食薬セ研第１０－１６１９号

２０００年　７月２５日

4-メトキシベンズアルデヒドのラットにおける急性経口投与毒性試験

厚生省生活衛生局　委託

財団法人食品薬品安全センター

秦　野　研　究　所

【目　　次】

要約 …… 1
緒言 …… 2
方法 …… 3
　1．被験物質 …… 3
　2．使用動物および飼育方法 …… 3
　3．投与検体の調製 …… 4
　4．投与量の設定および投与方法 …… 4
　5．観察および検査 …… 5
　6．データ解析法 …… 5
結果 …… 6
　1．死亡動物 …… 6
　2．一般状態 …… 6
　3．体重推移 …… 6
　4．病理学検査 …… 6
考察 …… 7
文献 …… 8

Tables 1～2

【要　　約】

4-メトキシベンズアルデヒド（以下 MBA と略記）の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD (SD) IGS, SPF] ラットにおける急性経口投与毒性試験を実施した。

1群5匹からなる5週齢の雄ラットに MBA 1000 および 2000 mg/kg を、5匹の5週齢雌ラットに MBA 2000 mg/kg をそれぞれ単回経口投与し、観察第1日（投与日）から14日間観察を行い、観察第15日に屠殺して剖検した。また、媒体対照群として、雄5匹にコーン油を 10 mL/kg 投与して、同様に観察した。

全被験物質投与群で被験物質投与によると考えられる一般状態の変化は観察されなかった。

雌雄の 2000 mg/kg 投与群で軽度な体重増加抑制が観察第2日にみられた。

観察第15日に実施した剖検所見においては、全例で異常は認められなかった。

これらのことより、本試験条件下における MBA の LD_{50} は、雌雄ともに 2000 mg/kg を上回ると推定された。

【緒　　言】

4-メトキシベンズアルデヒド（以下 MBA と略記）は、香料や化粧石鹸の原材料として使用されるほか化学合成原料にも用いられており[1]、ラットにおける単回経口投与時の LD_{50} は 1300 (1110～1540)mg/kg であることが報告されている[2]。今回、OECD 既存化学物質安全性点検等に係る毒性調査の一環として、MBA の安全性確認の資料を得るために、ラットにおけ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。

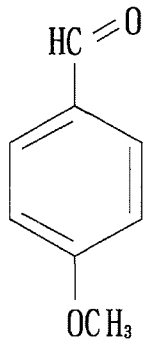
本試験は、OECD 化学物質試験法ガイドライン「[401] 急性経口毒性試験（1987年2月24日採択）」および「化学物質 GLP」（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和63年11月18日改正、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に準拠して実施した。

【方　　法】

1．被験物質

被験物質として、4-メトキシベンズアルデヒド（以下 MBA と略記）を用いた。本被験物質は、別名を *p*-アニスアルデヒドといい、英名は 4-Methoxybenzaldehyde であり、CAS No.123-11-5、分子量 136.15、分子式 $C_8H_8O_2$ 、融点（凝固点）0℃、沸点 248℃（0.1 MPa）、蒸気圧＜133.3 Pa（20℃）の無色透明の液体である。MBA の構造式を以下に示す。

構造式



本試験には、　　より提供された MBA（ロット番号：　　純度：99.9 wt%）を用いた。受領物質は、使用時まで被験物質保管室において、気密容器に入れて、室温で保管した。

2．使用動物および飼育方法

4 週齢の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD)IGS, SPF] 雌雄ラットを、日本チャールス・リバー株式会社筑波飼育センターから購入し、飼育環境への馴化と検疫を兼ねて 8 日間予備飼育した。予備飼育中、動物の一般状態には異常は認められなかった。試験には、雄15匹雌 5 匹を用い、雄は検疫終了時の測定体重を基に体重別層化無作為抽出法により 1 群 5 匹からなる 3 群に分け、雌は入荷番号の若い方から 5 匹を選んで 1 群とした。投与開始時の週齢は、雌雄ともに 5 週齢であった（注）。

（注）　動物入荷日：1999年 2 月10日
入荷時匹数：雄17匹、雌 6 匹
入荷時体重：雄 79.9～89.6 g、雌 78.9～86.4 g
投　与　日：1999年 2 月18日
投与時体重：雄 131.3～147.3 g、雌 115.2～124.5 g

全飼育期間を通じ、動物を金属製金網床ケージ（220w×270d×190hmm）に1匹ずつ収容し、基準温度24±1℃、基準湿度50～65%、換気回数約15回／時、照明12時間（7時～19時点灯）に制御された飼育室で、固型飼料（CE-2、日本クレア株式会社）および水道水（秦野市水道局給水）を自由に摂取させて飼育した。なお、飼育期間中、飼育室の温湿度の実測値は、それぞれ 23.5～25.0℃、55.0～67.5%で、湿度が基準値をわずかながらはずれる値を示したが、1時間以内の逸脱であり、それ以外は基準の範囲内にあった。また、供給した飼料および水に試験に支障を来す可能性のある混入物はなかった。

動物の個体識別は、各動物の尾に油性フェルトペンで雌雄に一連の番号を付した。また、各飼育ケージには個体識別の補助として試験計画番号、投与量、性および動物番号を記入した動物カードを掛けた。

3．投与検体の調製

投与検体の調製においては、各用量毎に被験物質を秤量し、所定濃度となるようにコーン油（英名：Corn oil、商品名：トウモロコシ油、ロット番号：V8P7069、ナカライテスク株式会社製造）を加えて溶解し、投与時まで室温で保存し、調製2日後に使用した。

本試験に先立ち、被験物質の 0.4 および 20w/v%の調製検体の、室温、遮光条件下での8日間の安定性を確認した（Appendix A）。また、各濃度の投与検体について、被験物質の含量を測定し、規定範囲内にあることを確認した（Appendix B）。なお、本投与検体は溶液であることから、均一性試験は実施しなかった。調製検体中の被験物質の濃度は、高速液体クロマトグラフ法により測定した（Appendix C）。

4．投与量の設定および投与方法

本試験における投与量は、投与量設定のための予備試験（試験計画番号：A-98-024）の結果に基づいて決定した。すなわち、予備試験において 2000 mg/kg を投与した雄で排便量の減少が、同群の雌雄で体重増加抑制あるいは減少が認められたことから、片性（雄）について、1000 および 2000 mg/kg の2用量を設定し、加えて媒体対照群としてコーン油を被験物質投与群と同容量投与する群を設けた。また、予備試験では明らかな性差は認められなかったことから、雌については、2000 mg/kg の1用量を設定した。

投与容量は体重1kg当たり10mLとし、動物を約18時間絶食させた後、投与直前に測定した体重を基に投与液量を算出し、ラット用胃管を用いて強制的に単回経口投与した。投与

は午前9時55分～10時13分の間に行い、給餌は投与後約3時間に行った。

各群の投与物質、投与量、濃度、投与容量および動物番号は次の通りである。

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
コーン油	0	0	10	1～5	
MBA	1000	10	10	6～10	
MBA	2000	20	10	11～15	16～20

5．観察および検査

観察第1日（投与日）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回行った。

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

剖検は、観察第15日に全例をペントバルビタール・ナトリウム麻酔下で放血屠殺して実施した。剖検時に、脳、下垂体、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、生殖器、顎下腺、甲状腺、副腎、大動脈、気管、食道、消化管、膀胱、眼球（ハーダー腺を含む）、皮膚、乳腺、頸部および腸間膜リンパ節、大腿骨骨髄および舌の肉眼観察を行った。これらのうち、2000 mg/kg 投与群の雄の1例（動物番号：11）について心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓および胃を 0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液で固定した。なお、観察第2日以降、一般状態に異常は観察されず、剖検によっても異常は認められなかったことから、組織学検査は実施しなかった。

6．データ解析法

体重の測定値について、平均値および標準偏差を求めた。なお、被験物質投与群に死亡例がなかったことから、LD_{50} は算出しなかった。

【結　　果】

1．死亡動物

雌雄ともに、死亡例はなかった。

2．一般状態（Table 1-1、1-2）

雄では、対照群の3例および 1000 mg/kg 投与群の2例で、投与日に粘液便の排泄がみられ、雌の 2000 mg/kg 投与群では、異常所見は認められなかった。

3．体重推移（Table 2）

雌雄の 2000 mg/kg 投与群で、観察第2日に軽度な体重増加抑制がみられたが、観察第8日以降は体重は増加した。なお、対照群を含む各試験群の各1例で観察第4日に体重減少がみられたが、その後回復した。

4．病理学検査

観察第15日に実施した剖検では、雌雄全例の器官・組織に異常は認められなかった。

【考　　察】

MBA 1000 および 2000 mg/kg を 5 週齢の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD)IGS, SPF]雄ラットに、また、MBA 2000 mg/kg を同週齢同系統の雌ラットに単回強制経口投与して単回投与時の MBA の毒性を検討した。

その結果、媒体として用いたコーン油によると考えられる粘液便の排泄が雄の対照群および 1000 mg/kg 投与群でみられたが、雌雄の 2000 mg/kg 投与群では異常所見は観察されなかった。

また、雌雄の 2000 mg/kg 投与群で軽度な体重増加抑制が観察第 2 日にみられた。なお、対照群を含む各試験群の各 1 例で観察第 4 日に体重減少がみられたが、その程度に差はみられなかったことから被験物質による変化ではないことは明らかであるが、その原因は不明である。

観察第15日に実施した剖検では、雌雄全例の器官・組織に異常は認められなかった。

これらのことより、本試験条件下における MBA の LD_{50} は、雌雄ともに 2000 mg/kg を上回ると推定された。

【文　　献】

1） The merck index. Twelefth edition. Merck & Co., Inc. (1996) pp. 699

2） Food and Cosmetics Toxicology. (London, UK). 2. (1964) pp. 327

Table 1-1 Clinical findings in male rats after single oral administration of MBA

Dose (mg/kg)	Animal No.	Clinical findings	Hours after administration						Days of observation								
			0～1	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6	7	8	9	10～15
0	1	Mucous feces	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	2	Mucous feces	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	3	No abnormality															
	4	No abnormality															
	5	Mucous feces	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
1000	6	Mucous feces	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	7	No abnormality															
	8	No abnormality															
	9	No abnormality															
	10	Mucous feces	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
2000	11	No abnormality															
	12	No abnormality															
	13	No abnormality															
	14	No abnormality															
	15	No abnormality															

+, positive; −, negative; The first day, the day of administration.

Table 1-2 Clinical findings in female rats after single oral administration of MBA

Dose (mg/kg)	Animal No.	Clinical findings	Hours after administration						Days of observation								
			0～1	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6	7	8	9	10～15
2000	16	No abnormality															
	17	No abnormality															
	18	No abnormality															
	19	No abnormality															
	20	No abnormality															

+, positive; −, negative; The first day, the day of administration.

Table 2 Body weight changes in male and female rats after single oral administration of MBA

Sex	Dose (mg/kg)	Animal No.	Days of observation					
			1 *	2	4	8	11	15
Male	0 (Corn oil)	1	137.6	162.3	159.1	218.7	248.7	284.4
		2	144.7	168.1	179.7	240.9	273.0	313.4
		3	136.1	149.8	167.5	204.9	227.6	259.8
		4	141.9	166.2	191.4	237.4	272.7	320.5
		5	139.2	162.6	191.4	236.3	267.5	300.1
		Mean	139.9	161.8	177.8	227.6	257.9	295.6
		S.D.	3.4	7.1	14.4	15.4	19.6	24.3
	1000	6	142.5	163.2	159.6	232.6	261.2	306.5
		7	131.3	150.9	163.1	212.6	238.1	278.0
		8	136.9	154.7	170.3	206.5	232.1	266.6
		9	141.8	160.5	183.1	236.3	271.0	307.6
		10	136.9	150.9	177.8	220.8	244.8	276.6
		Mean	137.9	156.0	170.8	221.8	249.4	287.1
		S.D.	4.5	5.6	9.8	12.7	16.2	18.8
	2000	11	140.7	149.1	146.4	207.7	238.8	278.0
		12	138.3	131.0	141.9	198.6	228.1	270.0
		13	147.3	145.3	177.3	222.2	252.3	290.0
		14	142.8	150.6	172.4	217.6	246.8	282.9
		15	137.0	140.6	168.7	211.9	243.1	281.6
		Mean	141.2	143.3	161.3	211.6	241.8	280.5
		S.D.	4.1	7.9	16.1	9.1	9.1	7.3
Female	2000	16	118.7	125.8	125.1	176.3	189.4	204.8
		17	119.6	120.3	130.2	170.6	188.3	195.6
		18	115.2	121.7	143.0	177.2	199.5	194.4
		19	117.9	114.4	135.5	167.7	176.1	187.8
		20	124.5	128.8	155.6	177.2	189.1	197.4
		Mean	119.2	122.2	137.9	173.8	188.5	196.0
		S.D.	3.4	5.5	11.9	4.4	8.3	6.1

*, the day of administration; unit, g