厚生省生活衛生局　殿

最 終 報 告 書

2,4,6-トリニトロフェノールのラットを用いた
経口投与による単回投与毒性試験

(試験番号：8L655)

2000 年 7 月 7 日

株式会社三菱化学安全科学研究所

目 次

要約 ····· 7
緒言 ····· 8
材料および方法 ····· 9
1. 被験物質 ····· 9
2. 試験動物 ····· 9
3. 動物飼育 ····· 10
4. 投与 ····· 11
5. 群構成 ····· 11
6. 観察・測定項目 ····· 12
6.1 一般状態 ····· 12
6.2 体重 ····· 12
6.3 病理学的検査 ····· 12
7. 半数致死量 (LD50 値) の算出 ····· 12
結果および考察 ····· 13
1. 死亡および LD50 値 ····· 13
2. 一般状態 ····· 13
3. 体重 ····· 13
4. 剖検所見 ····· 13
5. 考察 ····· 14
参考文献 ····· 15

図および群別表

要 約

2,4,6-トリニトロフェノールを1群あたり5匹のSD系ラットに1回経口投与し，その急性毒性を検討した．投与用量は雌雄に0, 200, 400および800 mg/kg，さらに雌には100 mg/kg，投与液量は10 mL/kgとし，投与後14日間の観察を行った．

その結果，200 mg/kg群の雌1例，400 mg/kg群の雄1例，雌4例，800 mg/kg群の雌雄全例が投与日に死亡した．

死亡動物では，一般状態観察において，200 mg/kg群の雌に着色尿（濃黄色），皮膚の着色（黄色）および歩行異常，400 mg/kg群の雄に着色尿（濃黄色）および歩行異常，400 mg/kg群の雌および800 mg/kg群の雌雄に自発運動の低下，歩行異常，間代性けいれん，着色尿（濃黄色），皮膚の着色（黄色），腹臥位あるいは側臥位，800 mg/kg群の雄に紅涙，雌に軟便が認められた．剖検においては，腺胃壁の硬固が400および800 mg/kg群の雌雄，腺胃の出血が200 mg/kg群の雌，400および800 mg/kg群の雌雄，腺胃壁の肥厚が800 mg/kg群の雌，全身の黄色化が全死亡例に認められた．

生存動物では，全被験物質投与群に着色尿（濃黄色），被毛の着色（黄色），400 mg/kg群の雌雄に自発運動の低下，歩行異常，着色尿（濃黄色）および皮膚の着色（黄色），400 mg/kg群の雄に間代性けいれん，軟便および下腹部の汚れが認められた．体重では，いずれの被験物質投与群も対照群と同様に推移した．剖検では，全被験物質投与群に被毛の着色（黄色）が認められた．

2,4,6-トリニトロフェノールを雌雄のラットに1回経口投与した結果，半数致死量（LD_{50}値）は，雄では492 mg/kg（95%信頼限界 375～646 mg/kg），雌では283 mg/kg（95%信頼限界 168～478 mg/kg）と結論した．

緒 言

2,4,6-トリニトロフェノールは，火薬，花火，農薬，染料の原料である[1].

今回，既存化学物質の安全性点検調査事業の一環として，ラットを用いて単回投与毒性試験を実施し，生体への毒性学的影響について検討したので報告する.

材料および方法

1. 被験物質

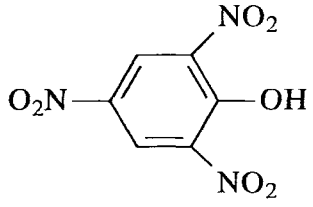
から提供された2,4,6-トリニトロフェノール (略称 PA, 別名 ピクリン酸, CAS No. 88-89-1, ロット番号 純度 81.4%) を使用した. 被験物質は下記の化学名, 構造式, 分子量および不純物を有する沸点 >300℃, 融点 122℃, 比重 1.8, 相対蒸気密度 7.9 (空気= 1), 水での溶解度 1:100 (冷水中), 7:100 (沸騰水中), 分配係数 2.03 の黄色結晶である. また, 衝撃, 摩擦または振動を加えると爆発的に分解することがある. 加熱すると爆発することがあり, 金属, 特に銅, 鉛, 水銀, 亜鉛により衝撃に敏感な化合物が形成される. 燃焼すると有毒な炭素および窒素の酸化物を生成する. 酸化剤, 還元剤の物質と激しく反応する.

被験物質は冷所, 遮光, 通風, 換気条件下で保存した.

被験物質の安定性は, 被験物質提供者より保証する資料を入手し, 確認した.

化学名： 2,4,6-trinitrophenol

構造式：



分子量： 229.05

不純物： 水 18.5%
不明分 0.1%

2. 試験動物

日本チャールス・リバー㈱ (生産場所 厚木) から 1999 年 7 月 7 日に雌雄各 23 匹, 1999 年 8 月 4 日に雌 6 匹の Crj:CD(SD)IGS ラット (SPF) を入手した.

動物入荷後, 5 日間検疫・馴化し, いずれの動物も健康状態が良好なことを確認した. 投与前日に, 体重層別化無作為抽出法によって各群の体重がほぼ均一となるように群分けし, 雄 20 匹, 雌 25 匹を使用した. 投与日の週齢は 5 週齢, 体重範囲は雄が 120～128 g, 雌が 101～117 g であった.

動物は，尾に油性ペンによる番号付けを行い，個体識別した．ケージには試験番号，被験物質名，試験種，動物番号，性別，用量，投与日，動物種および系統を記載したラベルを付けた．

3. 動物飼育

検疫・馴化期間を含む全飼育期間を通して，温度 22±2℃ (目標値)，相対湿度 55±15% (目標値)，換気約 12 回／時 (オールフレッシュエアー供給)，照明 12 時間／日 (7:00 - 19:00)に自動調節した飼育室を使用した．当研究所で定めた温湿度の許容範囲は 19～25℃，35～75%であり，実測値はそれぞれ 22～24℃，56～79%であった．湿度については，1999 年 7 月 21 日に上昇 (10:10-10:20，最高湿度 79%) して許容範囲外となった．また，1999 年 7 月 8 日 (16:31) から 7 月 9 日 (9:23) の間，飼育室の温度測定の記録が誤操作のため停止し，この間の温度を確認できなかった．1999 年 8 月 21 日 (7:00-9:00, 19:00-23:00) に点検のために停電して空調の制御が停止した．しかし，該当日の前後で動物に一般状態の変化がみられなかったことから，試験系への影響はなかったと判断した．

動物は，滅菌済の実験動物用床敷 (ベータチップ，日本チャールス・リバー㈱) を敷いたポリカーボネート製ケージ (265W×426D×200H mm,トキワ科学器械㈱) に，群分け前はケージあたり 5 または 3 匹 (同性)，群分け後はケージあたり 5 匹 (同性) 収容し，スチール製架台 (トキワ科学器械㈱) 上に配置して飼育した．給餌には滅菌済ステンレス製固型飼料用給餌器 (トキワ科学器械㈱) を，給水には滅菌済ポリカーボネート製給水瓶 (700 mL,トキワ科学器械㈱) を使用した．ケージ (含床敷)，給餌器および給水瓶は週 1 回交換した．

動物には，実験動物用固型飼料 (MF,オリエンタル酵母工業㈱) と，5 μm のフィルター濾過後，紫外線照射した水道水を自由に摂取させ，飼料および飲用水は週 1 回交換した．

床敷と飼料中の残留農薬等の汚染物質濃度が，当研究所で定めた基準に適合していることを確認した．また，飲用水は水道法に準拠した水質検査を定期的に実施し，分析値が基準範囲内にあることを確認している．

4. 投与

投与経路はOECDｶﾞｲﾄﾞﾗｲﾝ (No.401, 1987) に従い経口，投与回数は1回とした．投与前日より約18時間絶食させたラットにゾンデを用いて強制経口投与し，投与後約3時間は飼料を与えなかった．

予備試験として，被験物質を50, 200, 800 mg/kgの用量で1群雌雄各3匹のSD系ラットに単回経口投与し，投与後7日間観察した．その結果，800 mg/kg群の雌雄全例が死亡し，50および200 mg/kg群では，重篤な変化はみられなかった．このため，本試験の用量は雌雄ともに800 mg/kgを最高用量とし，以下公比2で400および200 mg/kgの3用量および溶媒のみを投与する対照群を設けた．しかし，本試験において200 mg/kg群の雌1例が死亡したため，雌についてさらに100 mg/kgの用量を追加した．投与液量は10 mL/kgとし，投与直前の体重に基づいて算出した．

投与液の調製は100 mg/kg群については投与3日前，それ以外の群については投与日に行った．被験物質を0.1%Tween80添加0.5%CMC-Na水溶液 (Tween80 東京化成工業㈱, ロット番号 GH01，CMC-Na 岩井化学薬品㈱, ロット番号 041210) で懸濁あるいは溶解調製した．なお，調製時には被験物質の純度換算 (純度 81.4%) を行った．また，投与液は使用まで室温保存した．

投与液中の被験物質が0.1から200 mg/mLの範囲で均一であること，室温保存条件下で0.1から10 mg/mLの範囲で8日間，200 mg/mLまでは4日間安定であることを確認した (添付資料1)．なお，投与液は10 mg/mL以下の濃度では溶液，20 mg/mL以上の濃度では懸濁液である．また，各用量群の投与液を分析し，設定濃度の±10%以内であることを確認した (添付資料2)．

5. 群　構　成：

群　名	動物数(匹)	動物番号
0 mg/kg	雄5	10101-10105
	雌5	50101-50105
100 mg/kg	雌5	70101-70105
200 mg/kg	雄5	10201-10205
	雌5	50201-50205
400 mg/kg	雄5	10301-10305
	雌5	50301-50305
800 mg/kg	雄5	10401-10405
	雌5	50401-50405

6. 観察・測定項目

次の項目を検査した．なお，日の表記は投与日を第 1 日とした．

6.1 一般状態

投与日は 15, 30 分，1，3 および 6 時間の 5 回，以後は 1 日 1 回 14 日間にわたって各動物の生死および一般状態を観察した．

6.2 体重

生存動物について投与直前，第 4，8 および 15 日に上皿電子天秤 (EB-5000, EB-3200S, ㈱島津製作所) を用いて測定した．

6.3 病理学的検査

観察終了後 (第 15 日) に生存動物をチオペンタール・ナトリウム (ラボナール，田辺製薬㈱) の腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈を切断・放血し，安楽死させた後剖検した．また，死亡動物については発見後速やかに剖検した．

7. 半数致死量 (LD_{50} 値) の算出

観察終了時の死亡率から雄については Van der Waerden 法で，雌については Probit 法で算出した．

結果および考察

1. 死亡および LD_{50} 値 (Table 1)

200 mg/kg 群の雌 1 例，400 mg/kg 群の雄 1 例，雌 4 例，800 mg/kg 群の雌雄全例が投与日に死亡した．LD_{50} 値は，雄では 492 mg/kg (95%信頼限界 375～646 mg/kg)，雌では 283 mg/kg (95%信頼限界 168～478 mg/kg) であった．

2. 一般状態 (Table 2, Appendix 1)

死亡動物では，200 mg/kg 群の雌に着色尿 (濃黄色)，皮膚の着色 (黄色) および歩行異常，400 mg/kg 群の雄に着色尿 (濃黄色) および歩行異常，400 mg/kg 群の雌および 800 mg/kg 群の雌雄に自発運動の低下，歩行異常，間代性けいれん，着色尿 (濃黄色)，皮膚の着色 (黄色)，腹臥位あるいは側臥位が認められた．この他，800 mg/kg 群では雄に紅涙，雌に軟便がみられた．

生存動物では，投与日に全被験物質投与群に着色尿 (濃黄色)，400 mg/kg 群の雌雄に自発運動の低下，歩行異常，着色尿 (濃黄色) および皮膚の着色 (黄色)，400 mg/kg 群の雄に間代性けいれん，軟便および下腹部の汚れが認められた．これらの症状のうち，着色尿は 200 mg/kg 群の雌と 400 mg/kg 群の雄，歩行異常は 400 mg/kg 群の雌で第 2 日までみられた．第 3 日から第 9 日までは異常はみられなかったが，第 10 日以降には被毛の着色 (黄色) が全被験物質投与群でみられた．

3. 体重 (Figure 1, Table 3, Appendix 2)

生存動物の体重は対照群とほぼ同様に増加した．

4. 剖検所見 (Table 4, Appendix 3)

死亡動物では，腺胃壁の硬固が 400 mg/kg 群の雄 1 例，雌 2 例，800 mg/kg 群の雄全例，雌 4 例，腺胃の出血が 200 mg/kg 群の雌 1 例，400 mg/kg 群の雄 1 例，雌 4 例，800 mg/kg 群の雄全例，雌 4 例，腺胃壁の肥厚が 800 mg/kg 群の雌 1 例，全身の黄色化が全例に認められた．

生存動物では，被験物質投与群の全例に被毛の着色 (黄色) が認められた．

5. 考察

2,4,6-トリニトロフェノールを雌雄のラットに0, 200, 400および800 mg/kgの用量，さらに雌には100 mg/kgの用量を1回経口投与した結果，200 mg/kg群の雌1例，400 mg/kg群の雄1例，雌4例，800 mg/kg群の雌雄全例が死亡した．本被験物質のLD_{50}値は，雄では492 mg/kg (95%信頼限界 375～646 mg/kg)，雌では283 mg/kg (95%信頼限界 168～478 mg/kg) と結論した．

参 考 文 献

1) 第6類 火薬類，ピクリン酸，“12093の化学商品” 東京，化学工業日報社，p.271.

図 お よ び 群 別 表

Figure 1 体重 ····· 1

Table 1 死亡 ····· 3

Table 2 一般状態 ····· 4

Table 3 体重 ····· 6

Table 4 剖検所見 ····· 8

Figure 1 - 1 Mean Body Weight - Male

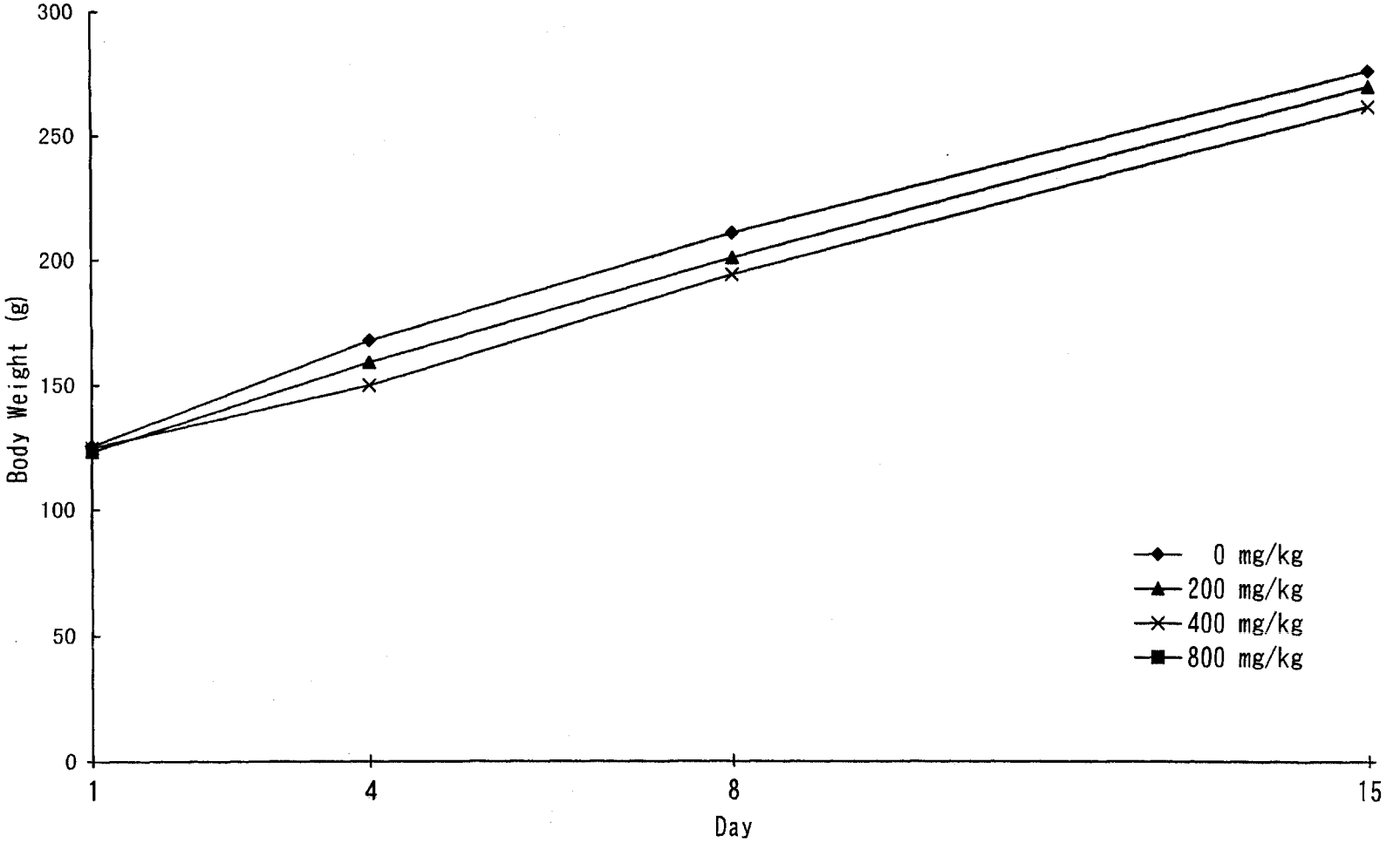


Figure 1 - 2 Mean Body Weight - Female

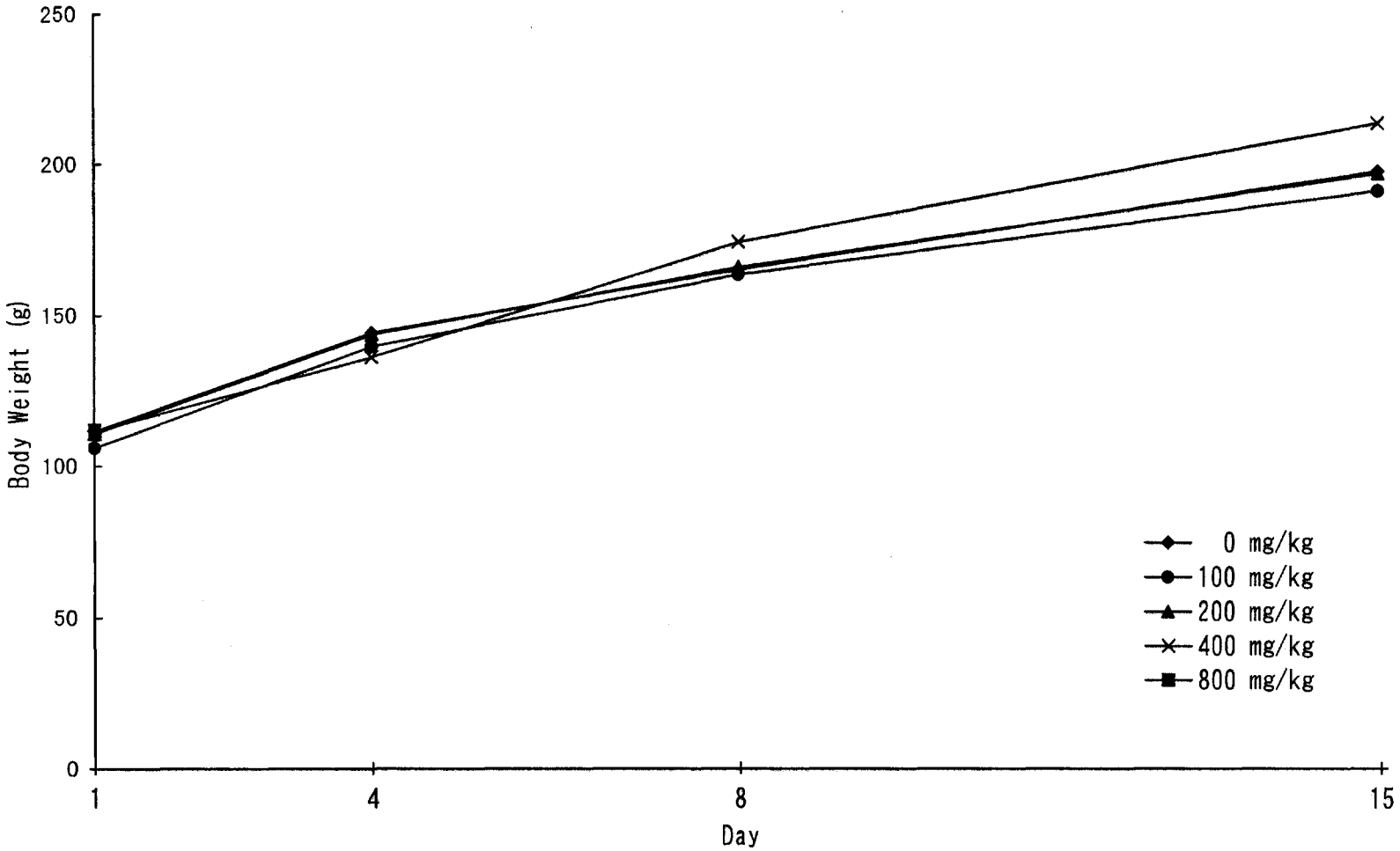


Table 1 Mortality (Cumulative) Study No. 8L655

Test Substance : PA

Sex	Dose (mg/kg)	Day	1					2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Mortality (%)
		Time	15m	30m	1h	3h	6h															
Male	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	200		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	400		0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	20
	800		0	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
Female	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	200		0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	20
	400		0	0	1	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	80
	800		0	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100

Table 2 - 1 Clinical Sign - Summary Study No. 8L655
Test Substance : PA Male

Dose (mg/kg)	Findings	Grade	Day Time	1 15m	30m	1h	3h	6h	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	Number of Animals			5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	No Abnormality			5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
200	Number of Animals			5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	No Abnormality			5	4	5	3	4	5	5	5	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0
	Coloring of fur			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5	5	5
	Chromaturia			0	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	Number of Animals			5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	No Abnormality			5	3	2	2	1	3	4	4	4	4	4	4	4	0	0	0	0	0	0
	Death			0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Decrease in locomotor activity	1		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Abnormal gait			0	0	3	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Clonic convulsion			0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Coloring of fur			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4
	Coloring of skin			0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Soiled perineal region			0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Chromaturia			0	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Loose stool			0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
800	Number of Animals			5	5	4																
	No Abnormality			1	0	0																
	Death			0	1	4																
	Prone position			0	3	0																
	Lateral position			0	1[1)]	0																
	Decrease in	1		4	1	0																
	locomotor activity	3		0	2	0																
	Abnormal gait			4	0	0																
	Clonic convulsion			0	5[1)]	0																
	Coloring of skin			2	5[1)]	0																
	Reddish tear	1		0	2[1)]	0																
	Chromaturia			0	2	0																

Grade (1, Slight ; 3, Severe)
1) , One animal died.

Table 2 - 2 Clinical Sign - Summary

Test Substance : PA

Study No. 8L655

Female

Dose (mg/kg)	Findings	Grade	Day Time	1 15m	30m	1h	3h	6h	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	Number of Animals			5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	No Abnormality			5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
100	Number of Animals			5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	No Abnormality			5	5	5	4	3	3	5	5	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0
	Coloring of fur			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5	5	5
	Chromaturia			0	0	0	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	Number of Animals			5	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	No Abnormality			5	4	4	2	3	2	4	4	4	4	4	4	4	0	0	0	0	0	0
	Death			0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Abnormal gait			0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Coloring of fur			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4
	Coloring of skin			0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Chromaturia			0	1	1	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	Number of Animals			5	5	5	4	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	No Abnormality			5	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	Death			0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Prone position			0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Decrease in	1		0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	locomotor activity	2		0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Abnormal gait			0	4	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Clonic convulsion			0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Coloring of fur			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
	Coloring of skin			0	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Chromaturia			0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
800	Number of Animals			5	5	2																
	No Abnormality			0	0	0																
	Death			0	3	2																
	Prone position			1	1[1)]	0																
	Lateral position			0	3[1)]	0																
	Decrease in	1		1	0	0																
	locomotor activity	2		1	4[2)]	0																
	Abnormal gait			4	0	0																
	Clonic convulsion			1	4[2)]	0																
	Coloring of skin			2	4[2)]	0																
	Chromaturia			0	2	0																
	Loose stool			0	1	0																

Grade (1, Slight ; 2, Moderate)

1) , One animal died ; 2) , Two animal died.

Table 3 - 1 Body Weight - Summary

Test Substance : PA

Male

Study No. 8L655

Unit : g

Dose (mg/kg)	Day	1	4	8	15
0	Mean	125.6	167.8	210.6	275.6
	S.D.	2.8	4.9	7.3	12.1
	n	5	5	5	5
200	Mean	123.4	159.2	200.8	269.4
	S.D.	2.7	5.4	7.6	12.4
	n	5	5	5	5
400	Mean	125.0	150.0	194.0	261.3
	S.D.	2.5	10.7	12.4	14.6
	n	5	4	4	4
800	Mean	123.6			
	S.D.	3.3			
	n	5	0	0	0

Table 3 - 2 Body Weight - Summary

Test Substance : PA

Female

Study No. 8L655

Unit : g

Dose (mg/kg)	Day	1	4	8	15
0	Mean	111.4	144.2	165.0	197.0
	S.D.	4.5	9.2	11.6	14.4
	n	5	5	5	5
100	Mean	106.0	139.6	163.4	190.6
	S.D.	4.8	8.3	12.3	16.8
	n	5	5	5	5
200	Mean	110.6	143.5	165.8	196.3
	S.D.	5.0	5.4	7.1	6.9
	n	5	4	4	4
400	Mean	111.4	136.0	174.0	213.0
	S.D.	3.2			
	n	5	1	1	1
800	Mean	112.0			
	S.D.	3.9			
	n	5	0	0	0

Table 4 - 1 Necropsy Findings - Summary Scheduled Sacrifice (Day 15) Study No. 8L655
Test Substance : PA

Organ / Findings	Sex :	Male				Female				
	Dose (mg/kg) :	0	200	400	800	0	100	200	400	800
	Number of Animals :	5	5	4	0	5	5	4	1	0
Skin										
Tinction of fur, yellow		0	5	4	0	0	5	4	1	0

Table 4 - 2 Necropsy Findings - Summary Dead Animals Study No. 8L655
Test Substance : PA

Organ / Findings	Sex :	Male				Female				
	Dose (mg/kg) :	0	200	400	800	0	100	200	400	800
	Number of Animals :	0	0	1	5	0	0	1	4	5
Stomach										
Hard, wall, glandular stomach		0	0	1	5	0	0	0	2	4
Hemorrhage, glandular stomach		0	0	1	5	0	0	1	4	4
Thickening of wall, glandular stomach		0	0	0	0	0	0	0	0	1
Whole body										
Coloring, yellow		0	0	1	5	0	0	1	4	5