2，4，6－トリブロモフェノールのラットを用いる急性経口毒性試験

試験番号：3655（115－088）

財団法人
食品農医薬品安全性評価センター

目　　次

1.	要　　約	6 頁
2.	試　験　題　目	7
3.	試　験　目　的	7
4.	試　験　番　号	7
10.	被　験　物　質	9
11.	試験材料および方法	11
12.	試　験　結　果	14
13.	考察および結論	15

Tables, appendises and references

Table 1	Mortality	17
Table 2	Clinical observation	18
Table 3	Body weight	28
Table 4	Gross finding	34

1. 要　　約：

１群につき雌雄各５匹の Crj:CD (SD) 系ラット (SPF) を用いて２，４，６－トリブロモフェノールの経口投与による急性毒性試験を実施した．
２，４，６－トリブロモフェノールはトウモロコシ油に懸濁し，雌雄ともに 1000, 1300, 1690, 2197 および 2856 mg/kgを単回強制経口投与した．
観察期間は14日間とし，生死，中毒症状およびその発現時期，体重推移について観察し，病理学的検査を実施した．その結果は次の通り要約される．

1.1 死亡率およびLD_{50}値

1000, 1300, 1690, 2197 および 2856 mg/kg群の死亡率は雌雄ともにそれぞれ 0, 40, 80, 80 および 100%で，LD_{50}値（95%信頼限界）は雌雄ともに 1486 (1215～1792) mg/kgであった．

1.2 一般状態

雌雄ともに死亡動物および生存動物で自発運動低下および流涎がみられ，死亡動物および一部の生存動物で振戦，間代性痙攣，腹臥位および側臥位がみられた．

1.3 体　　重

生存動物ではいずれの測定においても，雌雄ともに順調な体重増加を示した．

1.4 病理学的検査

雌雄ともに被験物質の影響と考えられる肉眼的異常は認められなかった．

2. 試　験　題　目：

２，４，６－トリブロモフェノールのラットを用いる急性経口毒性試験

3. 試　験　目　的：

既存化学物質の毒性学的性質を評価する一環として，ＯＥＣＤテストガイドライン401（1987年２月24日）に従って，ラットを用いる急性毒性試験を実施した．
なお，試験の実施は環企研第233号，衛生第38号，63基局第823号（昭和63年11月18日）の「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第４条に規定する試験施設について」およびＯＥＣＤのＧＬＰ（1982年）の基準を満たすものとした．

4. 試　験　番　号：

３６５５（115－088）

10. 被 験 物 質：

10.1 被験物質名　　２，４，６－トリブロモフェノール

10.2 CAS No.　　１１８－７９－６

10.3 ロット番号

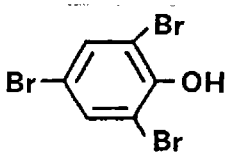
10.4 純　　度　　99.8 wt%

10.5 提 供 先

10.6 保管条件　　直射日光を避け，適当な換気のある冷暗所に保管した．

10.7 保管場所　　安評センター被験物質冷蔵庫

10.8 化学構造



10.9 分 子 式　　$C_6H_3OBr_3$

10.10 分 子 量　　330.80

10.11 物質の状態　　フレーク状の粉末

10.12 色　　白色

10.13 融点／沸点　　87～89℃／119℃(15 mmHg)

10.14 溶 解 性　　水に難溶．

10.15 比　　重　　2.55

10.16 取り扱い上の注意　　取り扱い中は必要に応じて適切な保護眼鏡，保護手袋，防塵マスクを着用した．取り扱い後は手洗いおよびうがいを充分行った．

10.17 残余被験物質の処理　投与終了後，残りは反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験に使用した．

なお，実測した結果は［Reference data 1］に示した．

11. 試験材料および方法：

11.1 供試動物

5週齢の Crj:CD (SD) 系ラット[SPF] 雌雄各42匹（そのうち追加試験用として雌雄各35匹）を日本チャールス・リバー株式会社（神奈川県厚木市）から購入した.

動物は検収後，試験環境に馴化し，生後6週で投与した.

動物はあらかじめ体重によって層別化し，無作為抽出法により各試験群を構成するように分けた．動物の識別は耳介入墨法により行った．投与時の体重は，雄が 175～202 g，雌が 130～156 gであった.

11.2 試験系の選択理由

感染性疾患に対する抵抗性，遺伝的安定性等を考慮して選んだ.

11.3 飼　育

動物はの飼育室（202号室：W 3.6×D 10×H 2.5 m，90 m^3）で飼育し，環境調節の目標値は温度23±2℃，相対湿度55±10%，換気回数1時間20回，照明12時間（150～300 lux，午前7時点灯，午後7時消灯）とした．なお，飼育室の環境調節は試験期間中，目標範囲内であった.

株式会社　東京技研サービス（東京都府中市）製の水洗式飼育機（W 745.0×D 50.0×H 182.0 cm）を使用し，ステンレス製網目飼育ケージ（W 21.5×D 27.5×H 19.5 cm，飼育ケージ・スペース 11529 cm^3）に動物を5匹ずつ収容した.

動物には，オリエンタル酵母工業株式会社（東京都中央区）製造の固型飼料MFを自由に摂取させた．飼料の夾雑物については当該ロットにおいて財団法人　日本食品分析センター（東京都渋谷区）で検査した結果を入手し，許容基準内であることを確認した［Reference data 2］.

動物には水道水を自動給水ノズルから自由に摂取させた．水道水の水質について，水道法に基づく水道水の検査を株式会社　エコプロ・リサーチ（静岡県清水市）で実施し，その結果を入手し，許容範囲内であることを確認した［Reference data 3］.

飼育ケージおよび給餌器は週1回取り換えた.

11.4　試験群の構成

試験群の構成は次の通りとした.

本試験

性	試験群	用　　量 (mg/kg)	動物数
雄	1	2000	5
雌	2	2000	5

追加試験

性	試験群	用　　量 (mg/kg)	動物数
雄	1	1000	5
	2	1300	5
	3	1690	5
	4	2197	5
	5	2856	5
雌	6	1000	5
	7	1300	5
	8	1690	5
	9	2197	5
	10	2856	5

［用量設定理由］

本被験物質の製品安全データシート（ＭＳＤＳ）に経口投与によるラットのLD_{50}が2000 mg/kg以上であることが報告されているため，本試験では雌雄ともに 2000 mg/kgの１用量を設定したところ， 投与後24時間までの観察で雌雄各４例が死亡した. 死亡例が認められた場合，当初概略の致死量を求める試験を予定していたが，過半数の動物が死亡したためLD_{50}値を求める追加試験を実施した. なお，追加試験における投与用量は，本試験において 2000 mg/kgで過半数の動物が死亡したこと，現在進行している反復投与毒性・生殖発生毒性併用試験（試験番号3657）において28日目の観察で 1000 mg/kg群に死亡動物が認められてないことから，雌雄ともに 1000～2856 mg/kgの５用量（公比1.3）を設定した.

11.5 投与方法

投与経路はOECDガイドライン「急性経口」で指示されている強制経口投与とした.

投与容量は体重 100 gあたり 0.5 mlとし，個体別に測定した体重に基づいて投与量を算出した.

投与回数は1回とし，投与前16時間絶食させた動物に金属製胃ゾンデを用いて強制経口投与した．投与時刻はlimit試験が10:00～10:10，追加試験が9:10～9:50，給餌は被験物質投与後3時間に行った.

11.6 投与液の調製

被験物質は必要量を瑪瑙製乳鉢で粉砕し，トウモロコシ油（ナカライテスク株式会社，Lot No.V6B7902）に懸濁した．調製は用時に行った.

11.7 投与液中の被験物質の濃度分析

投与液の濃度確認のため，投与液中の被験物質濃度の分析を実施した［Reference data 4］.

11.8 観　　察

中毒症状および生死の観察は，投与後6時間までは1時間間隔，以後1日2回行い，観察所見記録用紙に記録した.

なお，観察期間は被験物質投与後14日間とした.

11.9 体　　重

体重は投与直前，投与後7および14日に測定した.

また，死亡動物については死亡発見時に測定した.

11.10 病理学的検査

観察期間中の死亡例は死亡発見時に，生存個体は観察終了時にエーテル麻酔後放血安楽死させ解剖し，肉眼的病理所見を病理解剖所見用紙に記録した.

11.11 統計解析

本試験では，統計学的手法を用いた検定は実施しなかった.

追加試験において，投与後14日の死亡率からプロビット法でLD_{50}値を算出した.

11.12 余剰動物の処分

余剰動物は炭酸ガス吸入法により安楽死させた.

12. 試　験　結　果：

試験結果は，Table 1 に観察期間中の経日死亡状況およびLD_{50}値，Table 2 に投与後の中毒症状および発現時期を示した．また，Table 3 に体重推移，Table 4 に剖検所見を示した．なお，先に実施したlimit試験の結果は Appendix 1～4 に示した．

12.1　死亡率およびLD_{50}値

死亡動物は，雌雄とも 1300 mg/kg以上の用量群で投与後３から24時間の間に認められた．1000，1300，1690，2197 および 2856 mg/kg群の死亡率は雌雄ともにそれぞれ 0，40，80，80 および 100%で，LD_{50}値（95%信頼限界）は雌雄ともに 1486（1215～1792）mg/kgであった．

12.2　一般状態

雌雄ともすべての用量群で自発運動低下が投与後１ないし２時間から認められ，さらにほとんどの群で流涎を示す動物が認められた．1300 mg/kg投与以上のほとんどの群では主として死亡動物に投与後１ないし２時間から間代性痙攣が認められ，振戦も投与後３から６時間にかけて観察された．さらに投与後３時間以降に腹臥位または側臥位を示し死亡した．なお，観察期間終了時まで生存していた動物では投与後24時間には自発運動の低下のみが認められる程度で，投与後６日にはすべて回復した．

12.3　体　　重

生存動物では雌雄とも投与後７および14日の測定で前回の測定値に比較して増加していた．

12.4　病理学的検査

雌雄ともに死亡動物，観察期間終了時の生存動物ともに肉眼的異常は認められなかった．

13. 考察および結論：

２，４，６－トリブロモフェノールについてラットを用いる急性経口毒性試験を実施した．
その結果，死亡動物は投与後３から24時間の間に認められた．中毒症状として，雌雄とも自発運動低下，流涎，振戦，間代性痙攣，腹臥位および側臥位がみられた．
剖検では雌雄の死亡動物，生存動物ともに肉眼的異常は認められなかった．
LD_{50}値（95%信頼限界）は雌雄ともに 1486（1215～1792）mg/kgであった．

Table 1. Mortality

Sex	Group	Dose level (mg/kg)	Number of animals	Number of deaths on the day														Mortality (%)
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Male	1	1000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	1300	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40
	3	1690	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80
	4	2197	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80
	5	2856	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
Female	6	1000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	1300	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40
	8	1690	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80
	9	2197	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80
	10	2856	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100

LD_{50} value (95% probability limit)

Male : 1486 mg/kg (1215 mg/kg - 1792 mg/kg)

Female : 1486 mg/kg (1215 mg/kg - 1792 mg/kg)

Table 2. Clinical observation

Sex : Male Dose level : 1000 mg/kg Number of animals : 5

Signs	Hours							Days												
	1	2	3	4	5	6	24	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Normal	4	2	2	2	2	2	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Movement																				
hypoactivity		3	3	3	3	3	1	1	1											
General condition																				
salivation	1	1	1	1	1	1														
Dead																				

Number of affected animals : 3 Number of recovered animals : 3 Mortality : 0 / 5

Table 2. -continued Clinical observation

Sex : Male Dose level : 1300 mg/kg Number of animals : 5

Signs	Hours							Days												
	1	2	3	4	5	6	24	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Normal	5	2	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Movement																				
hypoactivity		3	5	4	3	3	3	3												
Posture																				
lateral position			1	1																
General condition																				
salivation		1	1																	
tremor			1	1																
Dead				1	1															

Number of affected animals : 5 Number of recovered animals : 3 Mortality : 2 / 5

Table 2. -continued Clinical observation

Sex : Male Dose level : 1690 mg/kg Number of animals : 5

Signs	Hours							Days												
	1	2	3	4	5	6	24	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Normal	2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Movement																				
hypoactivity	1	5	4	4	4	2	1	1												
Posture																				
lateral position				2	2	1														
prone position			1	1	1															
General condition																				
clonic convulsion		1																		
salivation	2	2	2	1	1															
tremor				1	3	1														
Dead			1			2	1													

Number of affected animals : 5 Number of recovered animals : 1 Mortality : 4 / 5

Table 2. -continued Clinical observation

Sex : Male Dose level : 2197 mg/kg Number of animals : 5

Signs	Hours							Days												
	1	2	3	4	5	6	24	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Normal	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Movement																				
hypoactivity	5	4	4	4	4	2	1	1												
Posture																				
prone position					2	1														
General condition																				
clonic convulsion	1	1	1	1	1															
tremor					3	2														
Dead		1			1	1	1													

Number of affected animals : 5 Number of recovered animals : 1 Mortality : 4 / 5

Table 2. -continued Clinical observation

Sex : Male Dose level : 2856 mg/kg Number of animals : 5

Signs	Hours							Days												
	1	2	3	4	5	6	24	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Normal	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movement																				
hypoactivity	5	5	5	5	3															
Posture																				
prone position				3	3															
General condition																				
clonic convulsion		1	2	2	1															
salivation		2	1																	
tremor				3	2															
Dead				1	2	2														

Number of affected animals : 5 Number of recovered animals : 0 Mortality : 5 / 5

Table 2. -continued Clinical observation

Sex : Female Dose level : 1000 mg/kg Number of animals : 5

Signs	Hours							Days												
	1	2	3	4	5	6	24	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Normal	4	3	2	2	2	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Movement																				
hypoactivity		1	3	3	3	3														
General condition																				
salivation	1	1																		
Dead																				

Number of affected animals : 3 Number of recovered animals : 3 Mortality : 0 / 5

Table 2. -continued Clinical observation

Sex : Female Dose level : 1300 mg/kg Number of animals : 5

Signs	Hours							Days												
	1	2	3	4	5	6	24	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Normal	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Movement																				
hypoactivity		3	4	4	4	3	3	3	3	3	3									
Posture																				
prone position					2															
General condition																				
clonic convulsion		1		1	1															
tremor					1	1														
Dead			1			1														

Number of affected animals : 5 Number of recovered animals : 3 Mortality : 2 / 5

Table 2. -continued Clinical observation

Sex : Female Dose level : 1690 mg/kg Number of animals : 5

Signs	Hours							Days												
	1	2	3	4	5	6	24	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Normal	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Movement																				
hypoactivity		4	4	4	3	1	1	1	1	1	1									
Posture																				
prone position			1	1	2															
General condition																				
clonic convulsion		2	1	4	3															
salivation	1	1	1	1																
Dead			1		1	2														

Number of affected animals : 5 Number of recovered animals : 1 Mortality : 4 / 5

Table 2. -continued Clinical observation

Sex : Female Dose level : 2197 mg/kg Number of animals : 5

Signs	Hours							Days												
	1	2	3	4	5	6	24	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Movement																				
hypoactivity	5	5	4	4	3	1	1	1	1	1	1									
Posture																				
prone position					1															
General condition																				
clonic convulsion		1	3	3	2															
salivation	1	1	1	2	1															
Dead			1		1	2														

Number of affected animals : 5 Number of recovered animals : 1 Mortality : 4 / 5

Table 2. -continued Clinical observation

Sex : Female Dose level : 2856 mg/kg Number of animals : 5

Signs	Hours							Days												
	1	2	3	4	5	6	24	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Normal	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movement																				
hypoactivity	5	5	5	4																
Posture																				
prone position				2																
General condition																				
clonic convulsion			5	4																
salivation	2	2	2	2																
Dead				2	3															

Number of affected animals : 5 Number of recovered animals : 0 Mortality : 5 / 5

Table 3. Body weight

Sex : Male (unit : g)

Group	Dose level (mg/kg)	Animal ID-No.	Days after administration 0	7	14
1	1000	1101	183	256	325
		1102	185	253	304
		1103	196	273	336
		1104	189	262	326
		1105	199	290	359
		Mean ± S.D.	190 ± 7	267 ± 15	330 ± 20
2	1300	1201	177	245	296
		1202	186	(187)	-
		1203	186	270	305
		1204	193	(187)	-
		1205	179	243	336
		Mean ± S.D.	184 ± 6	253 ± 15	312 ± 21

( ):Body weight at death; Not included in calculation of mean body weight.

Table 3. -continued Body weight

Sex : Male (unit : g)

Group	Dose level (mg/kg)	Animal ID-No.	Days after administration 0	7	14
3	1690	1301	175	(167)	-
		1302	193	(178)	-
		1303	195	(189)	-
		1304	201	242	328
		1305	200	(193)	-
		Mean ± S.D.	193 ± 10	242	328
4	2197	1401	185	(181)	-
		1402	188	243	305
		1403	187	(185)	-
		1404	197	(192)	-
		1405	188	(166)	-
		Mean ± S.D.	189 ± 5	243	305

( ):Body weight at death; Not included in calculation of mean body weight.

Table 3. -continued Body weight

Sex : Male (unit : g)

Group	Dose level (mg/kg)	Animal ID-No.	Days after administration 0	7	14
5	2856	1501	197	(195)	-
		1502	193	(185)	-
		1503	188	(180)	-
		1504	196	(192)	-
		1505	202	(196)	-
		Mean ± S.D.	195 ± 5	-	-

( ):Body weight at death; Not included in calculation of mean body weight.

Table 3. -continued Body weight

Sex : Female (unit : g)

Group	Dose level (mg/kg)	Animal ID-No.	Days after administration 0	7	14
6	1000	2101	139	179	202
		2102	143	179	200
		2103	142	182	206
		2104	148	185	202
		2105	148	183	205
		Mean ± S.D.	144 ± 4	182 ± 3	203 ± 2
7	1300	2201	140	163	198
		2202	140	(139)	-
		2203	142	172	189
		2204	139	176	199
		2205	147	(142)	-
		Mean ± S.D.	142 ± 3	170 ± 7	195 ± 6

( ):Body weight at death; Not included in calculation of mean body weight.

Table 3. -continued Body weight

Sex : Female (unit : g)

Group	Dose level (mg/kg)	Animal ID-No.	Days after administration 0	7	14
8	1690	2301	136	(136)	-
		2302	150	194	215
		2303	141	(134)	-
		2304	144	(139)	-
		2305	146	(145)	-
		Mean ± S.D.	143 ± 5	194	215
9	2197	2401	140	162	189
		2402	153	(143)	-
		2403	140	(138)	-
		2404	144	(134)	-
		2405	156	(153)	-
		Mean ± S.D.	147 ± 7	162	189

( ):Body weight at death; Not included in calculation of mean body weight.

Table 3. -continued Body weight

Sex : Female (unit : g)

Group	Dose level (mg/kg)	Animal ID-No.	Days after administration 0	7	14
10	2856	2501	130	(126)	-
		2502	140	(131)	-
		2503	149	(142)	-
		2504	147	(140)	-
		2505	149	(144)	-
		Mean ± S.D.	143 ± 8	-	-

( ):Body weight at death; Not included in calculation of mean body weight.

Table 4. Gross finding

Sex : Male Dose level : 1000 mg/kg

Animal ID-No.	Classification	Days after administration	Organ	Findings and comments
1101	Sacrificed	14		Normal
1102	Sacrificed	14		Normal
1103	Sacrificed	14		Normal
1104	Sacrificed	14		Normal
1105	Sacrificed	14		Normal

Table 4. -continued Gross finding

Sex : Male Dose level : 1300 mg/kg

Animal ID-No.	Classification	Days after administration	Organ	Findings and comments
1201	Sacrificed	14		Normal
1202	Dead	1		Normal
1203	Sacrificed	14		Normal
1204	Dead	1		Normal
1205	Sacrificed	14		Normal

Table 4. -continued Gross finding

Sex : Male Dose level : 1690 mg/kg

Animal ID-No.	Classification	Days after administration	Organ	Findings and comments
1301	Dead	1		Normal
1302	Dead	1		Autolysis
1303	Dead	1		Normal
1304	Sacrificed	14		Normal
1305	Dead	1		Normal

Table 4. -continued Gross finding

Sex : Male Dose level : 2197 mg/kg

Animal ID-No.	Classification	Days after administration	Organ	Findings and comments
1401	Dead	1		Normal
1402	Sacrificed	14		Normal
1403	Dead	1		Normal
1404	Dead	1		Normal
1405	Dead	1		Autolysis

Table 4. -continued Gross finding

Sex : Male Dose level : 2856 mg/kg

Animal ID-No.	Classification	Days after administration	Organ	Findings and comments
1501	Dead	1		Normal
1502	Dead	1		Normal
1503	Dead	1		Normal
1504	Dead	1		Normal
1505	Dead	1		Normal

Table 4. -continued Gross finding

Sex : Female Dose level : 1000 mg/kg

Animal ID-No.	Classification	Days after administration	Organ	Findings and comments
2101	Sacrificed	14		Normal
2102	Sacrificed	14		Normal
2103	Sacrificed	14		Normal
2104	Sacrificed	14		Normal
2105	Sacrificed	14		Normal

Table 4. -continued Gross finding

Sex : Female Dose level : 1300 mg/kg

Animal ID-No.	Classification	Days after administration	Organ	Findings and comments
2201	Sacrificed	14		Normal
2202	Dead	1		Normal
2203	Sacrificed	14		Normal
2204	Sacrificed	14		Normal
2205	Dead	1		Normal

Table 4. -continued Gross finding

Sex : Female Dose level : 1690 mg/kg

Animal ID-No.	Classification	Days after administration	Organ	Findings and comments
2301	Dead	1		Normal
2302	Sacrificed	14		Normal
2303	Dead	1		Normal
2304	Dead	1		Normal
2305	Dead	1		Normal

Table 4. -continued Gross finding

Sex : Female Dose level : 2197 mg/kg

Animal ID-No.	Classification	Days after administration	Organ	Findings and comments
2401	Sacrificed	14		Normal
2402	Dead	1		Normal
2403	Dead	1		Normal
2404	Dead	1		Normal
2405	Dead	1		Normal

Table 4. -continued Gross finding

Sex : Female Dose level : 2856 mg/kg

Animal ID-No.	Classification	Days after administration	Organ	Findings and comments
2501	Dead	1		Normal
2502	Dead	1		Normal
2503	Dead	1		Normal
2504	Dead	1		Normal
2505	Dead	1		Normal