最終報告書

α，4-ジクロロトルエンのラットを用いる急性毒性試験

（試験番号：０４－２５０－１）

財団法人　畜産生物科学安全研究所

目次

要約……1
目的……2
材料および方法……2
結果……5
考察……6
文献……7

添付資料

群別平均表

Table 1　死亡率…… 8
Table 2　一般状態…… 9
Table 3　体重……10
Table 4　剖検……11

要　約

α，4-ジクロロトルエンの急性毒性を，SD系[Crl:CD(SD)]雌ラットを1群3匹として用い，固定用量を死亡状況を確認しながら段階的に単回経口投与する逐次法により検討した。

ステップ1として300mg/kgを投与した結果，死亡は認められなかった。ステップ2として，再度300mg/kgを投与したが，死亡は認められなかった。そこで，ステップ3では用量を上げて2000mg/kgを投与した結果，3匹中3匹の死亡が認められた。

300mg/kgでは，少数に下痢が認められたが，体重は順調な増加を示し，観察期間終了時の剖検で，被験物質投与に起因する変化は認められなかった。

2000mg/kgでは，自発運動の低下，眼瞼下垂および下痢が全例に，また1～2匹に投与直後の流涎，歩行異常，尿による下腹部の汚れおよび赤色分泌物による口鼻周囲の汚れが認められた。死亡は，投与後9時間以降から翌日に発現した。死亡動物の剖検において，1匹に肝臓の白色点散在が認められた。

以上の結果より，α，4-ジクロロトルエンのラット経口投与における概ねの致死量（LD_{50}値）は500mg/kgと推定され，化学物質危険度分類(GHS)ではカテゴリー4に分類された。

目　的

α，4-ジクロロトルエンについて，ラットの経口投与における急性毒性を明らかにする。

材料および方法

1．被験物質

α，4-ジクロロトルエン（CAS No. 104-83-6）は，無色～淡黄色固体で，刺激臭がある。試験には，
より提供された　　を密栓して冷暗所（2～6℃）に保管・使用した。本被験物質の詳細は，Appendix 1 に示す。試験に使用した被験物質は，投与終了後に分析し，試験期間中安定であったことを確認した（Appendix 2）。分析は，　　に委託して実施した。

2．供試動物および飼育条件

SD 系 [Crl:CD (SD)] の SPF 雌ラットを日本チャールス・リバー株式会社　厚木飼育センター（神奈川県厚木市下古沢 795）より搬入（9 週齢の 16 匹，出荷時の体重範囲は 190～240g）し，5 日間試験環境に馴化させ，その間に臨床観察および体重測定による検疫を行い，健康状態が良好であることを確認した。試験には，1 群の動物数を 3 匹とし，ステップ 4 まで実験ができるように，体重分布の平均値に近いものから 12 匹を選んで使用した。群分けは，ステップ 1 の投与前日の体重に基づく層化無作為抽出法により行い，12 匹を 4 群に振り分けた。動物の個体識別は，ラックおよびケージへの標識札の貼付とピクリン酸溶液でラットの被毛の一部を染色する方法で行った。群分け時の平均体重（体重の範囲）は，ステップ 1 で 229 (224～236) g，ステップ 2 で 229 (224～235) g，ステップ 3 で 228 (221～232) g，ステップ 4 で 230 (225～238) g，また前夜より絶食した投与時では，ステップ 1 で 206 (202～212) g，ステップ 2 で 212 (205～216) g およびステップ 3 で 220 (217～223) g であった。なお，ステップ 3 までの投与で概略の致死量が求められたので，ステップ 4 の投与は実施せず，そのままステップ 3 の観察期間終了時まで，飼育した。

動物は，馴化期間および投与後の観察期間とも，室温 22±3℃，湿度 55±10%，換気回数 10 回以上／時（オールフレッシュエアー方式），照明 12 時間／日（午前

7時点灯，午後7時消灯）に設定されたバリアーシステム動物室（第2室）で，ステンレス製金網ケージ（260W×380D×180Hmm）に，3匹ずつ収容して飼育した。飼料（固型飼料ラボMRストック，日本農産工業株式会社，Lot.No.051057）と飲料水（孔径1μmのカートリッジフィルターで濾過後紫外線照射した殺菌水道水）は，自由に摂取させた。給水には自動給水装置を用いた。

なお，動物の飼育期間中，動物室の温度は22.0～22.5℃，湿度は48～56%の範囲で推移（Appendix 3）し，また飼料および飲料水の汚染物質の分析値（Appendices 4&5）は，当研究所が定めた基準値以下であることが確認された。従って，動物の飼育期間を通じて，試験成績の信頼性に影響を及ぼすと思われる環境要因の変化はなかったものと判断された。

3．投与用量および投与方法

投与用量は，OECDの試験法ガイドライン423（急性毒性等級法）の別表（Appendix 9参照）に従って，5，50，300あるいは2000mg/kgの固定量とし，逐次法により各ステップごとに死亡状況を確認しながら，概略の致死量が推定できるまで，段階的投与を行った（ステップ1とステップ2は1日間隔，ステップ3はステップ2の6日後）。本物質の致死量に関する既存情報として，雄マウスへの経口投与における急性毒性試験では，LD_{50}値は790mg/kgとの報告[1]があり，ラットにおいてもLD_{50}値は300mg/kg以上である可能性が考えられたため，ステップ1の用量は300mg/kgとした。

投与方法は，テフロン製胃ゾンデを用い，動物の胃内に単回投与した。なお，動物は各ステップ毎に，投与前日の午後5時から投与後3時間まで除餌し，飲料水のみを自由に摂取させた。投与は，午前中（ステップ1で9:22～9:23，ステップ2で8:33～8:34，ステップ3では9:09～9:10）に実施した。

4．投与液の調製

本被験物質は水に難溶であるが，食物油に溶解することから，投与液はオリブ油（Lot.No. LA20，宮澤薬品工業株式会社）を溶媒とし，所定の濃度（300mg/kg群：3w/v%，2000mg/kg群：20w/v%）の溶解液に調製した。投与液の調製は投与直前に行った。投与液量は，体重1kg当たり10mLとし，各個体の投与液量は投与直前の体重より算

出した。

5．観察事項

観察期間は投与後 14 日間とし，一般状態の観察および生死の確認は，観察 1 日（投与日）においては，投与後 1 時間までは継続して，その後は概ね投与後 2，4 および 6 時間に観察した。6 時間の観察で一般状態が変化する傾向にあったので，投与後 9 時間まで観察した。観察 2 日は午前，午後の各 1 回，観察 3 日以降は午前中に 1 回行った。体重は，観察 1（投与直前），4，8 および 15 日に測定した。剖検は，死亡動物は発見後速やかに，生存動物は観察 15 日の観察終了後にエーテル麻酔により安楽死させ，内部器官を肉眼的に観察した。

6．致死量の推定および化学物質危険度分類

OECD の試験法ガイドライン 423（急性毒性等級法）の別表（Appendix 9 参照）に従って，各ステップでの死亡率から概略の致死量（LD_{50} 値）を推定し，化学物質危険度分類の万国共通分類法 [Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures (GHS)] に従って，毒性の最も強いカテゴリー1 から最も弱いカテゴリー5 のいずれかに分類した。

結　果

1．死亡率(Table 1)

ステップ 1 として 300mg/kg を投与したが，死亡は認められなかった。確認のため，ステップ 2 として再度 300mg/kg を投与したが，死亡は認められなかった。そこで，ステップ 3 として 2000mg/kg を投与した結果，3 匹中 3 匹の死亡が認められた。このことから，毒性の強さは，化学物質危険度分類(GHS)における 300～2000mg/kg の範囲を示すカテゴリー4 に分類され，概ねの致死量は 500mg/kg と推定された。

2．一般状態(Table 2, Appendix 6)

300mg/kg において，下痢が 1 匹で概ね 1 時間以内に，別の 1 匹で 2 時間および 4 時間の観察で認められた。

2000mg/kg においては，3 匹中 3 匹に投与 1 時間以内から自発運動の低下および眼瞼下垂および下痢が認められ，歩行異常（頭をさげ，這いずる）および流涎が 1 ないし 2 匹に認められた。流涎は 1 匹のみ投与直後にみられ，投与後 2 時間には消失した。自発運動の低下および眼瞼下垂の症状は投与後 6～9 時間の観察では，憎悪する傾向にあり，投与後 9 時間以降 24 時間以内に 2 匹が死亡した。別の 1 匹は自発運動の低下が継続し，尿による下腹部の汚れや赤色分泌物による口周囲の汚れを伴って観察 2 日に死亡した。

3．体重推移(Table 3, Appendix 7)

300mg/kg において，観察期間を通じて，順調な体重増加を示した。

4．剖検(Table 4, Appendix 8)

300mg/kg において，観察期間終了時の剖検では子宮腔液貯溜が 6 匹中 1 匹に認められた。

2000mg/kg においては，死亡した 3 匹中 1 匹に肝臓の白色点散在が認められた。

考　察

α，4-ジクロロトルエンを雌ラットに，ステップ 1 として 300mg/kg を単回経口投与したが死亡は認められず，ステップ 2 として再度 300mg/kg を投与したが，死亡は認められなかった。そこで，ステップ 3 として 2000mg/kg を投与したところ，3 匹中 3 匹が死亡した。

300mg/kg では，投与当日に下痢が認められたが，体重は順調な増加を示し，観察期間終了時の剖検において，被験物質投与に起因する変化は認められなかった。1 匹にみられた子宮腔液貯溜は性周期に関連し生理的に認められる変化で，被験物質投与に起因する病変ではないと考えられた。

2000mg/kg では，自発運動の低下，眼瞼下垂および下痢が 3 匹全例に認められ，さらに 1～2 匹に歩行異常，流涎，尿による下腹部の汚れおよび赤色分泌物による口周囲の汚れが認められ，投与後 9 時間以降から翌日に 3 匹全例が死亡した。死亡動物の剖検では，1 匹に肝臓の白色点散在が認められた。

類縁化合物である 2，6-ジクロロトルエンのラットへの反復投与により，肝臓に小葉中心性肝細胞肥大および曇りガラス様変性が認められている[2)]が，本被験物質でも肝臓に対する影響を有する可能性が示唆された。

以上の結果により，α，4-ジクロロトルエンのラット経口投与における概ねの致死量は 500mg/kg と推定され，化学物質危険度分類（GHS）ではカテゴリー4 に分類された。

文　献

1)　製品安全データシート，イハラケミカル工業株式会社社内資料，2003.

2)　長尾哲二，2，6-ジクロロトルエンのラットを用いる反復経口投与毒性，生殖発生毒性併合試験，化学物質毒性試験報告，9，265-279，2002

Table 1 Mortality of female rats treated with alpha, 4-dichlorotoluene in the single dose oral toxicity test

Step	Dose (mg/kg)	Number of animals treated	Number of animals that died													Mortality	Category (GHS)	LD_{50} (mg/kg)
			1						2	3	4	5	6	7	8～15(days)			
			～0.5	～1	～2	～4	～6	～24 (hrs)										
1	300	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$0^a/3^b$		
2	300	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3	4	500
3	2000	3	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	3/3		

a : Number of animals that died; b : Number of animals treated

Table 2 Clinical signs of female rats treated with alpha, 4-dichlorotoluene in the single dose oral toxicity test

Step	Dose (mg/kg)	Findings	Grade	1 ~0.5	1 ~1	1 ~2	1 ~4	1 ~6	1 6~(hrs)	2	3	4~15(days)
1	300	Number of animals examined		3	3	3	3	3	3	3	3	3
		Diarrhea	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
2	300	Number of animals examined		3	3	3	3	3	3	3	3	3
		Diarrhea	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
3	2000	Number of animals examined		3	3	3	3	3	3	1	0	0
		Decreased locomotor activity	1	0	2	2	0	3	2	1		
			2	0	0	0	0	0	1	0		
		Ptosis	1	0	0	2	1	3	3	0		
		Abnormal gait	1	0	0	2	0	0	0	0		
		Salivation	1	1	1	0	0	0	0	0		
		Diarreha	1	0	0	1	0	2	1	0		
		Soiled perineal region	1	0	0	0	0	0	1	0		
			2	0	0	0	0	0	0	1		
		Perioral smudge	1	0	0	0	0	0	0	1		

Grade, 1 : Slight; 2 : Moderate

Table 3 Body weights of female rats treated with alpha, 4-dichlorotoluene in the single dose oral toxicity test

Step	Dose (mg/kg)	Number of animals treated	Body weight (g)			
			1	4	8	15 (days)
1	300	3	206 ± 5 (3)	227 ± 5 (3)	235 ± 10 (3)	254 ± 7 (3)
2	300	3	212 ± 6 (3)	237 ± 6 (3)	248 ± 5 (3)	269 ± 6 (3)
3	2000	3	220 ± 3 (3)	(0)	(0)	(0)

Values represent mean body weight ± S.D. (number of animals examined)

Table 4 Incidence of necropsy findings of female rats treated with alpha, 4-dichlorotoluene in the single dose oral toxicity test

Step	Dose (mg/kg)	Findings	Grade	Fate	
				Terminal kill	Found dead
1	300	Number of animals examined		3	0
		Uterus : Hydrometra	1	1	
2	300	Number of animals examined		3	0
		No abnormalities detected		3	
3	2000	Number of animals examined		0	3
		Liver : White spots	1		1

Grade, 1 : Slight