

2003年 9月29日

アゼライン酸ビス(2-エチルヘキシル)の
ラットを用いる急性経口投与毒性試験

厚生労働省医薬局審査管理課安全対策室 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

【目 次】

	頁
要 約	1
試験目的	2
材料および方法	3
1. 被験物質	3
2. 使用動物および飼育条件	3
3. 群分けおよび個体識別	4
4. 投与検体の調製	4
5. 投与量、群構成および投与方法	5
6. 観察方法	5
7. データの解析	6
結 果	7
1. 死亡動物および一般状態	7
2. 体重推移	7
3. 病理学検査	7
考 察	8

Fig. 1

Tables 1~3

【要 約】

Sprague-Dawley 系[Crj:CD(SD)IGS,SPF]雌雄ラットにアゼライン酸ビス(2-エチルヘキシル) (以下 BEHA と略記) の 0 (媒体対照、コーン油 5mL/kg) および 2000 mg/kg を単回経口投与し、投与日 (観察第 1 日) から 14 日間観察を行い、その間、体重を測定して対照群と比較し、観察第 15 日に屠殺して剖検した。

その結果、15 日間の観察期間中に死亡例はなく、BEHA 投与に起因した一般状態の異常も認められなかった。さらに、体重増加にも BEHA 投与の影響はみられず、剖検においても異常所見は認められなかった。

以上の結果から、2000 mg/kg の BEHA をラットに単回経口投与しても影響は認められないと結論された。

【試 験 目 的】

OECD による既存化学物質安全性点検に係る毒性調査の一環として、アゼライン酸ビス(2-エチルヘキシル)のラットを用いる急性経口投与毒性試験を実施したので、その結果を報告する。

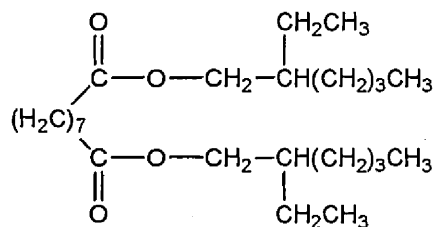
本試験は、OECD 化学物質試験法ガイドライン「[401]急性経口毒性試験」(1987年2月24日採択)および「化学物質 GLP」(平成12年3月1日改正、環保安第41号、生衛発第268号、平成12・02・14 基局第1号)に準拠して実施した。

【材料および方法】

1. 被験物質

アゼライン酸ビス(2-エチルヘキシル) (以下 BEHA と略記) は、英名 bis(2-ethylhexyl)-nonanedioate、別名 bis(2-ethylhexyl)azelate、CAS No.: 103-24-2、分子式: $C_{25}H_{48}O_4$ 、分子量: 412.66、融点: $-60^{\circ}C$ 、沸点: $220-245^{\circ}C$ (0.53 kPa)、比重: 0.919、蒸気圧: 0.13 kPa の淡黄色透明の液体で、下図に示した構造式を有する。本試験には、より提供を受けた BEHA (ロット番号: 純度: 77.2%、不純物: グルタル酸ビス 2-エチルヘキシル 2.2%、アジピン酸ビス 2-エチルヘキシル 2.4%、ピメリン酸ビス 2-エチルヘキシル 2.8%、スベリン酸ビス 2-エチルヘキシル 3.8%、セバシン酸ビス 2-エチルヘキシル 3.3%、1-,9-ノナメチレンジカルボン酸ビス 2-エチルヘキシル 5.3%、1-,10-デカメチレンジカルボン酸ビス 2-エチルヘキシル 0.6%、1-,11-ウンデカメチレンジカルボン酸ビス 2-エチルヘキシル 0.3%) を用い、使用時まで密封して室温で保管した。本試験で使用した BEHA は、投与終了後に返却して、品質を再分析した結果、試験期間中の安定性が確認された (Table A)。

図 構造式



2. 使用動物および飼育条件

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 Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD)IGS, SPF] ラットを使用した。雌雄動物は4週齢で購入し、入荷日を含む6日間、検疫と馴化を兼ねて飼育し、その間、外観および一般状態を観察して異常の認められなかった動物を使用した。動物の使用状況は Table B に示した。

各動物は、許容温湿度各 $21.0\sim 25.0^{\circ}C$ および、 $40\sim 75\%$ 、換気回数約 15 回/時間、照明 12 時間 (7 時~19 時点灯)、に制御された飼育室で、金属製金網床ケージ (220w × 270d × 190h mm) に個別に収容して飼育し、飲料水 (水道水、秦野市水道局給水) を自由に摂取させた。固形飼料 (CE-2、日本クレア株式会社) は、投与前日の 16 時以降、投与後 3 時間までの絶食時間以

外は、自由に摂取させた。

飼育期間中、秦野研究所中央温湿度監視装置により測定した飼育室の温度は、21.5～24.0℃であり、相対湿度は、50.5～62.0%と許容範囲内の値であった。使用した飼料および水についても試験に支障をきたす可能性のある混入物はなかった。

3. 群分けおよび個体識別

雌雄とも、検疫終了時の体重をもとに体重層化無作為抽出法により群分けした。群分けした動物には一連の動物番号を割り当て、フェルトペンにより尾に動物番号を標識して個体を識別した。また、飼育ケージには、群ごとに色彩の異なるカードに試験計画番号、性別、群（投与量）および動物番号を記入して識別した。

4. 投与検体の調製

BEHA は水に不溶であることから、媒体にはコーン油（ロット番号：V2E7069、ナカライテスク株式会社）を選択した。投与検体は、純度補正を行わず、必要量の BEHA を秤量し、所定濃度となるように媒体に溶解して調製した。調製した検体は使用時まで室温で保存した。

投与検体の安定性については、投与に先立ち、0.4および50%(w/v)の調製検体について室温・遮光条件下における8日間の安定性を確認した（Table C）。また、投与前日に投与検体について、被験物質の含量測定を実施した結果、投与検体には所定濃度の BEHA が含有されていることを以下のガスクロマトグラフ（GC）法により確認した（Table D）。GC条件を以下に示す。

分析カラム：DB-1

（内径 0.53 mm、長さ 15 m、膜厚 1.5 μm、J&W Scientific）

昇温条件：100℃(1分間) → 30℃/分 → 280℃ → 5℃/分 → 320℃

キャリアーガス：ヘリウム、約 50 cm/sec

水素：60 kPa

空気：50 kPa

注入口温度：300℃

検出器温度：300℃

試料注入量：1 μL

5. 投与量、群構成および投与方法

本試験の投与量は、BEHA のラットを用いる急性経口投与毒性試験予備試験（試験計画番号:A-01-072 以下、予備試験と略記）の結果をもとに設定した。予備試験では、本試験における高用量での死亡状況を推察するとともに、死亡の認められない用量を求めることを目的として、1500、2000、および 2500 mg/kg を単回経口投与し、観察 8 日まで生死および一般状態を観察した、その結果、雌雄ともに、いずれの投与群においても観察終了日まで死亡する例はなく、2000 mg/kg 以下の投与群では一般状態にも変化は認められなかった。2500 mg/kg 投与群では、雌雄ともに投与後 6 時間以降、翌朝までに、粘液便あるいは軟便が観察されたが、観察第 3 日以降には認められなかった。

以上の結果から、本試験では、OECD 化学物質試験法ガイドラインに定める限度試験を実施することとし、2000 mg/kg の 1 群および媒体（コーン油）投与群を設けた。

各群の投与量、濃度、投与容量および動物番号は以下の通りである。

群	投与物質	投与量 (mg/kg)	濃度 (% (w/v))	投与容量 * (mL/kg)	動物番号	
					雄	雌
1	コーン油 (対照群)	0	0	5	1~5	11~15
2	BEHA	2000	40	5	6~10	16~20

* : 雌雄とも投与直前の体重をもとに個体別の投与液量 (mL) を算出した。

6. 観察方法

1) 一般状態

雌雄とも全例について投与日（観察第 1 日）から 14 日間にわたって死亡の有無を確認し、各動物の一般状態を観察した。観察は投与日においては投与直後から 1 時間まで連続して行い、その後は投与後 6 時間まで約 1 時間間隔で実施した。観察第 2 日から 15 日までは毎日 1 回観察した。

2) 体重測定

全例について、投与日の投与直前、観察第 2、4、8、11 および 15 日に測定した。

3) 病理学検査

観察第 15 日に全例を致死量のペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させて剖検

した。その際、脳、下垂体、眼球、甲状腺、心臓、気管、肺、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、消化管、生殖器、乳腺、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、大腿骨骨髓、膵臓、顎下腺、舌、食道、大動脈、ハーダー腺、皮膚の肉眼的観察を実施した。また、各群の動物番号の若い雌雄のそれぞれ1例ずつについて、主要器官・組織（脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、消化管）を0.1 M リン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定保存した。なお、BEHA 投与群に異常所見がみられなかったため、組織学検査は実施しなかった。

7. データの解析

体重について群ごとに平均値と標準偏差を雌雄別に求めた。さらに対照群と被験物質投与群の間でF-検定を行い、等分散の場合はStudentのt検定を用い、不等分散の場合はAspin-Welch検定を用い、対照群と被験物質投与群との平均値の差を検定した。いずれの検定においても有意水準は5%とした。

【結 果】

1. 死亡動物および一般状態 (Table 1)

雌雄ともに死亡動物はみられなかった。

投与後 1~6 時間の間に対照群の雄 4 例 (動物番号 : 1、2、4、5) および雌 2 例 (動物番号 : 12、15) に軟便が観察された。BEHA 投与群では雌雄ともに投与後の一般状態に変化は認められなかった。

2. 体重推移 (Fig. 1; Tables 2-1~3)

雌雄ともに体重推移に BEHA 投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

3. 病理学検査 (Table 3)

対照群の雄の一例 (動物番号 : 1) では、右側の腎臓に小嚢胞の散在が観察された。対照群のその他の例および BEHA 投与群の各例には異常所見は認められなかった。

【 考 察 】

2000 mg/kg の BEHA を投与しても死亡例はなく、瀕死状態に至る例も無かった。また、投与後の一般状態も、コーン油投与による軟便が対照群の動物に認められただけで、BEHA 投与による影響は認められなかった。病理学検査においても対照群の腎臓に小嚢胞が観察されたのみで、BEHA 投与群に異常は観察されなかった。従って、本試験条件下において 2000 mg/kg の BEHA の単回経口投与は、雌雄ラットに対して影響を及ぼさないと結論された。

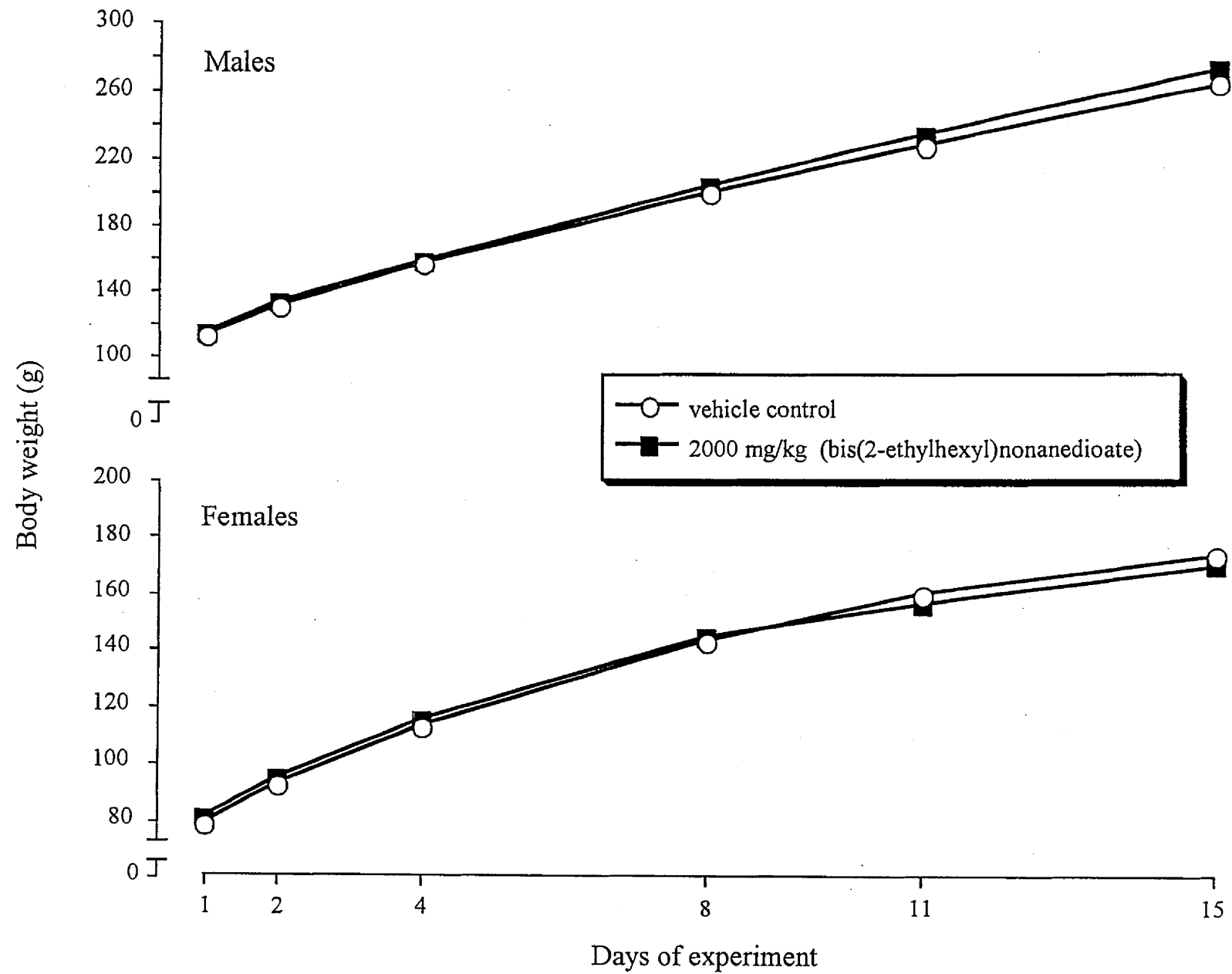


Fig.1 Body weight changes in animals

Table 1

Acute oral toxicity test of bis(2-ethylhexyl)nonanedioate in rats

Clinical findings of animals

Dose (mg/kg)	Animal No.	Sex	Clinical findings	Experimental days																			
				1						2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
				~1	~2	~3	~4	~5	~6 hrs														
0	1	Male	Soft feces	-	+	+	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2	Male	Soft feces	-	+	+	F	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3	Male	No abnormality in general condition				F																
	4	Male	Soft feces	+	+	+	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	5	Male	Soft feces	+	+	+	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2000	6	Male	No abnormality in general condition				F																
	7	Male	No abnormality in general condition				F																
	8	Male	No abnormality in general condition				F																
	9	Male	No abnormality in general condition				F																
	10	Male	No abnormality in general condition				F																
0	11	Female	No abnormality in general condition				F																
	12	Female	Soft feces	-	-	+	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	13	Female	No abnormality in general condition				F																
	14	Female	No abnormality in general condition				F																
	15	Female	Soft feces	+	+	+	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2000	16	Female	No abnormality in general condition				F																
	17	Female	No abnormality in general condition				F																
	18	Female	No abnormality in general condition				F																
	19	Female	No abnormality in general condition				F																
	20	Female	No abnormality in general condition				F																

Day 1, the day of administration

-, not observed
+, observed
F, feeding behavior

Table 2-1

Acute oral toxicity test of bis(2-ethylhexyl)nonanedioate in rats

Body weight changes of animals (g)

Sex	Dose (mg/kg)	Animal No.	Experimental days					
			1	2	4	8	11	15
Male	0	1	111.8	132.0	156.1	196.2	221.2	255.4
		2	110.4	128.7	154.6	201.2	230.9	271.7
		3	118.3	137.2	166.1	213.7	243.0	280.9
		4	109.2	127.4	151.5	186.9	213.3	246.6
		5	110.9	127.5	150.8	194.4	222.8	257.4
		Mean	112.1	130.6	155.8	198.5	226.2	262.4
		±S.D.	3.6	4.2	6.1	9.9	11.3	13.7
	2000	6	114.4	132.6	159.2	201.8	229.6	268.9
		7	113.2	129.8	157.4	206.1	237.3	274.6
		8	112.7	133.4	156.7	197.3	232.3	275.9
9		119.5	137.5	164.3	214.7	244.8	286.9	
10		109.8	126.7	148.3	194.2	219.0	250.6	
	Mean	113.9	132.0	157.2	202.8	232.6	271.4	
	±S.D.	3.5	4.0	5.8	8.0	9.6	13.3	
Female	0	11	91.7	105.8	125.2	152.3	168.9	182.7
		12	85.5	99.4	116.8	145.7	159.5	176.6
		13	97.4	113.3	136.7	172.4	199.5	215.4
		14	87.4	101.7	125.0	156.6	173.0	181.9
		15	86.7	99.8	117.6	143.2	154.1	168.9
		Mean	89.7	104.0	124.3	154.0	171.0	185.1
		±S.D.	4.9	5.8	8.0	11.6	17.6	17.8
	2000	16	94.5	110.2	126.4	157.3	169.4	186.5
		17	88.3	100.2	121.9	149.5	155.7	164.9
		18	86.6	102.5	120.8	145.3	155.1	161.9
19		96.7	109.0	130.4	158.1	170.3	189.6	
20		94.6	109.6	134.0	166.2	185.0	203.6	
	Mean	92.1	106.3	126.7	155.3	167.1	181.3	
	±S.D.	4.4	4.6	5.6	8.1	12.3	17.6	

Day 1, the day of administration

Table 2-2

Acute oral toxicity test of bis(2-ethylhexyl)nonanedioate in rats

Body weight gain of animals (g)

Sex	Dose (mg/kg)	Animal No.	Experimental days				
			1-2	2-4	4-8	8-11	11-15
Male	0	1	20.2	24.1	40.1	25.0	34.2
		2	18.3	25.9	46.6	29.7	40.8
		3	18.9	28.9	47.6	29.3	37.9
		4	18.2	24.1	35.4	26.4	33.3
		5	16.6	23.3	43.6	28.4	34.6
		Mean	18.4	25.3	42.7	27.8	36.2
		±S.D.	1.3	2.2	5.0	2.0	3.1
	2000	6	18.2	26.6	42.6	27.8	39.3
		7	16.6	27.6	48.7	31.2	37.3
		8	20.7	23.3	40.6	35.0	43.6
9		18.0	26.8	50.4	30.1	42.1	
10		16.9	21.6	45.9	24.8	31.6	
	Mean	18.1	25.2	45.6	29.8	38.8	
	±S.D.	1.6	2.6	4.1	3.8	4.7	
Female	0	11	14.1	19.4	27.1	16.6	13.8
		12	13.9	17.4	28.9	13.8	17.1
		13	15.9	23.4	35.7	27.1	15.9
		14	14.3	23.3	31.6	16.4	8.9
		15	13.1	17.8	25.6	10.9	14.8
		Mean	14.3	20.3	29.8	17.0	14.1
		±S.D.	1.0	2.9	4.0	6.1	3.2
	2000	16	15.7	16.2	30.9	12.1	17.1
		17	11.9	21.7	27.6	6.2	9.2
		18	15.9	18.3	24.5	9.8	6.8
19		12.3	21.4	27.7	12.2	19.3	
20		15.0	24.4	32.2	18.8	18.6	
	Mean	14.2	20.4	28.6	11.8	14.2	
	±S.D.	1.9	3.2	3.0	4.6	5.8	

Day 1, the day of administration

Table 2-3

Acute oral toxicity test of bis(2-ethylhexyl)nonanedioate in rats

Cumulative body weight gain of animals (g)

Sex	Dose (mg/kg)	Animal No.	Experimental days				
			1-2	1-4	1-8	1-11	1-15
Male	0	1	20.2	44.3	84.4	109.4	143.6
		2	18.3	44.2	90.8	120.5	161.3
		3	18.9	47.8	95.4	124.7	162.6
		4	18.2	42.3	77.7	104.1	137.4
		5	16.6	39.9	83.5	111.9	146.5
		Mean	18.4	43.7	86.4	114.1	150.3
		±S.D.	1.3	2.9	6.9	8.4	11.2
	2000	6	18.2	44.8	87.4	115.2	154.5
		7	16.6	44.2	92.9	124.1	161.4
		8	20.7	44.0	84.6	119.6	163.2
		9	18.0	44.8	95.2	125.3	167.4
		10	16.9	38.5	84.4	109.2	140.8
		Mean	18.1	43.3	88.9	118.7	157.5
		±S.D.	1.6	2.7	4.9	6.6	10.4
	Female	0	11	14.1	33.5	60.6	77.2
12			13.9	31.3	60.2	74.0	91.1
13			15.9	39.3	75.0	102.1	118.0
14			14.3	37.6	69.2	85.6	94.5
15			13.1	30.9	56.5	67.4	82.2
		Mean	14.3	34.5	64.3	81.3	95.4
		±S.D.	1.0	3.8	7.6	13.4	13.5
2000		16	15.7	31.9	62.8	74.9	92.0
		17	11.9	33.6	61.2	67.4	76.6
		18	15.9	34.2	58.7	68.5	75.3
	19	12.3	33.7	61.4	73.6	92.9	
	20	15.0	39.4	71.6	90.4	109.0	
	Mean	14.2	34.6	63.1	75.0	89.2	
	±S.D.	1.9	2.8	5.0	9.2	13.8	

Day 1, the day of administration

Table 3

Acute oral toxicity test of bis(2-ethylhexyl)nonanedioate in rats

Macroscopic findings

Dose (mg/kg)	Animal No.	Sex	Findings
0	1	Male	Kidney, cyst
	2	Male	No abnormality
	3	Male	No abnormality
	4	Male	No abnormality
	5	Male	No abnormality
2000	6	Male	No abnormality
	7	Male	No abnormality
	8	Male	No abnormality
	9	Male	No abnormality
	10	Male	No abnormality
0	11	Female	No abnormality
	12	Female	No abnormality
	13	Female	No abnormality
	14	Female	No abnormality
	15	Female	No abnormality
2000	16	Female	No abnormality
	17	Female	No abnormality
	18	Female	No abnormality
	19	Female	No abnormality
	20	Female	No abnormality