
ジビニルベンゼンのラットを用いる単回経口投与毒性試験

最 終 報 告 書

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

表 題 :ジビニルベンゼンのラットを用いる単回経口投与毒性試験

試験番号 :402716

被験物質名 :ジビニルベンゼン (CAS No.1321-74-0)

試験系 :Sprague-Dawley系雌雄ラット (SPF) [Crj:CD(SD)IGS]

試験目的 :ジビニルベンゼンが人に摂取された場合の健康への影響を推定するために、OECD Guideline for Testing of Chemicals for Acute Oral Toxicity Test (401) に従って、ジビニルベンゼンを雌雄ラットに 1 回経口投与して、その毒性について検討した。

なお、当試験は、「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関する基準」(昭和 59 年 3 月 31 日環保業第 39 号環境庁企画調整局長、業発第 229 号厚生省薬務局長、59 基局第 85 号通商産業省基礎産業局長連名通知)(化学物質GLP基準)ならびにOECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE(化学物質の安全性試験の実施に関する基準)(OECDのGLP基準)に従って実施した。

目次

	頁
要約	10
緒言	11
方法	
1.被験物質および媒体	11
2.投与検体および濃度確認	11
3.使用動物および飼育条件	12
4.投与経路, 投与方法, 群構成および投与量	13
5.観察および検査項目	14
6.統計学的方法	14
結果および考察	
1.一般状態および死亡状況	14
2.体重推移	15
3.剖検所見	15
文献	15

Table 1	Mortality and LD ₅₀ value of rats in single dose oral toxicity test of divinylbenzene	18
Table 2	General sign of male rats in single dose oral toxicity test of divinylbenzene	19
Table 3	General sign of female rats in single dose oral toxicity test of divinylbenzene	20
Table 4	Body weight of male rats in single dose oral toxicity test of divinylbenzene	21
Table 5	Body weight of female rats in single dose oral toxicity test of divinylbenzene	22
Table 6	Necropsy finding of male rats in single dose oral toxicity test of divinylbenzene	23
Table 7	Necropsy finding of female rats in single dose oral toxicity test of divinylbenzene	24
Fig.1	Chemical structure of divinylbenzene	25
Fig.2	Body weight of male rats in single dose oral toxicity test of divinylbenzene	26
Fig.3	Body weight of female rats in single dose oral toxicity test of divinylbenzene	27

要約

ジビニルベンゼンを雌雄ラットに 1 回経口投与し，その毒性について検討した．投与量はOECD毒性試験ガイドラインにより限界用量とされている 2000 mg/kgを高用量とし，以下 1000 および 500 mg/kgとした．対照として媒体(コーンオイル)投与群を設けた．

1. 一般状態および死亡状況

死亡は，いずれの群にも発現しなかった．2000 mg/kg群では，雌雄とも自発運動の低下が投与日にみられた．

2. 体重推移

500 mg/kg以上の群で雌雄とも体重の低値がみられた．

3. 剖検所見

いずれの群の雌雄においても，異常はみられなかった．

以上の結果から，ジビニルベンゼンのLD₅₀値は，雌雄とも 2000 mg/kg以上と考えられた．

緒言

ジビニルベンゼン(CAS No.1321-74-0)が人に摂取された場合の健康への影響を推定するために、OECD Guideline for Testing of Chemicals for Acute Oral Toxicity Test (401)に従って、ジビニルベンゼンを雌雄ラットに1回経口投与して、その毒性について検討した。

方法

1. 被験物質および媒体

被験物質のジビニルベンゼン(CAS No.1321-74-0)は、Fig.1に示す化学構造を有し、分子量：130.19，融点：-29℃，沸点：190～200℃であり、常温において無色ないし淡黄色の透明液体である。当試験には、平成8年9月26日に

から提供されたものを用いた(製造元： Lot No.

純度：96.2%，ただし、不純物としてエチルビニルベンゼンを3.2 wt%，P-tert-ブチルカテコールを1010 ppm，その他を0.6 wt%含有)。入手後は少量ずつ分割し、試験施設の被験物質保管室の冷蔵・遮光条件下の保管庫に保管した。なお、反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験の投与期間の終了後に当試験施設での保管分を除いた残余被験物質は

に返却し、その一部を分析した結果、純度は96.3%であり、使用期間中は安定であったことが確認された。

媒体として、コーンオイルを用いた。コーンオイル(片山化学工業株式会社，Lot No. 0542，入手日：平成7年11月28日，使用期限：平成12年11月27日)は、入手後、試験施設の被験物質保管室の室温条件下の保管庫に保管した。

2. 投与検体および濃度確認

各濃度ごとに被験物質を必要量秤取し、コーンオイルで希釈して必要濃度の投与検体を調製した。なお、2，20 および 200 mg/mlの調製液は、調製後冷蔵・遮光条件下で7日間、さらに室温・遮光条件下で4時間保存しても安定性に問題のないことが確認されていた¹⁾(Attached table 1)。各濃度の調製液は調製後、速やかに使用した。投与後の残余投与検体は廃棄した。また、被験物質は純度換算を行い、投与量は原体重量で表示した。

投与に使用した各濃度の投与検体中の被験物質濃度を試験施設内で高速液体クロマトグラフを用いて測定した。その結果、被験物質濃度は表示濃度の104.2～104.9%であり、濃度に問題はなかった(Attached table 2)。

3. 使用動物および飼育条件

1) 動物種および系統

試験には、毒性試験に一般的に用いられている動物種で、その系統維持が明らかであり集積データも揃っているSprague-Dawley系雌雄ラット [(SPF), Crj: CD(SD)IGS] を用いた。動物は、平成 9 年 2 月 5 日に日本チャールス・リバー株式会社(日野飼育センター)から 4 週齢で雌雄各 31 匹を購入した。入手後 1 日の体重範囲は、雄が 71~85 g, 雌が 67~78 g であった。

2) 検疫および馴化, 群分け法ならびに個体識別法

入手した動物は、5 日間の検疫期間およびその後 3 日間の馴化期間を設けた。この間に、4 回の体重測定および毎日一般状態の観察を行って、検疫・馴化とし、一般状態および体重推移に異常の認められなかった動物を群分けして試験に用いた。

群分けは、コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に、無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように投与日に行った。なお、個々の動物の体重が平均体重の± 20 % を越えていないことを確認した。群分け後の残余動物は、投与翌日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に廃棄処分した。

動物は、検疫・馴化期間中は入手日に油性インクによる記入法および色素による染毛法により、群分け後は色素による染毛法および耳パンチ法を併用して識別した。さらに、検疫・馴化期間中の各ケージには試験番号、入手年月日、性別および馴化動物番号を記入したラベルを、群分け後の各ケージには試験番号、投与量、性別および動物番号を記入し、群ごとに色分けしたラベルを取り付けた。

3) 環境条件および飼育管理

動物は、室温 20~24 °C (実測値: 21~23 °C), 湿度 40~70 % (実測値: 45~53 %), 明暗各 12 時間(照明: 午前 6 時~午後 6 時), 換気回数 12 回/時(フィルターにより除菌した新鮮空気)に設定した飼育室(C棟 8 号室)で飼育した。

検疫・馴化期間中および群分け前の絶食時間中はステンレス製懸垂式ケージ(W: 240 × D: 380 × H: 200 mm)を用いて 1 ケージあたり 5 匹までの群飼育とし、群分け後はステンレス製五連ケージ(W: 755 × D: 210 × H: 170 mm)を用いて個別飼育した。ケージの受け皿および給水瓶の交換は 1 週間に 2 回以上、ステンレス製懸垂式ケージおよびステンレス製五連ケージならびに給餌器の交換は 2 週間に 1 回以上行った。なお、動物飼育室の清掃(床の掃き掃除)および 0.02 % 次亜塩素酸ナトリウム水溶液での床のモップ拭きによる消毒は毎日行った。

4) 飼料および飲料水

飼料は、入手後 3 カ月以内の固型飼料 (CRF-1, オリエンタル酵母工業株式会社) を給餌器に入れ、自由に摂取させた。ただし、投与前日の夕刻(午後 3 時 45 分)から投与まで

の約 20 時間と投与後約 6 時間まで絶食させ、その後に飼料を与えた。使用した飼料の分析結果は、財団法人日本食品分析センターおよびオリエンタル酵母工業株式会社から入手した。

飲料水は、水道水を給水瓶を用いて自由に摂取させた。ただし、群分け時から投与後約 6 時間までは絶水させ、その後に飲料水を与えた。飲料水の水質検査結果は、ほぼ 3 カ月ごとに財団法人岐阜県公衆衛生検査センターで実施した成績を入手した。

飼料および飲料水の検査結果は、いずれも試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

4. 投与経路、投与方法、群構成および投与量

1) 投与経路および投与方法

ジビニルベンゼンは、経口的に人に摂取される可能性が考えられるため、投与経路として経口投与を選択した。

投与に際しては、金属製経口胃ゾンデを取り付けたポリプロピレン製ディスプレイ注射筒を用いて、強制経口投与した。投与液量は、投与直前に測定した体重を基準として 10 mL/kg で算出した。投与時刻は午前 11 時 26 分～11 時 39 分の間で、投与回数は 1 回とした。

投与日の週齢は 5 週齢であり、体重範囲は雄が 112～120 g、雌が 95～103 g であった。

2) 群構成および投与量

群構成は、以下の如くとした。

群	試験群	投与量 (濃度)	動物数(動物番号)	
			雄	雌
第1群	対照(コーンオイル)	0 mg/kg (0 mg/ml)	5(001～005)	5(051～055)
第2群	ジビニルベンゼン	500 mg/kg (50 mg/ml)	5(101～105)	5(151～155)
第3群	ジビニルベンゼン	1000 mg/kg (100 mg/ml)	5(201～205)	5(251～255)
第4群	ジビニルベンゼン	2000 mg/kg (200 mg/ml)	5(301～305)	5(351～355)

投与量は、雄ラットを用いた予備試験(投与段階: 0, 125, 500 および 2000 mg/kg)において、2000 mg/kgを投与しても死亡発現はなく、自発運動の低下、体重の低値が認められたのみであった²⁾。そこで、当試験では、OECD Guideline for Testing of Chemicals for Acute Oral Toxicity Test (401) で限界用量とされている 2000 mg/kgを高用量とし、念のため以下公比 2 で 1000 および 500 mg/kg群を設定した。また、対照として被験物質と同一容量の媒体(コーンオイル)を投与する群を設けた。

5. 観察および検査項目

1) 観察期間

投与後 14 日間とした。

2) 一般状態

投与日は投与前および投与後 6 時間(投与後 30 分まで, 投与後 2, 4 および 6 時間)まで, 投与翌日からの観察期間中は 1 日 1 回, 一般状態および死亡の有無を観察した。

3) 体重測定

投与日(投与直前)および投与後 1, 3, 7, 10 ならびに 14 日の午前中に測定した。

4) 剖検

生存動物は観察期間終了時にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

6. 統計学的方法

有意差検定は下記に示したように, 対照群とジビニルベンゼンの各投与群の間で行い, 危険率 5 %未満($p < 0.05$)を有意とし, 5 %未満($p < 0.05$)と 1 %未満($p < 0.01$)とに分けて表示した。

〈検定方法〉

体重は, 各群で平均値および標準偏差を算出した。その後, Bartlett法による等分散性の検定を行い, 等分散の場合には一元配置法による分散分析を行い, 有意ならばDunnett法により行った。一方, 等分散と認められなかった場合は順位を利用した一元配置法による分析(Kruskal-Wallisの検定)を行い, 有意ならば順位を利用したDunnett型の検定法により行った。

結果および考察

1. 一般状態および死亡状況(Table 1~3, Appendix 1-1~1-4 および 2-1~2-4)

いずれの群の雌雄においても, 死亡は発現しなかった。ジビニルベンゼンのLD₅₀値は, 雌雄とも 2000 mg/kg以上と考えられた。

一般状態の観察において, 2000 mg/kg群では自発運動の低下が投与後 2~6 時間に雄の

2~5 例と雌の 3~4 例にみられた。その他には、下痢が対照群の雌で投与後 2~6 時間に 1~2 例、500 mg/kg群の雄で投与後 2~6 時間に 2~3 例にみられたが、媒体として用いたコーンオイルに基づくものと考えられた。なお、対照群の雄、500 mg/kg群の雌および 1000 mg/kg群の雌雄では、観察期間を通して異常はみられなかった。

2. 体重推移 (Table 4 および 5, Fig.2 および 3, Appendix 3-1~3-4 および 4-1~4-4)

500 mg/kg群では、対照群と比べて雌雄とも投与後 1 日に体重の有意な低値がみられた。1000 mg/kg群では、対照群と比べて雌雄とも投与後 1 および 3 日に体重の有意な低値がみられた。2000 mg/kg群では、対照群と比べて雄で投与後 1~10 日に、雌で投与後 1 および 3 日に体重の有意な低値がみられた。

3. 剖検所見 (Table 6 および 7, Appendix 5-1~5-4 および 6-1~6-4)

いずれの群の雌雄においても、異常はみられなかった。

以上のように、ジビニルベンゼンはOECD毒性試験ガイドラインで限界用量とされている 2000 mg/kgを投与しても、雌雄ともに死亡発現はなく、LD₅₀値は雌雄とも 2000 mg/kg以上と考えられた。なお、雌雄とも 500 mg/kg以上の投与で体重の低値が、2000 mg/kgの投与で自発運動の低下がみられた。

文献

- 1) 渡邊ゆかりほか：「ジビニルベンゼンの調製液の安定性確認試験」
(試験番号：402716PP)(株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所)
- 2) 古橋忠和ほか：「ジビニルベンゼンのラットを用いる単回経口投与毒性試験の予備試験」の最終報告書(試験番号：402716P)(株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所)

Table 2 General sign of male rats in single dose oral toxicity test of divinylbenzene

Group (mg/kg)	Number of males and general sign	Hours after administration						Days after administration													
		0~0.5	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
Control	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
	500	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
divinylbenzene	Normal	5	3	2	3	2	3	2	3	2	3	2	3	2	3	2	3	2	3		
		0	2	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Diarrhea	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
Normal	1000	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5			
	2000	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5			
Normal	Decrease in locomotor activity	5	2	0	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5			
		0	3	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			

Table 3 General sign of female rats in single dose oral toxicity test of divinylbenzene

Group (mg/kg)	Number of females and general sign	Hours after administration					Days after administration													
		0~0.5	2	4	6	8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Control	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Normal	5	4	3	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
divinylbenzene	500	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
divinylbenzene	1000	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
divinylbenzene	2000	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Normal	5	1	1	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Decrease in locomotor activity	0	4	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 4 Body weight of male rats in single dose oral toxicity test of divinylbenzene

Group (mg/kg)	Control		divinylbenzene			
	0	5	500	1000	2000	5
Number of males			5	5	5	5
Days after admin- istration	0	3.2	2.1	2.4	2.3	2.3
	1	116.2 ± 131.8 ± 154.8 ± 195.2 ± 221.2 ± 256.0 ±	115.6 ± 123.2 ± 150.4 ± 193.6 ± 220.6 ± 249.4 ±	116.0 ± 117.0 ± 145.0 ± 188.0 ± 215.4 ± 249.0 ±	116.4 ± 110.8 ± 133.2 ± 178.6 ± 207.2 ± 244.2 ±	116.4 ± 110.8 ± 133.2 ± 178.6 ± 207.2 ± 244.2 ±
	3	3.2	3.8*	3.5**	3.5**	3.5**
	7	7.7	1.7	3.2**	3.2**	3.2**
	10	8.1	3.2	5.5	5.5	5.5
	14	8.7	5.7	8.4	8.4	8.4
		9.8	7.8	11.0	11.0	11.0

Each value shows mean (g) ± S.D.

Significantly different from control (*: P<0.05, **: P<0.01).

Table 5 Body weight of female rats in single dose oral toxicity test of divinylbenzene

Group (mg/kg)	Control		divinylbenzene			
	0	5	500	1000	2000	
Number of females			5	5	5	5
Days after administration	0	2.9	99.2 ± 2.8	99.4 ± 3.0	100.0 ± 1.6	
	1	2.1	105.4 ± 4.3*	98.8 ± 5.1**	102.4 ± 3.0**	
	3	3.0	126.6 ± 6.7	121.8 ± 5.1**	119.2 ± 3.5**	
	7	4.4	151.0 ± 11.0	149.2 ± 6.8	146.4 ± 2.7	
	10	10.5	163.0 ± 15.7	162.6 ± 10.5	155.4 ± 8.0	
	14	6.4	174.0 ± 16.2	176.6 ± 9.8	168.4 ± 5.9	

Each value shows mean (g) ± S.D.

Significantly different from control (*: P<0.05, **: P<0.01).

Table 6 Necropsy finding of male rats in single dose oral toxicity test of divinylbenzene

Group (mg/kg)	Control	divinylbenzene		
	0	500	1000	2000
Number of males	5	5	5	5
Normal	5	5	5	5

Table 7 Necropsy finding of female rats in single dose oral toxicity test of divinylbenzene

Group (mg/kg)	Control	divinylbenzene		
		500	1000	2000
Number of females	5	5	5	5
Normal	5	5	5	5

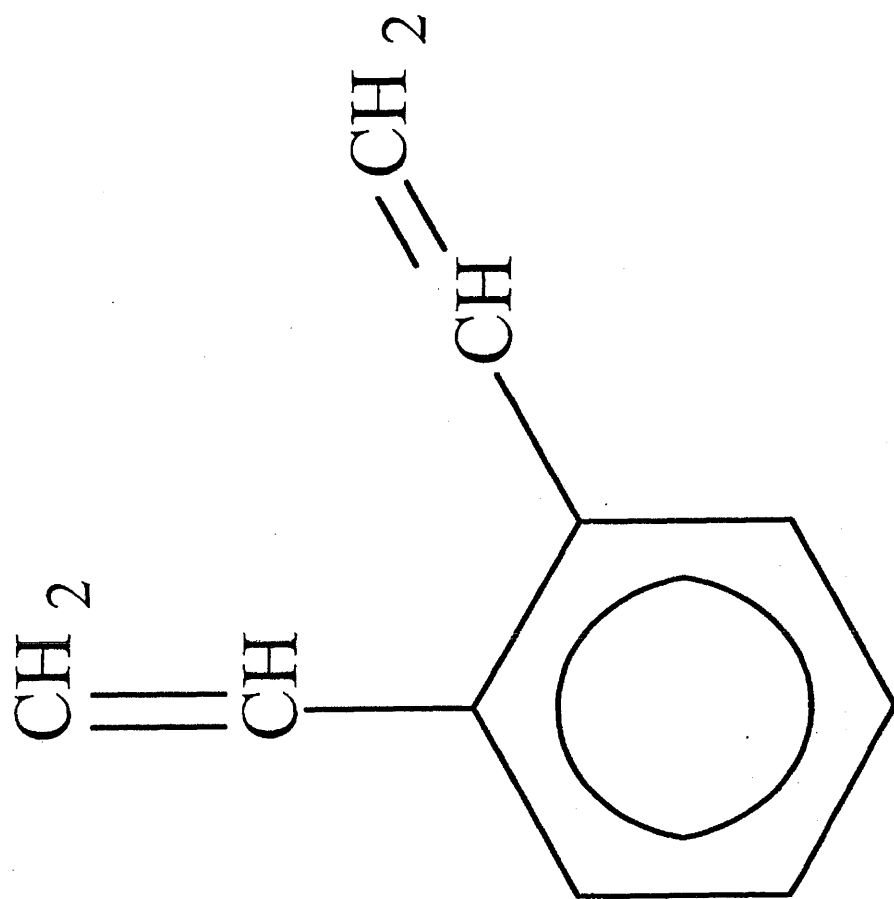


Fig. 1 Chemical structure of divinylbenzene

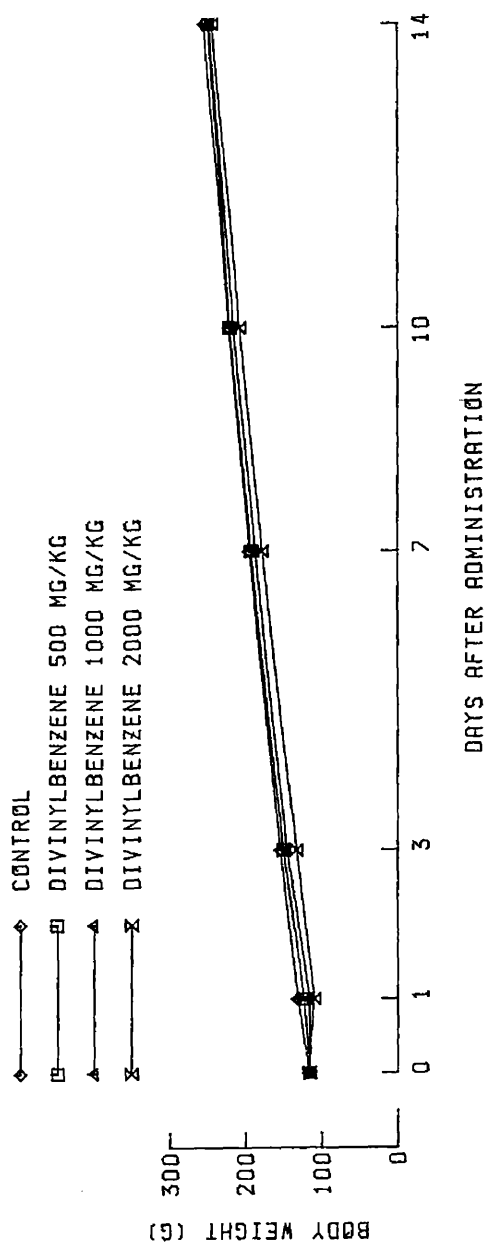


Fig. 2 Body weight of male rats in single dose oral toxicity test of divinylbenzene

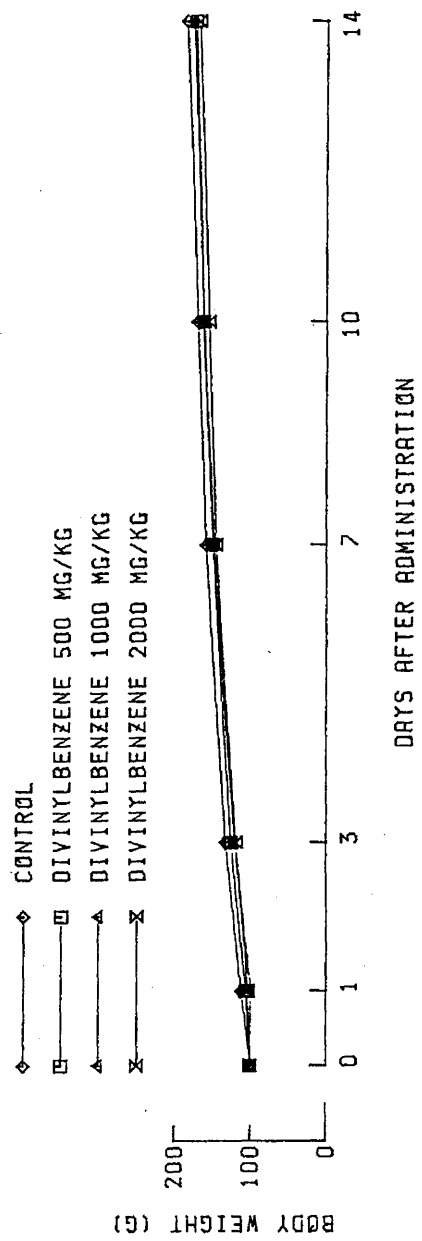


Fig. 3 Body weight of female rats in single dose oral toxicity test of divinylbenzene