/L、48時間EC50は102 mg/L (95%信頼限界：80～160 mg/L)であった。各時間でのEC50を表4に示す。

5) NOEC

暴露期間中に観察された症状及び遊泳阻害の結果から、SF0409のオオミジンコに対するNOECは40 mg/Lであった。

14. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる事項

当該事項はなかった。

表1 遊泳阻害率

設定濃度 (mg/L)		遊 泳 阻 害 率 (%)			
		24時間		48時間	
		試験容器毎	試験区毎	試験容器毎	試験区毎
対照区	A	0	0	0	0
	B	0		0	
	C	0		0	
	D	0		0	
20	A	0	0	0	0
	B	0		0	
	C	0		0	
	D	0		0	
40	A	0	0	0	0
	B	0		0	
	C	0		0	
	D	0		0	
80	A	0	0	0	15
	B	0		40	
	C	0		20	
	D	0		0	
160	A	0	0	100	100
	B	0		100	
	C	0		100	
	D	0		100	
320	A	20	15	100	100
	B	20		100	
	C	20		100	
	D	0		100	

表2 観察された症状

設定濃度 (mg/L)	観 察 結 果	
	24時間	48時間
対照区	—	—
20	—	—
40	—	—
80	—	IM LETH RA
160	RA	IM LETH
320	IM RA	IM LETH

—は症状が認められなかったことを示す。

症状の略称

IM (Immobilization) : 遊泳阻害

LETH (Lethargic) : 嗜眠状態

RA (Reduced activity) : 活動度の低下

表3 試験液の水質

設定濃度 (mg/L)	DO		pH		水温(℃)	
	開始時	終了時	開始時	終了時	開始時	終了時
対照区	8.7	8.7	7.8	7.7	20.0	20.1
20	8.7	8.7	7.8	7.8	20.0	20.1
40	8.7	8.7	7.8	7.8	20.0	20.1
80	8.7	8.7	7.7	7.8	20.0	20.2
160	8.7	8.2	7.6	7.6	20.0	20.2
320	8.6	7.6	7.4	7.5	20.0	20.3

DO : 溶存酸素濃度(mg/L)

表4 オオミジンコに対するEC50

暴露時間	EC50 (mg/L)	95%信頼限界(mg/L)	EC50算出法
24時間	>320	—	—
48時間	102	80～160	Binomial法

—は得られなかったことを示す。

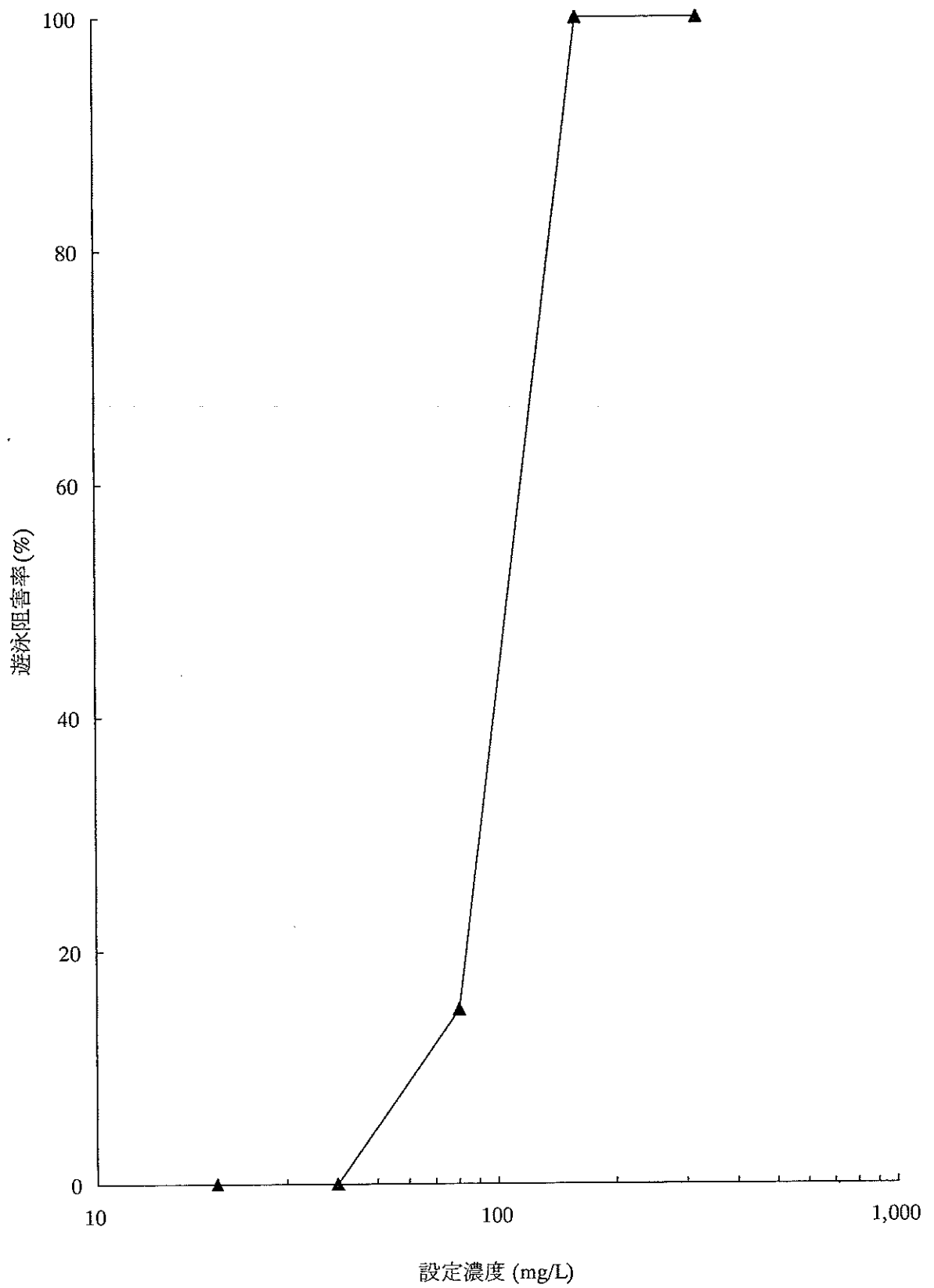


図1 48時間における濃度－遊泳阻害率曲線

付属資料

試験用水の水質

試験用水の水質(採水日:2005年1月5日)

項 目	単位	検査結果	定量下限
カルシウム、マグネシウム等(硬度)	mg/L	38.8	0.1
浮遊物質	mg/L	1未満	1
pH	—	7.3(22℃)	—
有機体炭素	mg/L	0.3	0.1
化学的酸素要求量	mg/L	0.9	0.5
遊離塩素	mg/L	不検出	0.01
アンモニウム態窒素	mg/L	不検出	0.01
シアン	mg/L	不検出	0.01
アルカリ度	mg/L	36	1
電気伝導率	mS/m	15.8	—
有機りん	mg/L	不検出	0.1
アルキル水銀	mg/L	不検出	0.0005
水銀	mg/L	不検出	0.0005
カドミウム	mg/L	不検出	0.001
六価クロム	mg/L	不検出	0.02
鉛	mg/L	不検出	0.005
ヒ素	mg/L	不検出	0.001
ホウ素	mg/L	不検出	0.02
フッ素	mg/L	不検出	0.1
鉄	mg/L	不検出	0.01
銅	mg/L	不検出	0.005
コバルト	mg/L	不検出	0.001
マンガン	mg/L	不検出	0.01
亜鉛	mg/L	不検出	0.01
アルミニウム	mg/L	不検出	0.001
ニッケル	mg/L	不検出	0.001
銀	mg/L	不検出	0.0001
硫酸イオン	mg/L	17.7	0.1
塩化物イオン	mg/L	15	1
ナトリウム	mg/L	13.5	0.01
カリウム	mg/L	3.3	0.01
カルシウム	mg/L	11.0	0.01
マグネシウム	mg/L	2.8	0.01
1,2-ジクロロプロパン	mg/L	不検出	0.0001
クロロタロニル	mg/L	不検出	0.0001
プロピザミド	mg/L	不検出	0.0001
クロルニトロフェン	mg/L	不検出	0.0001
シマジン	mg/L	不検出	0.001
チオベンカルブ	mg/L	不検出	0.0001
ダイアジノン	mg/L	不検出	0.0001
イソキサチオン	mg/L	不検出	0.0001
フェニトロチオン	mg/L	不検出	0.0001
EPN	mg/L	不検出	0.0001
ジクロルボス	mg/L	不検出	0.0001
イプロベンホス	mg/L	不検出	0.0001
PCB	mg/L	不検出	0.0005

別添資料

予備試験結果

予備試験結果

<生物への影響>

予備試験-1

濃度区 (mg/L)	24 時間		48 時間	
	遊泳阻害率 (%)	その他の症状	遊泳阻害率 (%)	その他の症状
100	0	—	20	RA
1,000	100	—	100	—

暴露方式：止水式

試験生物：5 頭／区(1 連／区)

試験液調製法：被験物質と試験用水を試験容器で混合し、攪拌して調製した。

予備試験-2

濃度区 (mg/L)	24 時間		48 時間	
	遊泳阻害率 (%)	その他の症状	遊泳阻害率 (%)	その他の症状
10.0	0	—	0	—
100	0	—	10	RA
500	0	RA	100	—

暴露方式：止水式

試験生物：10 頭／区(2 連／区)

試験液調製法：被験物質と試験用水を試験容器で混合し、攪拌して調製した。

予備試験-3

濃度区 (mg/L)	24 時間		48 時間	
	遊泳阻害率 (%)	その他の症状	遊泳阻害率 (%)	その他の症状
20	0	—	0	—
50	0	—	0	—
200	30	RA	100	—

暴露方式：止水式

試験生物：10 頭／区(2 連／区)

試験液調製法：被験物質と試験用水を試験容器で混合し、攪拌して調製した。なお、試験濃度は有効数字2桁での表示とした。

症状の略称

RA (Reduced activity)：活動度の低下

—はその他の症状が観察されなかったことを示す。

陳 述 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 住友林業株式会社

試験の表題 SF0409のオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験

試験番号 93507

本試験計画書の修正(写し)は、原本を正確にコピーしたものです。

2005年2月3日

試験責任者 野坂俊樹
野坂俊樹

試験計画書の修正

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

1. 表 題 SF0409のオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験

2. 試験番号 93507

3. 修正事項 7頁 14.5) 試験液の調製法

4. 修正理由 記載ミスのため

5. 修正の内容

試験区(mg/L)	被験物質添加量(mg/100 mL)
対照区	—
20	2.0
40	4.0
80	8.0
160	16.0
320	32.0

を

試験区(mg/L)	被験物質添加量(mg/100 mL)
対照区	—
20	2.0
40	4.0
80	8.0
160	16
320	32

に修正する。

6. 承認

2005年2月1日

試験責任者

野坂俊樹

陳 述 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 住友林業株式会社

試験の表題 SF0409の*Selenastrum capricornutum*による藻類生長阻害試験

試験番号 93506

本最終報告書(写し)は、原本を正確にコピーしたものです。

2005 年 2 月 18 日

試験責任者 末田 昭二郎
末 田 昭二郎

受理番号	E04-3506
試験番号	93506

最 終 報 告 書

SF0409の*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類生長阻害試験

2005 年 2 月 17 日

化学物質評価研究機構

久留米事業所

陳 述 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 住友林業株式会社

試験の表題 SF0409の*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類生長阻害試験

試験番号 93506

上記試験は以下の基準に従って実施したものです。

- (1) 「農薬の毒性に関する試験の適正実施に係る基準」(11農産第6283号平成11年10月1日)
- (2) 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)

また、本最終報告書は生データを正確に反映しており、試験データが有効であることを確認しています。

2005 年 2 月 17 日

試験責任者 末田 昭二郎
末 田 昭二郎

信 頼 性 保 証 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 住友林業株式会社

試験の表題 SF0409 の *Pseudokirchneriella subcapitata* による藻類生長阻害試験

試験番号 93506

本最終報告書は、試験の方法、手順が正確に記載され、試験結果は生データを正確に反映していることを保証します。

なお、検閲の結果については、下記の通り試験責任者及び運営管理者に報告しました。

検閲内容	検閲日	報告日 (試験責任者及び運営管理者)
試験計画書草案	2005 年 1 月 20 日	2005 年 1 月 21 日
試験計画書	2005 年 1 月 24 日	2005 年 1 月 24 日
暴露開始時	2005 年 1 月 24 日	2005 年 1 月 28 日
暴露開始後	2005 年 1 月 27 日	2005 年 1 月 28 日
生データ、最終報告書草案	2005 年 2 月 16 日	2005 年 2 月 16 日
最終報告書	2005 年 2 月 17 日	2005 年 2 月 17 日

2005 年 2 月 17 日

信頼性保証業務担当者 松 延 保 子
松 延 保 子

目 次

	頁
要 約	5
1. 表 題	6
2. 試験委託者	6
3. 試験施設	6
4. 試験目的	6
5. 試験法	6
6. 適用GLP	6
7. 試験日程	6
8. 資料の保管	7
9. 試験関係者	7
10. 最終報告書の承認	7
11. 被験物質	8
12. 試験材料と方法	9
13. 試験結果及び考察	13
14. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる事項	14
試験結果の表	
表1 暴露開始時と終了時の試験液のpH及び水温	15
表2 暴露期間中の培養装置内温度及び光強度	15
表3 各時間でのクロロフィル蛍光値	16
表4 各濃度における生長阻害率	17
表5 各指標におけるEC50及びNOEC	18
表6 有意差検定結果	18
試験結果の図	
図1 生長曲線下面積を指標とした場合の濃度－生長阻害率曲線	19
図2 生長速度を指標とした場合の濃度－生長阻害率曲線	20
図3 各試験区での生長曲線	21
付属資料 培地の組成	
別添資料 予備試験結果	

要 約

SF0409の*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類生長阻害試験

<試験条件>

- ・被験物質：SF0409
- ・供試生物：*Pseudokirchneriella subcapitata*
- ・暴露期間：72時間
- ・試験濃度：100、25.0、6.25、1.56及び0.391 mg/L(公比4.0)の5濃度区及び対照区
- ・試験方式：旋回振とう培養(約100回/分)
- ・試験液の調製：被験物質と培地を混合、攪拌して調製した試験原液を用いて調製
- ・連 数：3連/試験区
- ・培養温度：23±2℃
- ・照 明：蛍光灯による照明[液面付近での光強度60～120 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (変動幅±20%)とする連続照明]
- ・生長の測定：クロロフィル蛍光値

<結 果>

- ・ $E_bC50(0-72h)$ ：12.5 mg/L(95%信頼限界；4.62～33.9 mg/L)
 - ・ $E_rC50(24-48h)$ ：18.3 mg/L(95%信頼限界；算出不可)
 - ・ $E_rC50(24-72h)$ ：29.0 mg/L(95%信頼限界；算出不可)
 - ・NOEC(生長曲線下面積)：1.56 mg/L
 - ・NOEC(生長速度24-48h)：1.56 mg/L
 - ・NOEC(生長速度24-72h)：6.25 mg/L
- (上記濃度は、設定濃度に基づく値)

1. 表 題
SF0409の*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類生長阻害試験
2. 試験委託者
名 称 住友林業株式会社
所 在 地 (〒100-8270)東京都千代田区丸の内 1-8-1
3. 試験施設
名 称 財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所
所 在 地 (〒839-0801)福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号
TEL (0942) 34-1500
4. 試験目的
被験物質の藻類の生長に対する影響を調べる。
5. 試験法
本試験は以下の試験法に従って行った。
(1) 「農薬の登録申請に係る試験成績について(別添)農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針 水産動植物への影響に関する試験 藻類生長阻害試験(2-7-3)(平成12年11月24日付け 12農産第8147号農林水産省 農産園芸局長通知)」
(2) 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」に定める “Alga, Growth Inhibition Test (Guideline 201, 1984)”
6. 適用GLP
本試験は以下の基準を適用した。
(1) 「農薬の毒性に関する試験の適正実施に係る基準」(11農産第6283号平成11年10月1日)
(2) 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26 1997)
7. 試験日程
 - 1) 試験開始日 2005 年 1 月 24 日
 - 2) 実験開始日 2005 年 1 月 24 日
 - 3) 実験完了日 2005 年 1 月 27 日
 - 4) 試験完了日 2005 年 2 月 17 日

8. 資料の保管

1) 被験物質

被験物質*を保管用容器に入れ密栓後、農薬登録取得後5年間、久留米事業所試料保管室に保管する。保管期間経過後の処置は試験委託者と協議の上決定する。ただし、保管中に品質が著しく変化する物質の保管期間は、その品質が保管に耐えうる期間とし、廃棄に際しては試験委託者の承認を得る。

* 試験番号93506、93507及び93508についての共用保管試料とする。

2) 生データ、資料等

生データ、試験計画書、その他必要な資料等は最終報告書と共に、農薬登録取得後15年間、久留米事業所資料保管室に保管する。保管期間終了後の取扱いについては、保管期間終了前に試験委託者と協議する。

9. 試験関係者

試験責任者 末 田 昭二郎
所属 試験第四課

試験担当者 山 口 澄 華、北 嶋 美和子
亀 川 あゆみ、井 上 仁 美

10. 最終報告書の承認

試験責任者

2005 年 2 月 17 日

氏 名 末田 昭二郎
末 田 昭二郎

11. 被 験 物 質

試験委託者提供資料による被験物質情報を以下に示す。

- 1) 名 称
ヒノキ防草材
- 2) 略 称
SF0409
- 3) ロット番号
SF040901
- 4) 外 観
粗粉末状、緑色
- 5) 成分及び含有量
不明 (ヒノキ葉の乾燥粉末)
- 6) 安 定 性
水、その他の溶媒、熱、光等に対して安定
- 7) 提 供 者
住友林業株式会社
- 8) 被験物質の確認
受領した被験物質の貼付ラベル及び送付案内の記載内容等が、試験委託者提供の被験物質情報と一致することを確認した。
- 9) 保 管 条 件
試験中の被験物質は室温暗所で保管した。

12. 試験材料と方法

1) 試験生物

(1) 種

Pseudokirchneriella subcapitata (ATCC 22662)
(旧学名: *Selenastrum capricornutum*)

(2) 生物種選択の理由

テストガイドラインに推奨されている種類である。

(3) 供給源

American Type Culture Collection (12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852-1776 U.S.A.) より 1995 年 6 月 30 日に入手した *Pseudokirchneriella subcapitata* で久留米事業所で継代培養しているものを用いた。また、試験系の再現性を確認するために実施(2004年10月12日～10月15日に実施)した試験生物による基準物質(二クロム酸カリウム、試薬特級、和光純薬工業株式会社)の $E_bC50(0-72h)$ は 0.426 mg/L であり、この値は久留米事業所での同指標におけるバックグラウンドデータの規定範囲内(平均 $\pm 2 \times$ 標準偏差: $0.280 \sim 0.469 \text{ mg/L}$)であった[平均 $\pm$ 標準偏差は $0.375 \pm 0.047 \text{ mg/L}(n=32)$]。

2) 培地

前培養及び試験ともに OECD 化学品テストガイドラインに示されている培地 (OECD 推奨培地) を用いた。培地の組成を付属資料に示す。培地は滅菌したものを用いた。

3) 試験器具及び装置

(1) 試験器具

試験容器: 滅菌した 500 mL 容ガラス製三角フラスコ
(通気性のシリコセン®付)

(2) 試験装置

培養装置: 温度維持、連続照明及び連続振とう培養が可能で、一定の光強度を維持可能な装置(低温恒温槽付回転式振とう培養機 TB-C-50RL 高崎科学器械株式会社製)を用いた。

4) 試験条件

(1) 暴露条件

① 方式

被験物質を含む試験液へ試験生物を暴露し、旋回振とう培養(約100回/分)を行った。

② 期間

72時間

③ 試験濃度

試験は5濃度区[100、25.0、6.25、1.56及び0.391 mg/L(公比4.0)]で行った。試験濃度及び公比は予備試験結果から決定した。予備試験結果を別添資料に示す。

④連 数
3連／試験区

⑤対 照 群
被験物質を含まない培地のみの対照区を設けた。

⑥暴露開始時の細胞数
保存培養から前培養用培地に植えつぎ、試験と同じ条件下で3日間培養し、対数増殖期の細胞を含んだ藻類培養液(前培養液)を 10^4 cells/mLになるように試験液に接種した。

⑦試 験 操 作
無菌操作により実施した。

⑧試 験 液 量
300 mL／試験区(100 mL×3試験容器)

(2) 環 境 条 件

①温 度
 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$

②照 明
400～700 nmのスペクトル幅をもつ蛍光灯を用い、液面付近での光強度を
 $60\sim 120 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^*$ (変動幅 $\pm 20\%$)とする連続照明
 $*120 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s} = 0.72 \times 10^{20} \text{photons}/\text{m}^2\text{s}$

5) 試験液の調製法

必要量の被験物質を秤量し、培地と混合後、約1時間攪拌して1,000 mg/Lの試験原液を調製した。さらにこの試験原液を攪拌しながら必要量分取し、培地と混合、攪拌して100 mg/Lの試験原液を調製した。これらの試験原液を攪拌しながら必要量分取し、各試験容器に入れた培地と混合して試験液を調製した。各試験区の試験液調製量に対する試験原液添加量を以下に示す。

試験区(mg/L)	試験原液濃度(mg/L)	試験原液添加量(mL/100 mL)
対照区	—	—
0.391	100	0.391
1.56	1,000	0.156
6.25	1,000	0.625
25.0	1,000	2.50
100	1,000	10.0

6) 観察と測定

(1) 藻類の生長等

暴露開始後24時間毎に72時間までクロロフィル蛍光値を分光蛍光光度計(F-2000、日立製作所製)により測定した。その際、各試験区における試験液のバックグラウンドを測定するため、別途バックグラウンド測定用に調製した試験容器(藻体なし)について同時に測定し、ブランク補正を行った。なお、測定用に採水した試験液はメッシュスクリーンMS-50目(408 μ m)にて大粒子の被験物質を除去した。対照群にも同様の操作を行った。また、暴露終了時には各試験区につき1試験容器について細胞の状態を生物顕微鏡(BX41、オリンパス株式会社製)を用いて観察した。

(2) 試験液の状態

試験液の状態を暴露開始時及び終了時に観察した。

(3) 水質及び暴露環境

試験液のpH及び水温を暴露開始時と終了時に測定した。暴露開始時は別途調製した試験液について測定し、暴露終了時には各試験区につき1試験容器を測定した。培養装置内の温度、光強度を暴露期間中1日1回測定した。pHはガラス電極式水素イオン濃度計HM-14P型(東亜ディーケーケー)、温度は検定済ガラス製棒状温度計、光強度はポータブル光量子計QSL-100(Biospherical Instruments Inc.)で測定した。

7) 結果の算出

結果の算出には設定濃度を用いた。

(1) 濃度－阻害率の算定法

各試験区のクロロフィル蛍光値の平均値を時間に対してプロットし、生長曲線を作成した。この曲線を用い、生長曲線下面積及び生長速度を比較して各濃度区での阻害率を算出した。

① 生長曲線下面積の比較(面積法)

生長曲線下面積を次式に従って計算した。

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

ここで

A = 生長曲線下面積

N_0 = 暴露開始時(t_0)の設定細胞数におけるクロロフィル蛍光値
(relative unit)

N_1 = t_1 時に測定したクロロフィル蛍光値(relative unit)

N_n = t_n 時に測定したクロロフィル蛍光値(relative unit)

t_1 = 暴露開始後最初にクロロフィル蛍光値を測定した時間

t_n = 暴露開始後n回目にクロロフィル蛍光値を測定した時間

各濃度区における阻害百分率(I_A)は対照群の平均生長曲線下面積(A_c)と各濃度区での生長曲線下面積(A_i)との間の差として次のように計算した。

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

② 生長速度の比較(速度法)

生長曲線から2測定時(t_1 , t_n)でのそれぞれのクロロフィル蛍光値(N_1 , N_n)から平均の生長速度(μ)を次式に従って計算した。 t_1 と t_n は、各々24時間と48時間及び24時間と72時間を用いた。

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

各濃度区における阻害百分率(I_μ)は対照群の平均生長速度(μ_c)と各濃度区での生長速度(μ_t)との間の差として次のように計算した。

$$I_\mu = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

(2) EC50^{*1}の算出法

各濃度区に対応する阻害率を片対数紙にプロットし、直線性の認められる点を用いて直線回帰分析(最小二乗法)を行い、阻害率50%との交点からEC50(可能な場合その95%信頼限界)を算出した。その際、面積法により求めた場合は $E_bC50(0-72h)$ 、速度法により求めた場合は $E_rC50(24-48h)$ 又は $E_rC50(24-72h)$ と記載した。

^{*1} EC50(Median Effective Concentration)：暴露期間において試験生物の生長を50%阻害する被験物質濃度を示す。

(3) 最大無影響濃度(NOEC^{*2})の算出

生長曲線下面積、24-48時間及び24-72時間生長速度について、Bartlett法による等分散検定を行った後、各濃度区と対照群との有意差の有無を生長曲線下面積及び24-72時間生長速度については一元配置分散分析及びDunnettの多重比較法、24-48時間生長速度についてはKruskal-Wallisの順位和検定及びDunnettの多重比較法(ノンパラメトリック)により求めた。ただし、各指標におけるEC50より高い濃度区は、有意差検定には使用しなかった。これらの有意差検定結果に加え、試験結果全体を考慮し、NOECを評価した。

^{*2} NOEC(No Observed Effect Concentration)：暴露期間において試験生物の生長に影響が認められない試験最高濃度を示す。

8) 有効性基準

対照群における藻類の生長は72時間後に16倍以上でなければならない。

9) 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 規則Bによった。

13. 試験結果及び考察

1) 試験液の観察と測定結果

(1) 試験液の状態

暴露開始時は100 mg/L区では淡黄褐色、その他の濃度区では無色であった。また、全濃度区で濃度依存的に被験物質の沈殿が見られた。暴露終了時には100 mg/L区では開始時よりもやや濃い淡黄褐色、25.0 mg/L区では細胞の増殖により微かに薄い緑色、6.25 mg/L区でやや薄い緑色、その他の濃度区では緑色を呈していた。また、全濃度区で濃度依存的に被験物質の沈殿が見られた。

(2) 試験液の水質及び暴露環境

試験液のpHは暴露開始時では7.9～8.0、暴露終了時では8.0～8.2であった。試験液の水温は暴露開始時及び暴露終了時では23.0～23.2℃であった。培養装置内の温度は23.0～23.2℃、光強度は107～116 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ であった。試験液のpH及び水温の測定結果を表1、培養装置内の温度及び光強度の測定結果を表2に示す。

2) EC50

生長曲線下面積、24-48時間及び24-72時間生長速度によって算出したSF0409の $E_b\text{C50}(0-72\text{h})$ は12.5 mg/L(95%信頼限界：4.62～33.9 mg/L)、 $E_r\text{C50}(24-48\text{h})$ は18.3 mg/L(95%信頼限界：算出不可)、 $E_r\text{C50}(24-72\text{h})$ は29.0 mg/L(95%信頼限界：算出不可)であった。各時間でのクロロフィル蛍光値を表3、生長阻害率を表4、各指標でのEC50を表5に示す。また、各指標における濃度－生長阻害率曲線を図1及び図2に示す。

3) 各試験区での生長曲線、細胞観察結果及びNOEC

100 mg/L区では暴露期間を通して生長は著しく抑えられていた。25.0及び6.25 mg/L区では阻害が認められたものの対数増殖を示した。1.56及び0.391 mg/L区では対照群に近い生長を示した。

以下の細胞観察結果は全て対照群との比較に基づくものである。100 mg/L区においてやや膨張している細胞がやや多くみられ、25.0 mg/L区でもやや膨張した細胞及び凝集した細胞がやや多くみられた。その他の濃度区では対照群と同様であった。

有意差検定結果及び上記細胞観察結果より、生長曲線下面積及び24-72時間生長速度におけるNOECはそれぞれ1.56及び6.25 mg/Lであった。24-48時間生長速度におけるNOECは統計学的有意差検定結果では6.25 mg/Lであった。しかし、NOECと判定された濃度での阻害率はそれぞれ23.1、13.8、17.2%であり、生長阻害があると考えられたため、1濃度区低い1.56 mg/LをNOECと評価した。NOECを表5、有意差検定結果を表6、生長曲線を図3に示す。

4) 試験の有効性

対照群における供試藻類の生長は暴露終了時まで対数増殖を示した。暴露終了時には初期クロロフィル蛍光値の91.0倍以上に増殖し、有効性基準(16倍以上の増殖)を満たしていた。

5) 考 察

本試験において被験物質を添加した試験液では粒子成分が存在するため、粒子計数器及び顕微鏡観察による細胞数の計数が出来なかった。よって、クロロフィル蛍光値を測定することによって生長量を測定した。ただし、本被験物質はヒノキ葉の乾燥粉末であり、高濃度区においては被験物質由来と思われるクロロフィル蛍光のブランク値が測定された。試験生物(藻体)の生長量としてはこのブランク補正を行った値で表示したが、試験最高濃度区である100 mg/L区の暴露後24時間では、被験物質由来のブランク値の方が試験生物由来のクロロフィル蛍光値よりも大きく、ブランク値のばらつきにより正確なブランク補正が出来ていないと思われる結果が得られた。ただし、100 mg/L区においても被験物質由来のブランク値は暴露後48及び72時間では漸次減少し、試験生物の生長量測定に与える影響も減少したと思われる。また、25.0 mg/L以下の濃度区ではブランク値による影響は軽微なものであった。

以上のことから、本試験の結果から算出したEC50及びNOECは被験物質の作用を反映した妥当なものであると判断した。以下に参考データとして、各試験区のブランク値を示す。

ブランク試料におけるクロロフィル蛍光値(relative unit)

試験区 (mg/L)	暴露後24時間	暴露後48時間	暴露後72時間
100	14.2	6.00	3.84
25.0	3.64	2.47	1.33
6.25	1.50	1.07	0.827
1.56	0.931	0.650	0.786
0.391	0.938	0.777	0.753
対照区	0.806	0.810	0.739

14. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる事項
当該事項はなかった。

表1 暴露開始時と終了時の試験液のpH及び水温

設定濃度 (mg/L)	pH		水温	
	開始時	終了時	開始時	終了時
対 照 区	7.9	8.0	23.1	23.0
0.391	8.0	8.1	23.0	23.2
1.56	8.0	8.2	23.1	23.2
6.25	8.0	8.2	23.1	23.0
25.0	8.0	8.1	23.1	23.0
100	8.0	8.1	23.2	23.1

表2 暴露期間中の培養装置内温度及び光強度

暴露期間	開始時	1日	2日	終了時
培養装置内温度(℃)	23.2	23.0	23.2	23.0
光 強 度 ($\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$)	116	112	107	109

表3 各時間でのクロロフィル蛍光値

設定濃度 (mg/L)	No.	クロロフィル蛍光値(relative unit)			
		開始時*	24時間	48時間	72時間
対 照 区	1	4.20	22.5	119	415
	2	4.20	24.1	120	408
	3	4.20	23.9	121	382
	平均	4.20	23.5	120	402
	S.D.	0	0.913	1.10	17.2
0.391	1	4.20	24.5	131	445
	2	4.20	23.9	129	461
	3	4.20	24.1	131	479
	平均	4.20	24.1	130	462
	S.D.	0	0.292	1.44	17.2
1.56	1	4.20	19.8	117	453
	2	4.20	21.6	123	496
	3	4.20	22.2	131	523
	平均	4.20	21.2	124	491
	S.D.	0	1.25	6.81	35.0
6.25	1	4.20	15.4	54.0	219
	2	4.20	14.8	60.4	278
	3	4.20	15.9	61.6	287
	平均	4.20	15.4	58.7	261
	S.D.	0	0.578	4.08	36.9
25.0	1	4.20	8.71	28.6	99.4
	2	4.20	13.4	27.8	113
	3	4.20	10.2	29.8	112
	平均	4.20	10.8	28.7	108
	S.D.	0	2.41	0.980	7.72
100	1	4.20	15.1	8.26	6.49
	2	4.20	8.09	5.42	8.79
	3	4.20	11.0	6.56	7.58
	平均	4.20	11.4	6.75	7.62
	S.D.	0	3.52	1.43	1.15

* 前培養液の測定値に基づく値

表4 各濃度における生長阻害率

設定濃度 (mg/L)	No.	生長曲線下 面積	阻害率 (%)	生長速度 (24-48時間)	阻害率 (%)	生長速度 (24-72時間)	阻害率 (%)
対 照 区	1	8120	-	0.0695	-	0.0608	-
	2	8110	-	0.0669	-	0.0589	-
	3	7820	-	0.0677	-	0.0577	-
	平均	8020	-	0.0680	-	0.0591	-
0.391	1	8820	-10.0	0.0700	-2.89	0.0604	-2.20
	2	8940	-11.5	0.0701	-3.11	0.0617	-4.33
	3	9220	-14.9	0.0705	-3.59	0.0623	-5.32
	平均	8990	-12.2	0.0702	-3.20	0.0615	-3.95
1.56	1	8480	-5.76	0.0741	-8.92	0.0652	-10.3
	2	9170	-14.4	0.0724	-6.45	0.0653	-10.3
	3	9700	-20.9	0.0739	-8.64	0.0658	-11.3
	平均	9110*	-13.7	0.0735	-8.00	0.0654*	-10.6
6.25	1	4040	49.6	0.0523	23.1	0.0553	6.42
	2	4890	39.0	0.0587	13.8	0.0611	-3.40
	3	5050	37.0	0.0564	17.2	0.0602	-1.85
	平均	4660**	41.9	0.0558	18.0	0.0589	0.392
25.0	1	1840	77.1	0.0495	27.2	0.0507	14.2
	2	2100	73.9	0.0304	55.3	0.0444	24.9
	3	2060	74.4	0.0447	34.3	0.0500	15.4
	平均	2000	75.1	0.0415	39.0	0.0484**	18.2
100	1	386	95.2	-0.0251	137	-0.0176	130
	2	178	97.8	-0.0167	125	0.00173	97.1
	3	260	96.8	-0.0215	132	-0.00773	113
	平均	275	96.6	-0.0211	131	-0.00786	113

** : 1%水準で有意差あり

* : 5%水準で有意差あり

(有意差検定結果の詳細は表6を参照)

表5 各指標におけるEC50及びNOEC

検出指標	EC50(mg/L)	NOEC(mg/L)
生長曲線下面積	12.5(4.62~33.9)	1.56
24-48時間生長速度	18.3	1.56
24-72時間生長速度	29.0	6.25

()内は95%信頼限界を示す。

表6 有意差検定結果

設定濃度 (mg/L)	検出指標		
	生長曲線下面積	生長速度(24-48時間)	生長速度(24-72時間)
0.391	—	—	—
1.56	(*)	—	(*)
6.25	**	—	—
25.0			**
100			
検定法	Bartlett法 一元配置分散分析 Dunnettの多重比較法	Bartlett法 Kruskal-Wallisの順位 和検定 Dunnettの多重比較法 (ノンパラメトリック)	Bartlett法 一元配置分散分析 Dunnettの多重比較法

** : 1%水準で有意差あり

* : 5%水準で有意差あり

— : 有意差なし

()は対照区より指標値が高かったために有意差がみられた(有害な影響ではない)ことを示す。

空欄はEC50より高い濃度区のため検定には使用しなかったことを示す。

24-48時間生長速度におけるNOECは統計学的有意差検定結果では6.25 mg/Lであった。しかし、この濃度では生長阻害があると考えられたため1.56 mg/LをNOECと評価した。

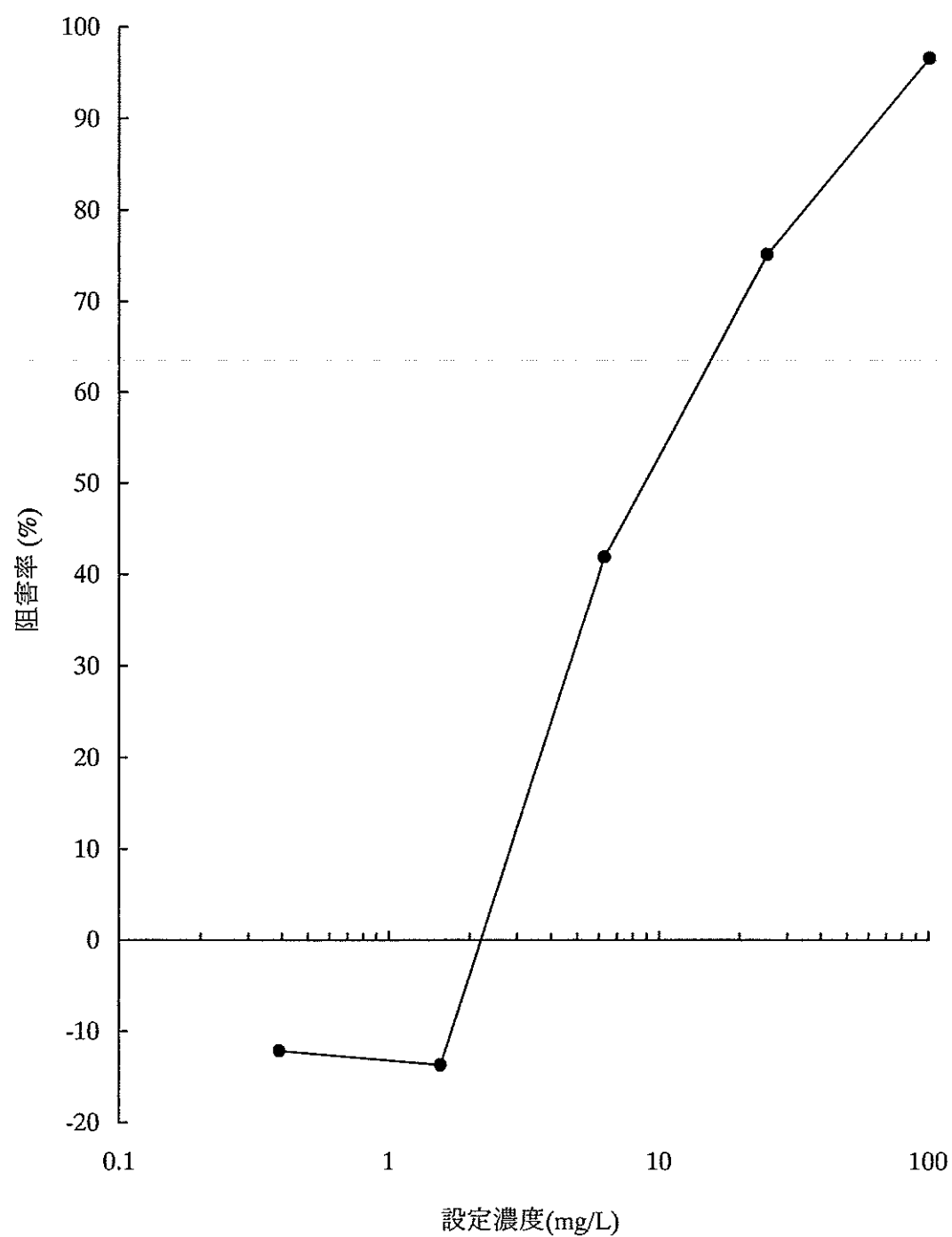


図1 生長曲線下面積を指標とした場合の濃度－生長阻害率曲線

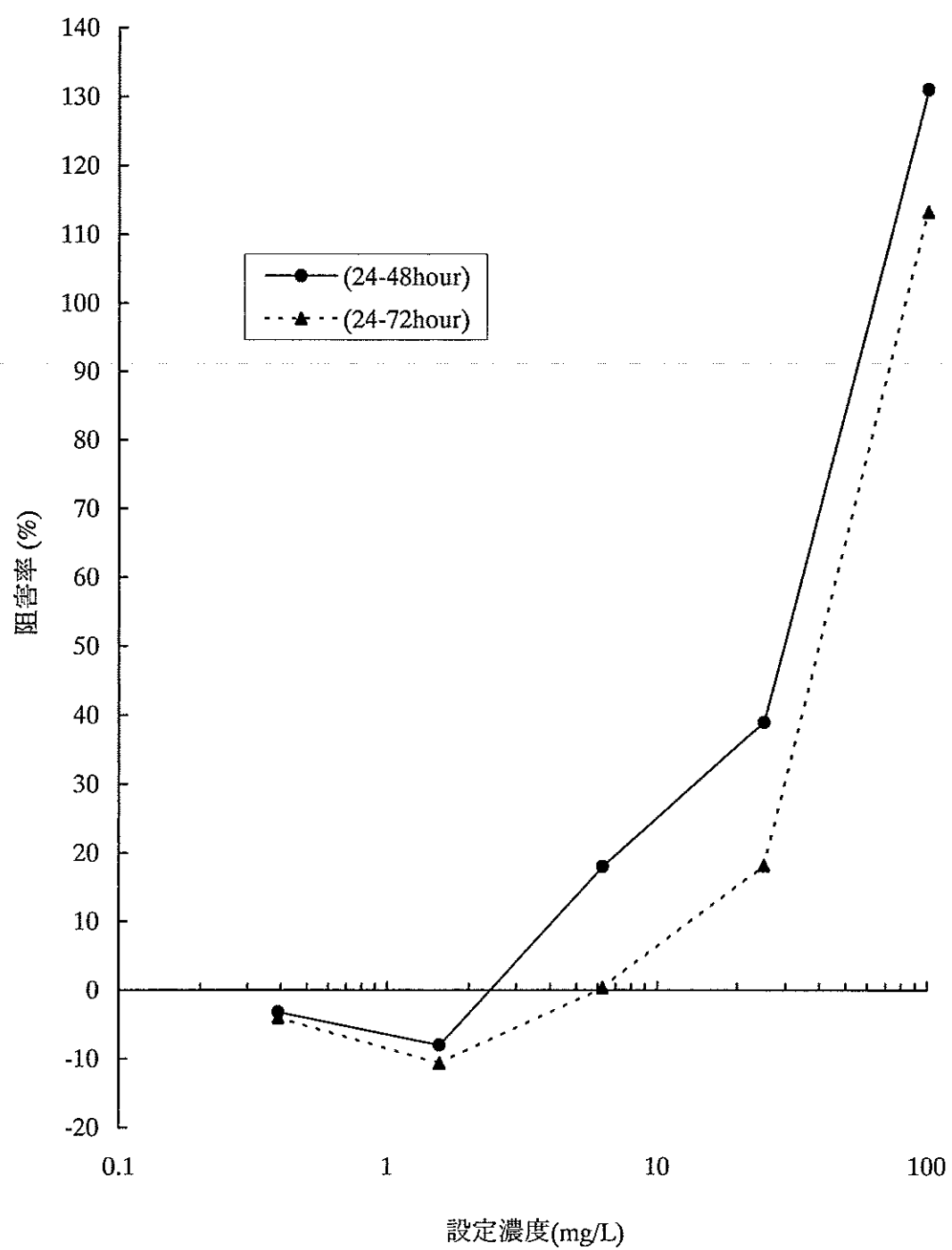


図2 生長速度を指標とした場合の濃度－生長阻害率曲線

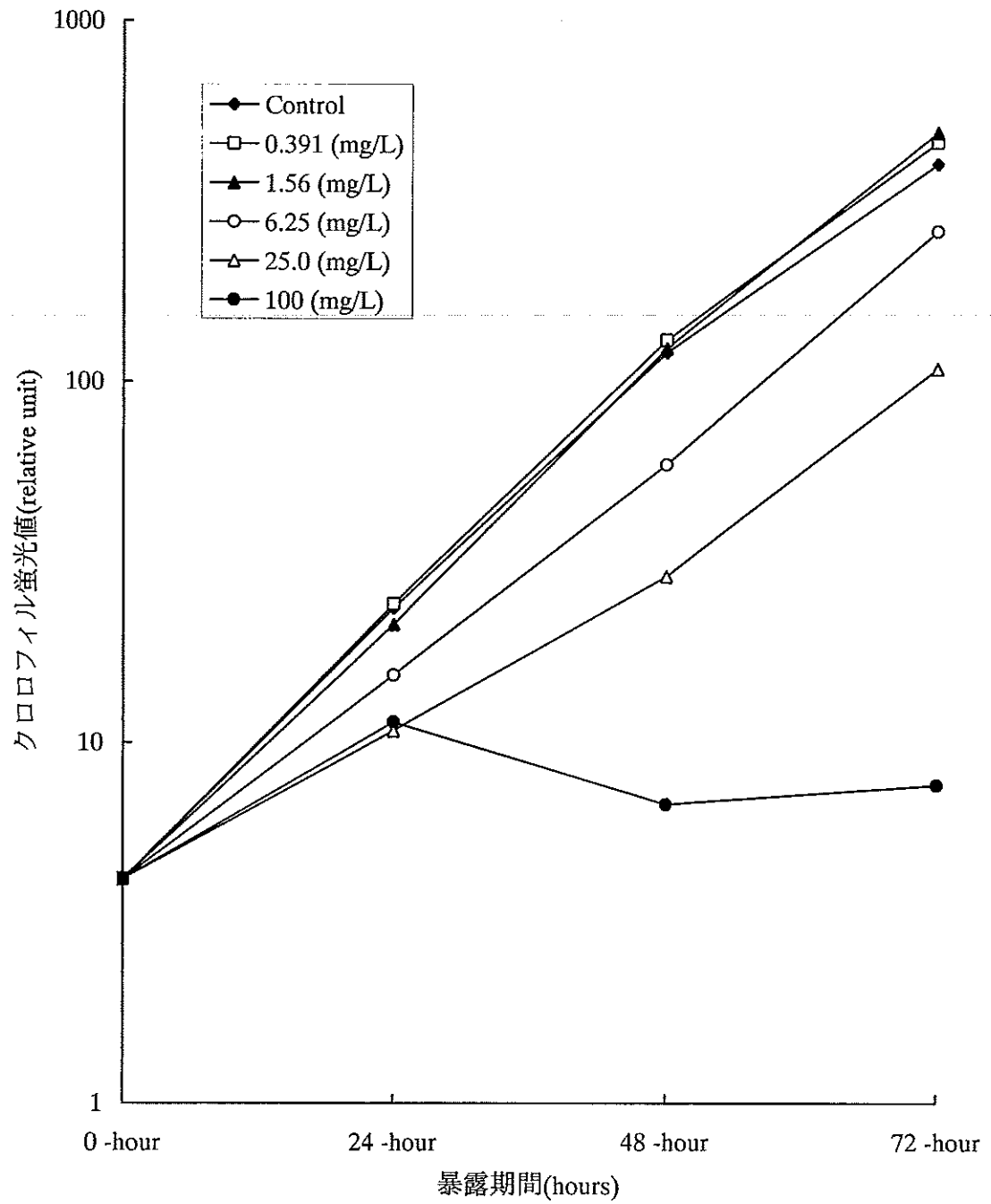


図3 各試験区での生長曲線

付属資料

培地の組成

OECD 推奨培地

成 分 名	量	
H_3BO_3	0.185	mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.415	mg
ZnCl_2	0.003	mg
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.08	mg
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1	mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0015	mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.007	mg
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.00001	mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	18	mg
NH_4Cl	15	mg
KH_2PO_4	1.6	mg
NaHCO_3	50	mg
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12	mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15	mg

上の成分を純水で 1 L に定容した。pH は約 8 である。

別添資料

予備試驗結果

予備試験結果

<生物への影響>

予備試験1

濃度区 (mg/L)	阻 害 率 (%)		
	生長曲線下面積	生長速度(24-48h)	生長速度(24-72h)
0.100	0.450	0.0302	-1.68
1.00	3.85	-1.58	-1.26
10.0	34.8	14.3	-5.38
100	93.3	111	110

連 数：1 連／区

試験液調製法：培地と被験物質を混合後、1時間攪拌して調製した試験原液を用いて調製した。

測 定 法：蛍光測定法

予備試験2

濃度区 (mg/L)	阻 害 率 (%)		
	生長曲線下面積	生長速度(24-48h)	生長速度(24-72h)
0.391	-3.41	-0.499	-0.492
1.56	-10.0	-11.3	-9.35
6.25	16.4	-33.5	-10.4
25.0	80.2	70.6	30.2
100*	99.9	63.8	34.3

*100 mg/L 区のみブランク補正実施

連 数：2 連／0.391 及び 1.56 mg/L 区、1 連／6.25～100 mg/L 区

試験液調製法：培地と被験物質を混合後、1時間攪拌して調製した試験原液を用いて調製した。

測 定 法：蛍光測定法