

最終報告書

表 題：p-(α, α -ジメチルベンジル)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-9891

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	8
参考文献	8

Figures	添付
---------------	----

1. Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of p-(α , α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) (SR-9891)
2. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of p-(α , α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) (SR-9891)

Tables	添付
--------------	----

1. Experimental design for acute oral toxicity test of p-(α , α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) in rats (SR-9891)
2. Mortality and LD₅₀ of rats in acute oral toxicity test of p-(α , α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) (SR-9891)
3. General appearance of male rats in acute oral toxicity test of p-(α , α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) (SR-9891)
4. General appearance of female rats in acute oral toxicity test of p-(α , α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) (SR-9891)
5. Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of p-(α , α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) (SR-9891)
6. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of p-(α , α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) (SR-9891)
7. Gross findings of rats in acute oral toxicity test of p-(α , α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) (SR-9891)

要 約

p-(α , α -ジメチルベンジル)フェノールの0(対照群)、1500 および 2000 mg/kg を1群雌雄各5匹のCrj:CD(SD)IGSラットに単回経口投与し、死亡状況、一般状態等を観察し、その毒性を検討し、以下の成績を得た。

1. 1500 および 2000 mg/kg 群の雌雄ともに投与後1あるいは2日まで下痢および肛門周囲の被毛の汚れがみられ、雌ではさらに外尿道口周囲の被毛の汚れもみられたが、死亡例は認められず、LD₅₀値は雌雄とも2000 mg/kg以上と推定された。
2. 体重では、1500 mg/kg以上の投与群の雄で投与後1~5日、雌で投与後1日に有意な低値がみられたが、投与後14日間の体重増加量および体重増加率には雌雄とも変化は認められなかった。
3. 剖検では、各投与群の全例で変化は認められなかった。

以上のことから、p-(α , α -ジメチルベンジル)フェノールのラットにおける単回経口投与では、1500 mg/kg以上の投与で下痢および体重増加抑制がみられたが、死亡例もなく、投与後14日間の観察で重篤な毒性症状は認められなかった。したがって、本試験条件下でのLD₅₀値は雌雄とも2000 mg/kg以上と推定された。

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、p-(α , α -ジメチルベンジル)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、p-(α , α -ジメチルベンジル)フェノール(p-(α , α -dimethylbenzyl)phenol、以下 PCP と略す、CAS No. : 599-64-4、ロット番号： 純度：99.88%、提供者：
で、分子量 212.29、密度 1.077、融点(凝固点)72.5°C、沸点 189~191°C (10 mmHg の条件下)、引火点 176°C の可燃性固体類に属す白色結晶あるいはフレーク状の固体である。PCP は遮光気密容器に入れ、冷暗所(実測範囲 5~10°C)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、残余被験物質を用いて提供者である
が純度の分析を行い確認した(Appendix 1~3)。

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：901013、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、PCP 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

投与前日に、投与量ごとに PCP 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攪拌し、投与当日に溶解していることを確認した。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った。調製液は調製後速やかに遮光気密容器に入れ室温で保存した。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 および 200 mg/mL の濃度の調製液中の PCP の安定性の分析を実施した結果、PCP は調製液中で室温 3 時間、遮光・冷蔵(2~3°C)保存条件下で 8 日間安定であることが確認された(Appendix 4)。

投与に用いる各濃度の調製液について PCP の濃度を分析した結果、含有率は所定の濃度の 96.5 あるいは 103% 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、保土ヶ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 18 匹を 1999 年 6 月 2 日に 4 週齢で購入した。受入時の動物の体重範囲は、雄で 90～97 g、雌で 70～77 g であった。

(2) 検疫および馴化

受入後、個々の動物について 8 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 15 匹を選抜して、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った。これらの動物の体重範囲は、雄で 151～164 g、雌で 116～130 g であり、平均体重(雄 158.6 g、雌 123.8 g)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 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (実測範囲 $21 \sim 23^{\circ}\text{C}$)、湿度 $55 \pm 10\%$ (実測範囲 $46 \sim 64\%$)、換気回数 $10 \sim 15$ 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(307 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(300W×410D×200H, mm)に、検疫および馴化期間中は 3 あるいは 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 2～3 回洗浄滅菌済みのものと交換した。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(990203)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った。分析項目と許容値は(株)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 および 7)。

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あるいは微生物の有無を、1999年4月6日および1999年7月13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った。分析項目と許容値は(株)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 8 および 9)。

(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

PCP の投与量はオリブ油を溶媒とした予備試験(試験番号SR-9890)¹⁾の結果に基づいて設定した。予備試験では、250、500、1000、1500 および 2000 mg/kg の投与量で 1 群雌雄各 3 匹の Crj:CD(SD) IGS ラットに 1 回経口投与した結果、2000 mg/kg 群で雌雄とも 1/3 例が投与後 2 日に死亡し、死亡例で消化管の赤色化等の異常も認められた。一般状態では下痢等が、体重推移では投与後 1 日に体重増加抑制が雌雄とも各用量群に認められたが、生存例の剖検所見に PCP 投与の影響は認められなかった。以上のことから、投与量は予備試験における最大耐量である 1500 mg/kg および急性毒性の限界用量である 2000 mg/kg を設定し、また媒体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

PCP がヒトに経口的に暴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、一晚(16~17 時間)の絶食後、午前 9 時半から午前 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 時間を経過した時点で給餌を再開した。

投与容量は 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1時間間隔で観察した。投与後1日から投与後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 1401B MP7-2、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。

$$\text{体重増加量} = (\text{投与後14日体重}) - (0日体重)$$

$$\text{体重増加率} = [(\text{体重増加量}) / (0日体重)] \times 100$$

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で固定・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(パイエル板を含む)、盲腸、結腸、直腸、精巣(左右)、精巣上体(左右)および卵巣(左右)

4) 病理組織学的検査

肉眼的異常部位が認められなかったため、病理組織学的検査は実施しなかった。

5. 統計学的方法

死亡例が認められなかったため、probit法を用いるLD₅₀値および95%信頼限界の算出は行なわなかった。

体重、体重増加量および体重増加率について、Bartlettの検定法によって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った。対照群との比較検定については、群平均および標準偏差を用い、危険率5%以下を統計学的に有意とした。

成績

1. 死亡状況およびLD₅₀値

死亡状況およびLD₅₀値をTable 2に示す。

投与後の14日間に1500および2000 mg/kg群いずれにおいても死亡例は認められなかった。したがってLD₅₀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および4、INDIVIDUAL DATA 1-1-1~1-2-3に示す。

1500 mg/kg群では、投与後1時間以内から毒性症状が発現した。投与日には、下痢が雌雄とも各2例、肛門周囲の被毛の汚れが雄3例、雌1例にみられ、投与後1日には、下痢が雄3例、雌5例に、さらに雌の1例では肛門および外尿道口周囲の被毛の汚れも認められた。しかし、雌雄とも投与後2日以降には変化はみられず、死亡例も認められなかった。

2000 mg/kg群では、投与後30分あるいは1時間から毒性症状が発現した。投与日には、下痢が雌雄とも各3例、肛門周囲の被毛の汚れが雄4例、雌3例に、さらに雌の1例では外尿道口周囲の被毛の汚れも認められ、投与後1日には、下痢が雄3例、雌5例、肛門周囲の被毛の汚れが雄2例、肛門および外尿道口周囲の被毛の汚れが雌3例に認められた。しかし、投与後2日以降は、雄の1例で投与後2日に肛門周囲の被毛の汚れがみられた以外は雌雄とも変化はみられず、死亡例も認められなかった。

なお、対照群の雄では観察期間中に変化はみられなかったが、雌の1例で投与後2および3時間に下痢あるいは肛門周囲の被毛の汚れが認められた。しかしこの例も投与後4時間以降には変化は認められなかった。

3. 体重

体重推移をFigure 1および2、Table 5および6、INDIVIDUAL DATA 2-1-1~2-2-3に示す。

1500 mg/kg群では、雄で投与後1、3および5日に対照群と比較して有意な低値がみられたが、投与後7日以降には有意差は認められなかった。一方、雌では投与後1日に低値傾向はみられたものの有意差は認められず、投与後5日以降にはむしろ対照群より高値であった。また、投与後14日間の体重増加量および体重増加率に雌雄とも有意差は認められなかった。

2000 mg/kg群では、雌雄とも投与後1日に有意な低値がみられ、雄では投与後3および5日にも有意な低値が認められた。しかし、雄で投与後7日、雌で投与後3日以降に有意差は認められず、雌では投与後10日以降にはむしろ対照群より高値であった。また、投与後14日間の体重増加量および体重増加率に雌雄とも有意差は認められなかった。

4. 剖検

剖検所見をTable 7、INDIVIDUAL DATA 3-1-1~3-2-3に示す。

雌雄の各投与群の全例で異常は認められなかった。

考 察

OECD 既存化学物質の安全性点検事業の一環として、PCP を 1 群雌雄各 5 匹の Crj:CD(SD) IGS ラットにそれぞれ 1500 および 2000 mg/kg の投与量で単回経口投与して、その毒性を検討した。

その結果、1500 および 2000 mg/kg 群の雌雄ともに下痢および肛門周囲の被毛の汚れがみられ、雌ではさらに外尿道口周囲の被毛の汚れもみられたが、死亡例は認められなかった。雌雄とも最大耐量は 2000 mg/kg であったことから、LD₅₀ 値は 2000 mg/kg 以上と推定され、性差も認められなかった。

体重では、1500 および 2000 mg/kg 群の雄で投与後 1~5 日に、雌で投与後 1 日に有意な低値がみられたが、投与後 7 日以降には雌雄とも順調な体重増加を示し、投与後 14 日間の体重増加量および体重増加率にも雌雄とも有意差は認められなかった。この変化は投与日および投与後 1 日にみられた下痢の影響と考えられ、症状の消失とともに体重も回復したものと推察された。

剖検でも、各投与群の全例で異常は認められなかった。予備試験¹⁾において死亡例に粘膜の暗赤色斑が認められていることから、PCP の粘膜に対する障害性が推察されたが、本試験では確認することができなかった。

以上のことから、PCP のラットにおける単回経口投与では、1500 mg/kg 以上の投与で下痢および体重増加抑制がみられたが、死亡例もなく、投与後 14 日間の観察で重篤な毒性症状は認められなかった。したがって、本試験条件下での LD₅₀ 値は雌雄とも 2000 mg/kg 以上と推定された。

参考文献

- 1) p-(α , α -ジメチルベンジル)フェノールのラットにおける急性経口投与毒性試験のための予備試験(SR-9890)：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 p-(α , α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) (SR-9891)

Figure 2. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of p-(α , α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) (SR-9891)

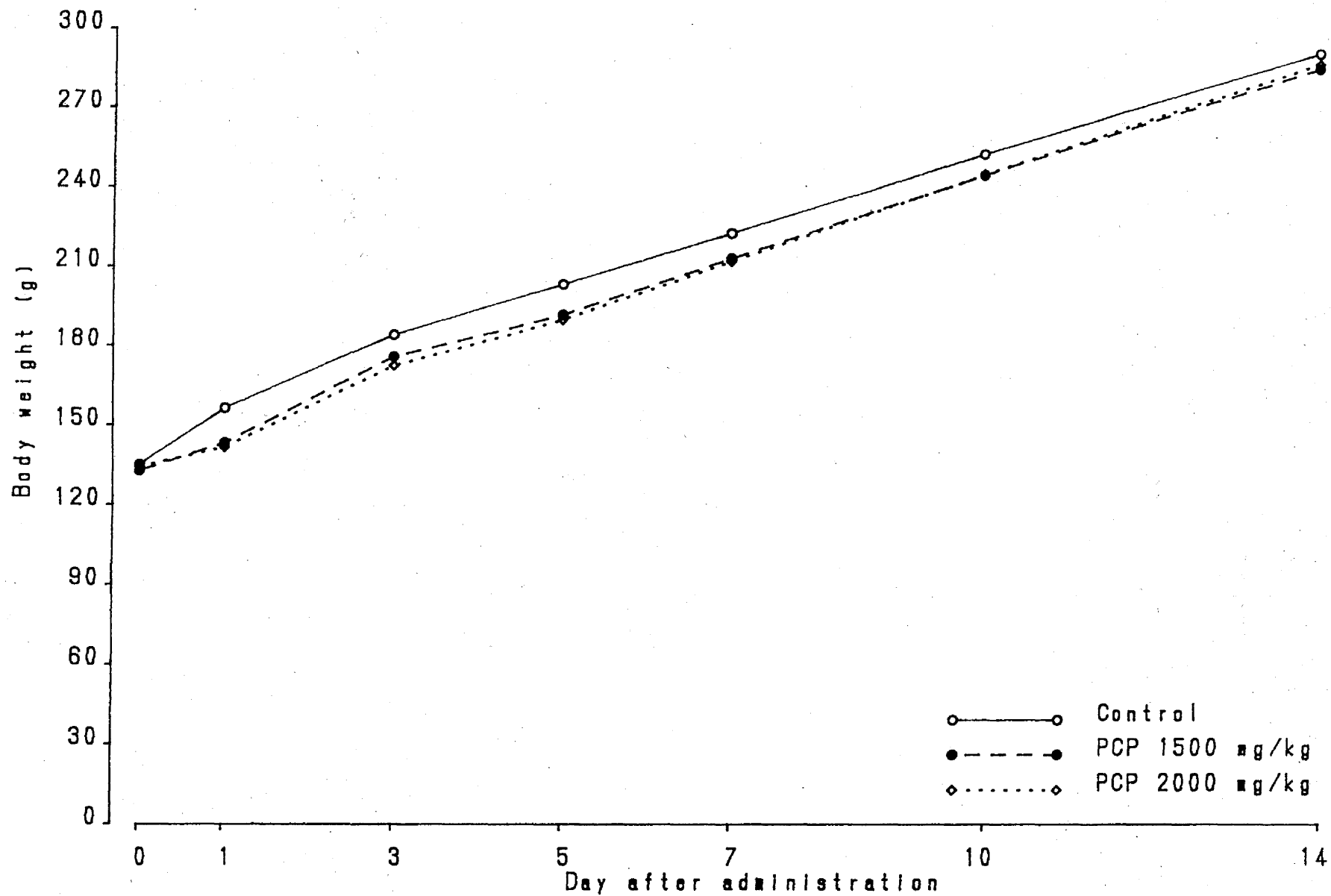


Figure 1. Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of p-(α, α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) (SR-9891)

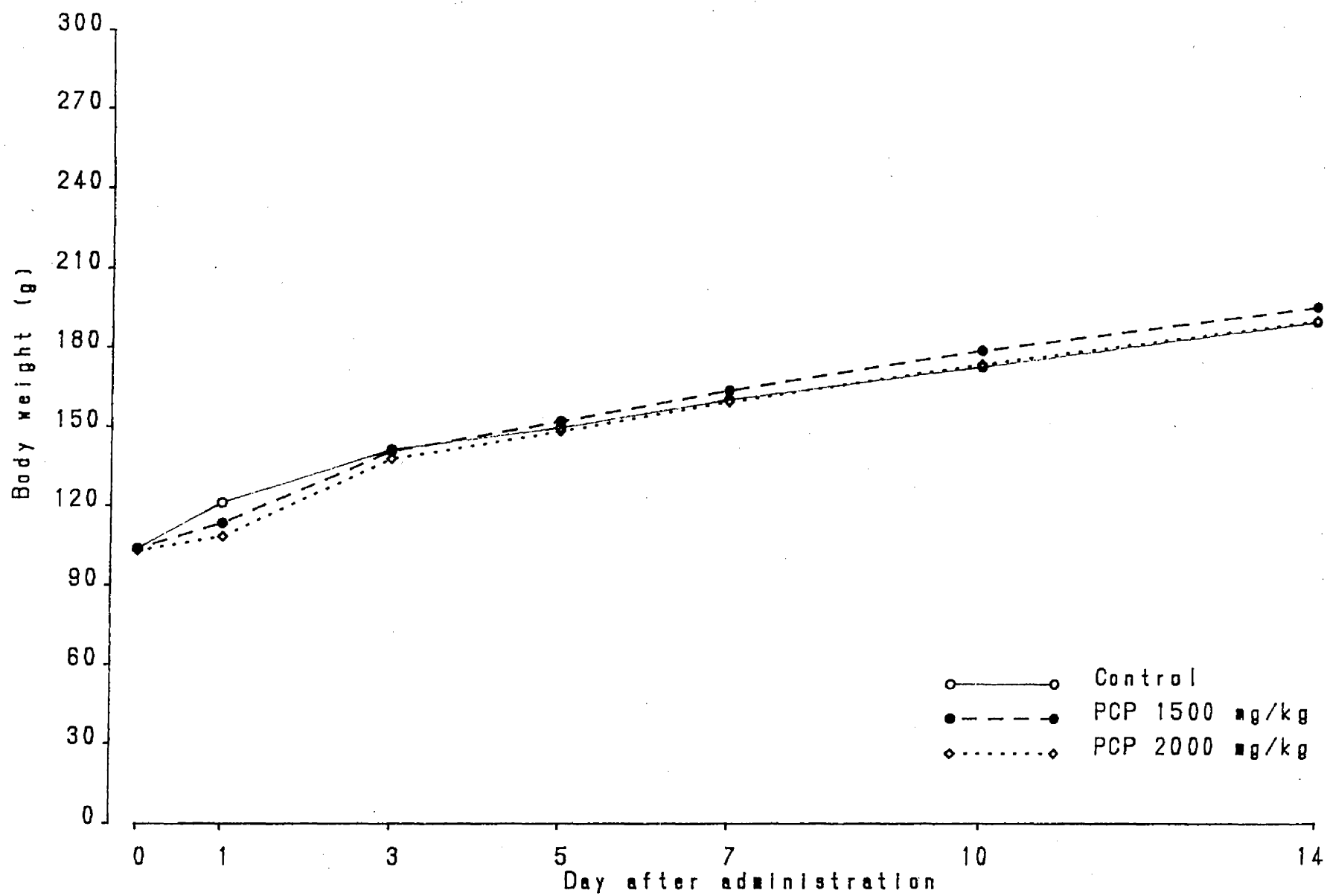


Figure 2. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of p -(α, α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) (SR-9891)

Tables

- Table 1. Experimental design for acute oral toxicity test of p-(α , α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) in rats (SR-9891)
- Table 2. Mortality and LD₅₀ of rats in acute oral toxicity test of p-(α , α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) (SR-9891)
- Table 3. General appearance of male rats in acute oral toxicity test of p-(α , α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) (SR-9891)
- Table 4. General appearance of female rats in acute oral toxicity test of p-(α , α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) (SR-9891)
- Table 5. Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of p-(α , α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) (SR-9891)
- Table 6. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of p-(α , α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) (SR-9891)
- Table 7. Gross findings of rats in acute oral toxicity test of p-(α , α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) (SR-9891)

Table 1. Experimental design for acute oral toxicity test of p-(α , α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) in rats (SR-9891)

Group	Concentration of PCP mg/mL	Volume mL/kg	No. of animals ^a (Animal No.)	
			Male	Female
Control ^b	0	10	5 (101~105)	5 (151~155)
PCP ^c 1500 mg/kg	150	10	5 (201~205)	5 (251~255)
PCP 2000 mg/kg	200	10	5 (301~305)	5 (351~355)

a: Crj:CD(SD)IGS rats were dosed orally at the age of 5 weeks.

b: Rats in the control group was dosed with olive oil.

c: PCP was dissolved in olive oil.

Table 2. Mortality and LD₅₀ of rats in acute oral toxicity test of p-(α,α -dimethylbenzyl)phenol(PCP) (SR-9891)

Sex	Group	<u>Distribution of dead animals</u>		Mortality ^b	LD ₅₀ value
		0 ^a	1-14		
Male	Control	0	0	0/5	>2000 mg/kg
	PCP 1500 mg/kg	0	0	0/5	
	PCP 2000 mg/kg	0	0	0/5	
Female	Control	0	0	0/5	>2000 mg/kg
	PCP 1500 mg/kg	0	0	0/5	
	PCP 2000 mg/kg	0	0	0/5	

a: Days after administration.

b: No. of dead animals / no. of animals dosed.

Table 3. General appearance of male rats in acute oral toxicity test of p-(α,α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) (SR-9891)

Item	Control	PCP (mg/kg)	
		1500	2000
From administration day to next day			
No. of animals examined	5	5	5
No abnormal findings	5 ^a	1	1
Diarrhea	0	3	3
Soiled of perianal fur	0	3	4
2-14 days after administration			
No. of animals examined	5	5	5
No abnormal findings	5	5	4
Soiled of perianal fur	0	0	1

a: Values are no. of animals with findings.

Table 4. General appearance of female rats in acute oral toxicity test of p-(α,α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) (SR-9891)

Item	Control	PCP (mg/kg)	
		1500	2000
From administration day to next day			
No. of animals examined	5	5	5
No abnormal findings	4 ^a	0	0
Diarrhea	1	5	5
Soiled of perianal fur	1	1	3
Soiled of perigenital fur	0	1	3
2-14 days after administration			
No. of animals examined	5	5	5
No abnormal findings	5	5	5

a: Values are no. of animals with findings.

Table 5. Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of p-(α , α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) (SR-9891)

Group	No. of animals	Day after administration							Body weight gain	
		0	1	3	5	7	10	14	Day 0-14	% ^a
Control	5	^b							155.6	115.078
		135.2	156.4	184.2	203.4	222.6	252.6	290.8		
PCP 1500 mg/kg	5	133.0	143.4**	175.8*	191.8*	213.2	244.8	285.0	152.0	114.202
		4.9	2.9	6.5	8.4	10.4	11.3	18.2	14.5	8.691
PCP 2000 mg/kg	5	134.4	141.8**	172.4**	190.0*	212.2	245.0	286.8	152.4	113.358
		3.2	4.5	3.6	3.4	4.5	7.8	11.9	9.6	5.749

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, $p \leq 0.05$.

** : Differs from control, $p \leq 0.01$.

Table 6. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of p-(α, α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) (SR-9891)

Group	No. of animals	Day after administration							Body weight gain	
		0	1	3	5	7	10	14	Day 0-14	% ^a
Control	5	103.8 ^b	121.2	141.4	149.8	160.4	172.6	189.8	86.0	82.750
		3.6	5.1	6.4	4.4	8.6	10.4	12.9	10.3	8.362
PCP 1500 mg/kg	5	103.8	113.4	140.8	152.2	163.8	178.8	195.4	91.6	88.020
		4.1	8.0	6.9	10.4	11.1	13.4	15.5	11.5	7.955
PCP 2000 mg/kg	5	103.0	108.4*	138.0	148.4	159.6	173.6	190.2	87.2	84.638
		4.5	5.6	4.5	7.4	9.3	14.4	14.4	12.2	10.955

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, $p \leq 0.05$.

Table 7. Gross findings of rats in acute oral toxicity test of p-(α , α -dimethylbenzyl)phenol (PCP) (SR-9891)

Item	Male			Female		
	Control	PCP (mg/kg)		Control	PCP (mg/kg)	
		1500	2000		1500	2000
No. of animals examined	5	5	5	5	5	5
Abnormal findings	0 ^a	0	0	0	0	0

a: Values are no. of animals with findings.