最終報告書

表　　題：4-エチルフェノールのラットにおける急性経口投与毒性試験

試験番号：ＳＲ－９８８３

株式会社 化合物安全性研究所

目次

頁

要約 2
緒言 3
材料および方法 3
成績 7
考察 7
参考文献 8

Figures ..... 添付

1. Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) (SR-9883)
2. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) (SR-9883)

Tables ..... 添付

1. Experimental design for acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) in rats (SR-9883)
2. Mortality of rats in acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) in rats (SR-9883)
3. General appearance of rats in acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) (SR-9883)
4. Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) (SR-9883)
5. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) (SR-9883)
6. Gross findings of rats in acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) (SR-9883)

要　約

4-エチルフェノールを0（対照群）および2000 mg/kgの投与量で、1群当たり雌雄各5匹のCrj:CD（SD）IGSラットに単回経口投与して、その急性毒性を検討し、以下の成績を得た。

1. 雌雄のいずれにも死亡は認められず、LD_{50}値は、雌雄とも2000 mg/kg以上と推定された。
2. 一般状態では、2000 mg/kg投与群で投与後約10分からよろめき歩行、続いて腹臥または横臥、および呼吸促迫が雌雄の動物に観察された。これらの症状は、投与後2時間までに回復し、その後は観察期間終了日の投与後14日まで異常はみられなかった。
3. 2000 mg/kg投与群の雄の平均体重は、投与後1日から14日の観察期間を通して対照群より有意に低い値であり、体重増加量および体重増加率も有意に低かった。一方雌では、投与後1および3日の値は対照群より有意に低かったが、投与後5日以降14日まで有意な差はみられなかった。
4. 投与後14日の剖検では、雌雄とも被験物質投与による異常は認められなかった。

緒　言

この試験は、OECD 既存化学物質の安全性点検事業の一環として、4-エチルフェノールをラットに単回経口投与して、死亡状況、一般状態などを観察し、その急性毒性を検討する目的で実施した。

材料および方法

1. 被験物質

被験物質は、4-エチルフェノール（4-ethylphenol、以下 4-EP と略す、CAS No.：123-07-9、ロット番号：　　純度：98.3%、提供者：　　）で、白色結晶である（Appendix 1 および 2）。4-EP は遮光気密容器に入れ、冷暗所（実測範囲 4～10℃）に保存した。被験物質サンプルとして、上記ロットについて約 1 g を採取し、試験施設の検体保存室に保存した。試験期間中の被験物質の安定性については、本試験に続いて実施される 28 日間反復経口投与毒性試験の操作終了後、残余被験物質を用いて提供者である　　が純度の分析を行ない確認した（Appendix 3）。

2. 対照物質

対照物質として日本薬局方オリブ油（ロット番号：807089、ヤクハン製薬株式会社）を室温で保存し、投与に使用した。また、4-EP の溶媒として投与液の調製にも使用した。

3. 投与液の調製および化学分析

(1) 投与液の調製

投与当日、4-EP を精秤し、所定の濃度となるように溶媒である対照物質を加えて溶解した。調製液は遮光気密容器に入れ、調製後 2 時間以内に使用した。調製の際にはマスクおよび手袋を着用し、作業をドラフト内で行なった。残余調製液は焼却処分とした。

(2) 投与液の化学分析

投与に先立って 0.2 mg/mL および 400 mg/mL の濃度の調製液中の 4-EP の安定性の分析を実施した結果、4-EP は調製液中で室温で 3 時間、冷暗所（実測範囲 1～3℃）保存条件下で 8 日間安定であることが確認された（Appendix 4）。

投与に用いる 200 mg/mL の調製液について 4-EP の濃度を分析した結果、含有率は所定の濃度の 101%であり、調製状態は良好であると判断した（Appendix 5）。

以上の分析は、保土谷コントラクトラボ株式会社において実施された。

4. 試験方法

(1) 試験系

試験には、日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センター生産の SPF Crj:CD(SD) IGS ラットを用いた。ラットはこの種の試験で通常用いられている動物種であり、当研究所での使用経験が豊富であることからこの系統を選定した。

雌雄各々13 匹を 1999 年 2 月 10 日に 4 週齢で購入した。受入時の動物の体重範囲は、雄で 73～81g、雌で 71～79g であった。

(2) 検疫および馴化

受入後、個々の動物について 7 日間一般状態を 1 日 1 回観察した。さらに、期間中に体重測定を 2 回行なった。検疫および馴化期間中、動物に異常はみられなかった。

(3) 群分け

検疫および馴化期間終了後、健康な動物を雌雄各々10 匹選抜して、5 週齢で試験に供した。検疫および馴化期間終了日（投与前日）の体重に基づいて層化無作為抽出法により各群の平均体重が均一になるように群分けを行なった。これらの動物の体重範囲は、雄で 132～139g、雌で 116～122g であり、平均体重（雄 135.6g、雌 119.8g）の±20%以内であった。選抜から外れた動物は試験から除外した。

(4) 動物およびケージの識別

動物は、油性フェルトペンで尾部に印を付け、個体識別を行なった。飼育ケージは、群分け前は性別毎に色分けしたラベルに、試験番号および動物番号を明記し、各ケージの前面に標示した。群分け後は性別毎に色分けしたラベルに、試験番号、試験群および動物番号を明記し、各ケージの前面に標示した。

(5) 動物飼育

1) 飼育環境

動物を温度 23±3℃（実測範囲 21～23℃）、湿度 55±10%（実測範囲 50～57%）、換気回数 10～15 回／時間、照明時間 12 時間（午前 8 時点灯、午後 8 時消灯の人工照明）の動物飼育室（310 号室）で飼育した。動物飼育室の温度および湿度を毎日監視したが、動物の健康に影響を及ぼすと考えられるような設定範囲からの逸脱は認められなかった。

2) 飼育器材および飼育方法

雌雄別にブラケット式金属製金網床ケージ（260W×380D×180H, mm）に、検疫および馴化期間中は 3 ないし 5 匹、群分け後は 1 匹収容した。ケージおよび給餌器は群分け時に 1 回、受皿は週 2 回洗浄滅菌済のものと交換した。自動給水装置の水抜きは週 1 回実施した。動物飼育室内の清掃および清拭消毒は、1 日 1 回の頻度で実施した。清拭消毒に際しては、塩素系消毒薬およびヨウ素系消毒薬を 1 週間単位で交互に使用した。

3) 飼料

オリエンタル酵母工業株式会社製γ線照射固型飼料、CRF-1 を、金属製給餌器を用いて自由に摂取させた。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質あるいは微生物の有無を、使用したロット（980904、981209）の飼料について分析した。汚染物質の分析は財団法人日本食品分析センターにおいて、微生物検査は飼料製造業者がそれぞれ行なった。分析項目と許容値は㈱化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容値を超える値は認められなかった（Appendix 6～9）。

4) 飲料水

札幌市水道水を、自動給水装置を用いて自由に摂取させた。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質の有無を、1999 年 1 月 12 日および 1999 年 4 月 6 日に試料を採取して分析した。分析は日本衛生株式会社において行なった。分析項目と許容値は㈱化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容値を超える値は認められなかった（Appendix 10 および 11）。

(6) 試験群の構成

試験群の構成と各群の動物番号を Table 1 に示す。

(7) 被験物質の投与

1) 投与量の設定

被験物質の投与量は予備試験（試験番号 ＳＲ－９８８２）の結果[1)] に基づいて設定した。予備試験では、75、150、300、600、1200、2000 および 3000 mg/kg の投与量で 1 群雌雄各 3 匹の SD 系ラットに 1 回経口投与した。その結果、 3000 mg/kg 群では、一般状態の変化としてよろめき歩行が雄で 2 例、雌で 3 例にそれぞれ投与後数分から 10 分の間に発現し、引き続き腹臥または横臥がみられた。同群では、投与後 1 日までに雄で 2 例、雌で 3 例が死亡した。2000 mg/kg 群では、よろめき歩行または呼吸促迫が雄で 1 例、雌で 2 例にそれぞれ投与後数分から 30 分の間に発現し、続いて腹臥または横臥がみられ 1 ～3 時間持続したが、死亡は認められなかった。1200 mg/kg 群では、よろめき歩行が雄で 1 例に投与後 10 ～30 分の間にみられたのみであった。他の投与群では異常は何もみられなかった。以上の結果から、本試験の投与量は、雌雄ともに OECD 試験法ガイドライン（401）で規定された限度量である 2000 mg/kg とした。そのほかに溶媒であるオリブ油のみを同様の方法で投与する対照群を設けた。

2) 投与

被験物質がヒトに経口的に曝露される可能性を考慮し、OECD 試験法ガイドライン（401）に従って、一晩（約 16～17 時間）の絶食後、午前 9 時～午前 10 時の間に胃ゾンデを用いて 1 回強制的に胃内に経口投与した。投与後約 4 時間経過した時点で給餌を再開した。

投与容量を 10 mL/kg とし、各個体の投与液量は投与日の体重に基づいて算出した。

(8) 観察、測定および検査項目

1) 一般状態観察

全例について、動物の生死、外観、行動等を、投与日（0 日）の投与直後から投与後 1 時間までは連続して観察し、投与後 2 時間から 6 時間までは約 1 時間間隔で観察した。投与後 1 日から 14 日の剖検日までは、1 日 1 回観察した。異常が認められる場合は、その症状ならびに症状の発現および消失が観察された時刻を記録した。

2) 体重測定

全例について、動物の体重を、0（投与日の投与前）、投与後 1、3、5、7、10 および 14 日（剖検日）に、電子天秤（ザルトリウス 1401 B MP7-2 または 1407 MP8-1、カールツァイス株式会社）を用いて測定した。

体重増加量および体重増加率を以下の計算式により算出した。

体重増加量 ＝（投与後 14 日体重）－（0 日体重）

体重増加率 ＝[（体重増加量）／(0 日体重）]× 100

3) 剖検

全例について、投与後 14 日の剖検日に体外表を観察した後、エーテル麻酔下で放血致死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。以下の器官・組織を 10%中性緩衝ホルマリン液に固定・保存した。なお、精巣および精巣上体の固定にはブアン液を、保存には 70%エタノールを使用した。

脳（大脳および小脳）、肝臓、腎臓（左右）、脾臓、心臓、肺（気管支含む）、胃（前胃および腺胃）、十二指腸、空腸、回腸（パイエル板含む）、盲腸、結腸、直腸、精巣（左右）、精巣上体（左右）、卵巣（左右）。

4) 病理組織学的検査

病理組織学的検査は実施しなかった。

5. 統計学的方法

体重、体重増加量および体重増加率について Bartlett の検定法を行ない、等分散性を解析した。等分散の場合は一元配置分散分析法で解析し、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の検定法で解析した。一元配置分散分析の結果、有意差がみられた場合は Dunnett の検定法を用いて対照群との比較を行なった。Kruskal-Wallis 法の解析の結果、有意差がみられた場合は Mann-Whitney の U－検定法を用いて対照群との比較を行なった。

なお、被験物質投与群と対照群の比較検定については、群の平均および標準偏差を使用し、危険率 5%以下を統計学的に有意とした。

成　績

1. 死亡状況

死亡状況を Table 2 に示す。

雌雄とも死亡は認められず、LD_{50} 値は、雌雄とも 2000 mg/kg 以上と推定された。

2. 一般状態

一般状態の成績を Table 3、INDIVIDUAL DATA 1-1-1～1-2-2 に示す。

2000 mg/kg 投与群で投与後約 10 分から 20 分の間によろめき歩行が雄で 3 例、雌で 2 例に発現し、続いて腹臥または横臥が雄 2 例、雌 1 例に、および呼吸促迫が雄 2 例、雌 1 例にそれぞれ観察された。これらの症状は、いずれも投与後 1 ないし 2 時間には回復した。その後は観察期間終了日の投与後 14 日まで異常はみられなかった。

3. 体重

体重推移を Table 4 および 5、INDIVIDUAL DATA 2-1-1～2-2-2 ならびに Figure 1 および 2 に示す。

2000 mg/kg 投与群の雄の平均体重は、投与翌日に対照群に比べわずかに減少した。投与後 3 日以降は増加に転じたものの、観察期間を通して有意に低い値であった。投与日から投与後 14 日までの体重増加量および体重増加率も有意に低かった。

2000 mg/kg 投与群の雌では、投与後 1 および 3 日の値は対照群と比較して有意に低かったが、投与後 5 日から 14 日の期間中の値には有意な差はみられなかった。投与日から投与後 14 日までの体重増加量および体重増加率には、有意な差はみられなかった。

4. 剖検

剖検所見を Table 6、INDIVIDUAL DATA 3-1-1～3-2-2 に示す。

投与後 14 日の観察期間終了日における剖検の結果、対照群の雄 1 例に腎臓の嚢胞がみられた。2000 mg/kg 群では、雌雄とも異常は何も認められなかった。

考　察

OECD 既存化学物質の安全性点検事業の一環として、4-エチルフェノールを 0（対照群）および 2000 mg/kg の投与量で、1 群当たり雌雄各 5 匹の Crj:CD（SD）IGS ラットに単回経口投与して、その急性毒性を検討した。

その結果、中毒症状として、2000 mg/kg 投与群で投与後約 10 分からよろめき歩行、続いて腹臥または横臥、および呼吸促迫が雌雄の動物に観察された。これらの症状の発現は、被験物質の直接的な作用によるものと考えられたが、いずれも投与後 2 時間には回復したことから、一時的な変化と思われる。その後は観察期間終了日の投与後 14 日まで異常はみられなかった。

体重は、投与後 1 および 3 日に雌雄とも対照群より有意に低かった。雄では投与後 5 日以降

観察期間を通して有意に低い値であり、体重増加量および体重増加率でみても有意に低かった。一方雌では、投与後５日以降14日まで有意な差はみられず、雌雄の回復状態に差がみられた。しかし、投与後14日の剖検では、雌雄とも被験物質の投与による異常は認められなかった。

以上のことから、2000 mg/kg の 4-エチルフェノールを雌雄のラットに単回経口投与した場合、急性の中毒症状として一時的によろめき歩行、腹臥または横臥、および呼吸促迫を呈するものの、死亡には至らないことから、LD_{50} 値は、雌雄とも 2000 mg/kg 以上と推定された。

参考文献

１）4-エチルフェノールのラットにおける急性経口投与毒性試験の予備試験（ＳＲ－９８８２）：最終報告書、株式会社 化合物安全性研究所（1999）

Figures

Figure 1. Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) (SR-9883)

Figure 2. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) (SR-9883)

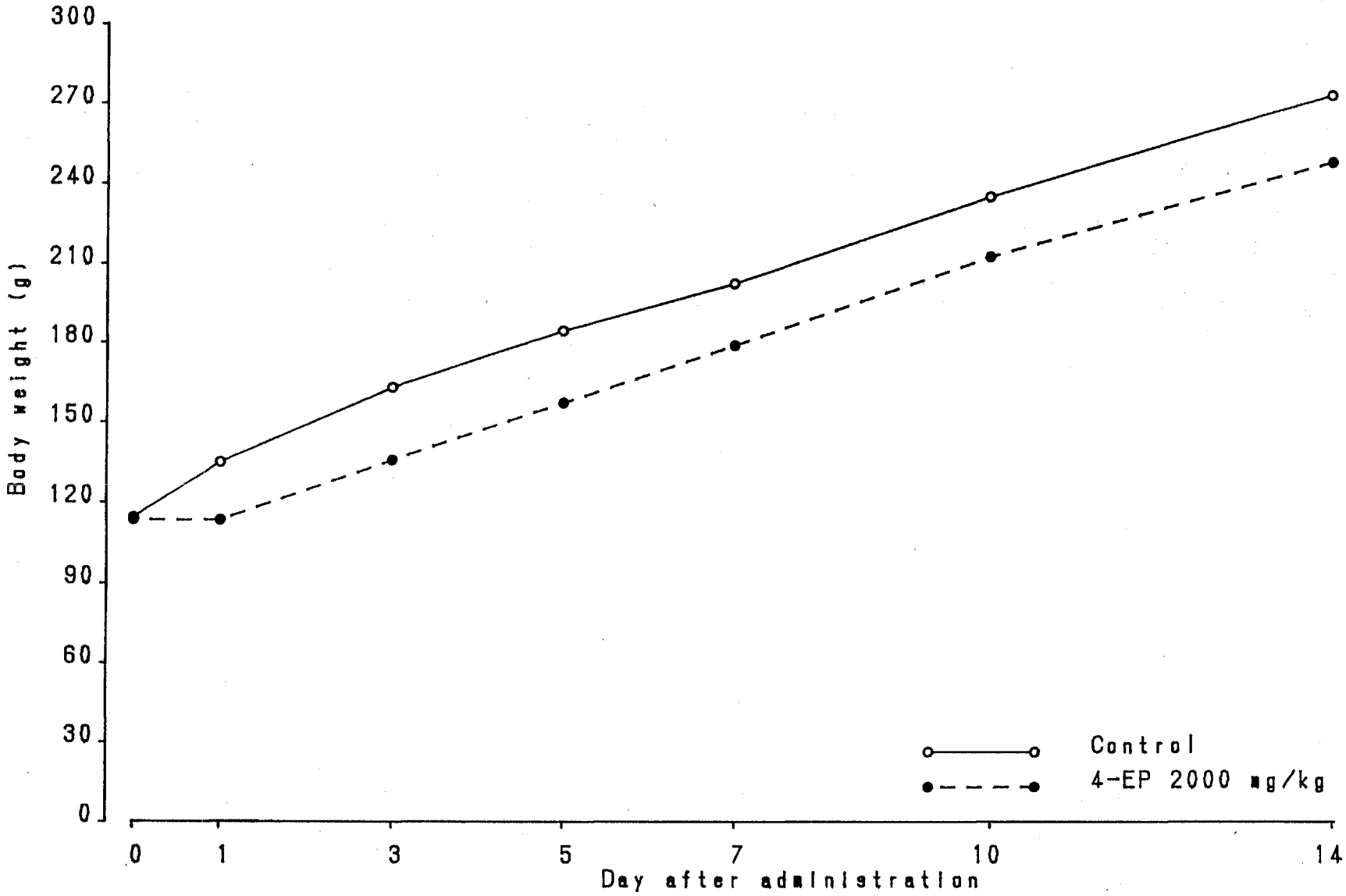

Figure 1. Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) (SR-9883)

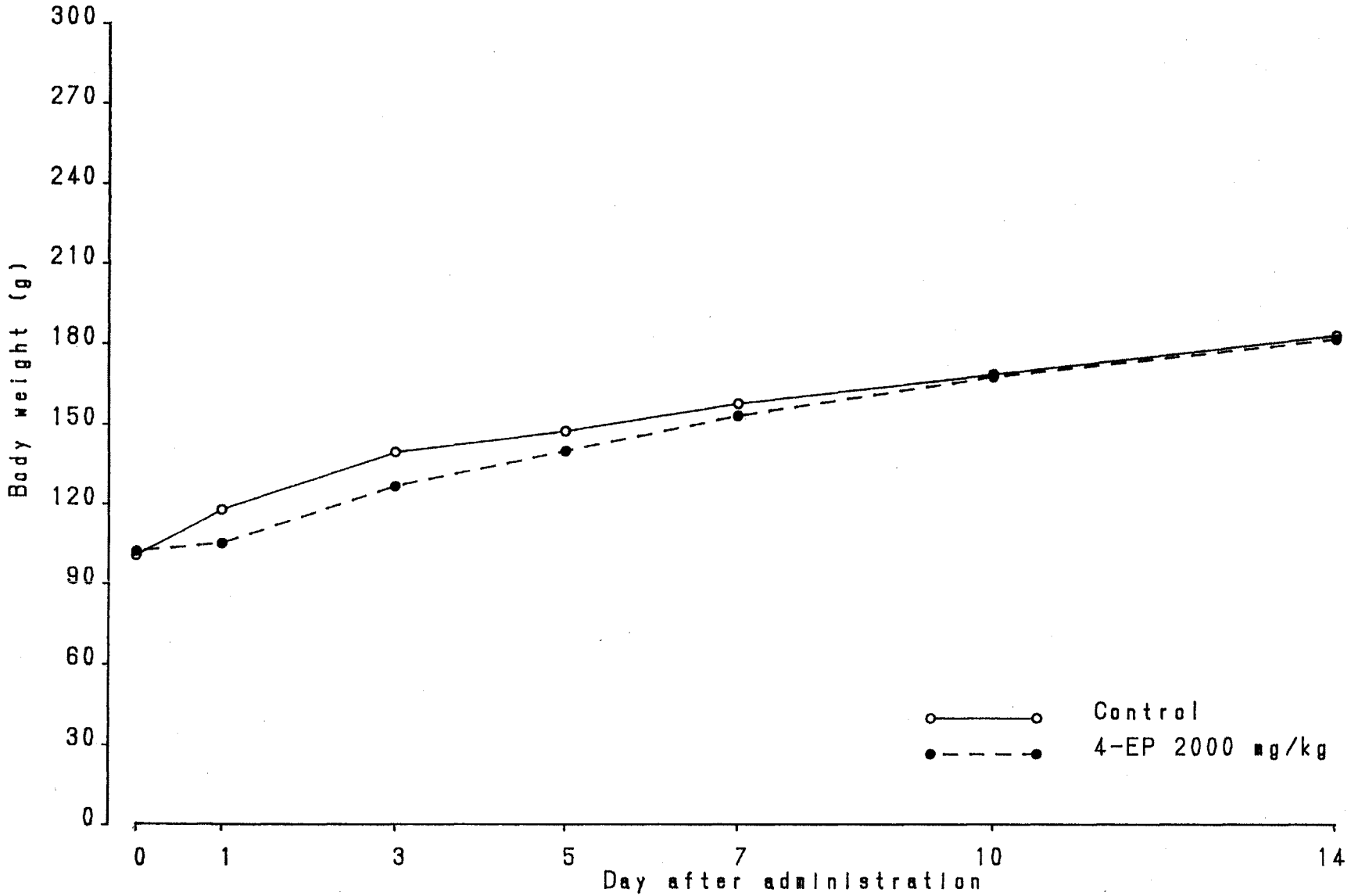

Figure 2. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) (SR-9883)

Tables

Table 1. Experimental design for acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) in rats (SR-9883)

Table 2. Mortality of rats in acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) (SR-9883)

Table 3. General appearance of rats in acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) (SR-9883)

Table 4. Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) (SR-9883)

Table 5. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) (SR-9883)

Table 6. Gross findings of rats in acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) (SR-9883)

Table 1. Experimental design for acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) in rats (SR-9883)

Group	Concentration of 4-EP mg/mL	Volume mL/kg	No. of animals[a] (Animal No.)	
			Male	Female
Control[b]	0	10	5 (101~105)	5 (151~155)
4-EP[c] 2000 mg/kg	200	10	5 (201~205)	5 (251~255)

a: Crj:CD(SD)IGS rats were dosed orally at the age of 5 weeks.
b: Rats in the control group were dosed with olive oil.
c: 4-EP was dissolved in olive oil.

Table 2. Mortality of rats in acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) (SR-9883)

Sex	Group	Distribution of dead animals 0-14[a]	Mortality[b]
Male	Control	0	0/5
	4-EP 2000 mg/kg	0	0/5
Female	Control	0	0/5
	4-EP 2000 mg/kg	0	0/5

a: Days after administration.
b: No. of dead animals/no. of animals dosed.

Table 3. General appearance of rats in acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) (SR-9883)

Item	Male		Female	
	Control	4-EP 2000 mg/kg	Control	4-EP 2000 mg/kg
Administration day				
No. of animals examined	5	5	5	5
No abnormal findings	5[a]	2	5	3
Staggering gait	0	3	0	2
Prone/lateral position	0	2	0	1
Hyperpnea	0	2	0	1
1-14 days after administration				
No. of animals examined	5	5	5	5
No abnormal findings	5	5	5	5

a: Values are no. of animals with findings.

Table 4. Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) (SR-9883)

Group	No. of animals	Day after administration							Body weight gain	
		0	1	3	5	7	10	14	Day 0-14	%[a]
Control	5	114.6[b]	135.0	163.0	184.4	202.4	235.0	273.0	158.4	138.206
		1.7	4.2	5.8	7.8	9.0	10.3	11.4	10.8	9.010
4-EP 2000 mg/kg	5	113.8	113.6**	135.8**	157.2**	178.8**	212.6*	247.8*	134.0*	117.772*
		2.6	12.7	14.6	13.3	12.8	14.7	15.7	15.3	13.411

a: (Body weight gain / body weight on day 0) x 100.
b: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram.
*: Differs from control, $p \leqq 0.05$.
**: Differs from control, $p \leqq 0.01$.

Table 5. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) (SR-9883)

Group	No. of animals	Day after administration							Body weight gain	
		0	1	3	5	7	10	14	Day 0-14	%[a]
Control	5	100.8[b]	117.8	139.6	147.4	157.6	168.6	183.0	82.2	81.558
		2.3	3.6	3.0	9.6	3.9	9.9	11.0	10.4	10.318
4-EP 2000 mg/kg	5	102.4	105.2**	126.6**	140.0	153.0	167.6	181.6	79.2	77.444
		2.1	3.9	5.0	3.8	6.8	11.8	11.0	11.7	12.064

a: (Body weight gain / body weight on day 0) x 100.
b: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram.
**: Differs from control, $p \leqq 0.01$.

Table 6. Gross findings of rats in acute oral toxicity test of 4-ethylphenol (4-EP) (SR-9883)

Item	Male		Female	
	Control	4-EP 2000 mg/kg	Control	4-EP 2000 mg/kg
No. of animals examined	5	5	5	5
Organ : Findings				
Kidney : Cyst, unilateral	1[a]	0	0	0

a: Values are no. of animals with findings.