

最終報告書

2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンのラットを用いる 単回経口投与毒性試験

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室 委託

試験施設

一般財団法人食品薬品安全センター 秦

〒257-8523 神奈川県秦野市落合 729 番地

TEL 0463-82-4751



試験委託者 厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室
(東京都千代田区霞が関 1-2-2)

試験番号 A-09-026

被験物質 2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノン

試験項目 ラットを用いる単回経口投与毒性試験

試験開始日 2009年11月12日

実験開始日 2009年11月26日

実験終了日 2009年12月15日

試験終了日 試験責任者の捺印日

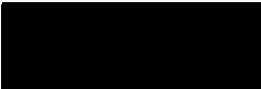
試験資料保管場所 秦野研究所資料保存室

保管期間 試験終了後10年間
その後の保管については試験委託者と協議する。

運営管理者 一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所
所長 

本試験は、OECD 化学物質試験法ガイドライン「[423] Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method」(1996年3月22日採択、2001年12月17日改訂)に準拠し、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成15年11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環企発第031121004号、最終改正:平成20年7月4日)を遵守して実施した。

2014年 5月 9日

試験責任者 

試験従事者

試験責任者



試験担当主任者



試験担当者

投与・観察

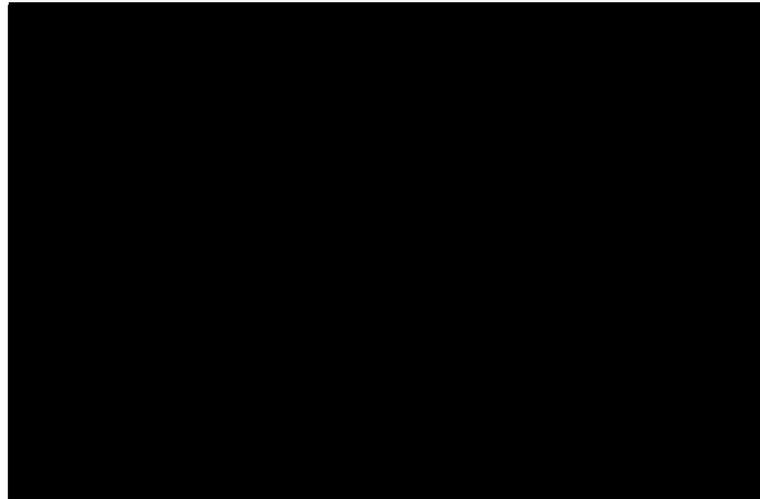
病理学的検査

動物飼育管理(検疫を含む)

被験物質管理

検体調製

化学分析



目次

要約.....	5
試験目的.....	5
試験ガイドラインと GLP.....	5
動物愛護.....	5
材料と方法.....	6
1. 被験物質.....	6
2. 使用動物と飼育方法.....	6
3. 投与検体の調製.....	7
4. 投与方法.....	8
5. 観察と検査.....	9
6. データの解析.....	9
予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと.....	9
試験成績と結論.....	9
1. 死亡および一般状態.....	9
2. 体重.....	9
3. 病理学検査.....	10
4. 結論.....	10
Tables.....	11
Annexes.....	14

(最終ページ:17 ページ)

信頼性保証書

要約

2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンの単回経口投与時の概略の致死量を知るために、単回経口投与毒性試験を OECD 化学物質試験法ガイドライン[423]に従って実施した。観察は投与日を観察第 1 日として観察第 15 日まで行った。被験物質を 2000 mg/kg の用量で合計 6 例の雌ラットに投与した結果、投与日から観察最終日まで一般状態に異常所見は観察されず、死亡動物も認められなかった。また、観察期間中の体重推移も順調であり、観察 15 日の剖検時にも、被験物質投与によると考えられる肉眼的な異常所見は認められなかった。

以上の結果 2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンの単回経口投与時の毒性は認められず、毒性分類は GHS (Globally Harmonized Classification System) でクラス 5 以下または分類該当せず、LD₅₀ 区切り値(LD₅₀cut-off 値)は∞と判断された。

試験目的

2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンの安全性評価の資料とする目的で、ラットを用いた単回経口投与毒性試験を実施した。

試験ガイドラインと GLP

この試験は、OECD 化学物質試験法ガイドライン「[423] Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method」(1996 年 3 月 22 日採択、2001 年 12 月 17 日改訂)に準拠し、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成 15 年 11 月 21 日、薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環境企発第 031121004 号、最終改正:平成 20 年 7 月 4 日)を遵守して実施した。

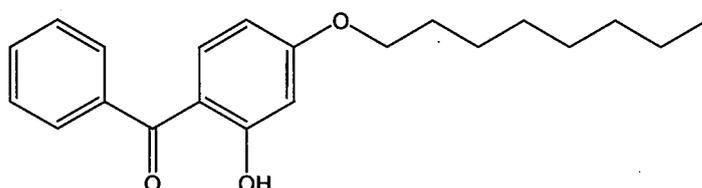
動物愛護

全ての実験操作は、「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和 48 年 10 月 1 日 法律第 105 号、平成 18 年 6 月 2 日一部改正)、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年 4 月 28 日、環境省告示第 88 号)および「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成 18 年 6 月 1 日、科発第 0601001 号)を遵守し、「財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所動物実験に関する指針」(平成 2 年 10 月 1 日、平成 18 年 10 月 2 日改正)に基づいて実施した(動物実験承認番号:1090280A)。なお、承認された動物実験計画からの変更はなかった。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質である 2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノン(略称:HOBP、CAS No.:1843-05-6、分子式: $C_{21}H_{26}O_3$ 、分子量:326.43、純度:100%、外観:薄い黄色結晶性粉末、融点:49.5°C、ロット番号:CAQ0588、Annex A)は和光純薬工業より購入し(被験物質入手:2009年9月29日)、使用時まで冷蔵・遮光下にて(実測値 4~7°C)保管した。2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンの構造式を以下に示す。



被験物質の安定性については、本試験の投与開始前(2009年11月13日)および投与終了後(2009年12月21日)に臭化カリウム錠剤を作製後、フーリエ変換赤外分光高度計(FTIR-8300、島津製作所)を用いて、4000~400 cm^{-1} の範囲で赤外吸収スペクトルを測定し、スペクトルに変化がないことを確認した(Annex B)。

2. 使用動物と飼育方法

7週齢の Sprague-Dawley 系 [CrI:CD(SD)、SPF] 雌ラット(日本チャールス・リバー、厚木飼育センター) 18匹を購入し、7号室に搬入した。入荷日も含め8日間、検疫と飼育環境への馴化を兼ね飼育し、その間、毎日1回、動物の一般状態を観察し、入荷日および検疫終了時に体重を測定した。検疫期間中は動物の尾に油性フェルトペンで馴化番号を記し、飼育ケージに試験番号および馴化番号を記入した動物カードを掛けて識別した。入荷日および検疫終了日(群分け日)の動物の体重は下記の通りであった。

動物入荷日	2009年11月18日	157.7~177.1 g
検疫終了日	2009年11月25日	197.1~226.2 g

検疫・馴化期間中の一般状態に異常は認められなかったため、検疫終了時体重の上位1匹および下位の2匹を除外して、体重別層化無作為抽出法により各群3匹からなる5群に群分けした。群分けした動物には一連の動物番号を割り当て、フェルトペンで尾に動物番号を標識した。また、動物カードに試験番号、動物番号、投与量および投与年月日を記入し、飼育ケージに掛けた。

なお、試験に使用しなかった動物および投与を行わなかった動物(計12匹)は、同じ飼育室で飼育し動物飼育終了時にペントバルビタールナトリウムによる深麻酔後に放血して、安楽死させた。

動物は、全飼育期間を通じて、許容範囲:21.0~25.0°C、許容湿度:40.0~75.0%、換気回数:約15回/時間、明暗サイクル:12時間(7時~19時)点灯、12時間(19時~7時)消灯に設定された飼育室内で、金属製金網床ケージ(220^W × 270^D × 190^H mm)に1匹ずつ収容し、固型飼料(CE-2、日本クレア)と水

道水(秦野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した。但し、投与前日の16時以降、および投与後約3時間までは絶食した。試験期間中、飼育環境に異常は認められず、動物室の温度の実測値は21.5～24.0℃、湿度の実測値は44.5～63.5%であった。また、供給した飼料および飲料水の分析結果は、いずれも標準操作手順書に記載の許容範囲内であることを確認した。

3. 投与検体の調製

1) 調製

被験物質を秤量し、媒体である0.1% Tween80 添加0.5% カルボキシメチルセルロース・ナトリウム水溶液[CMC Na、丸石製薬(日局カルメロースナトリウム、製造番号:7213)に日局注射用水(光製薬、製造番号:A89AA1)を加えた後、Tween80(SIGMA-ALDRICH、製造番号:125K01921)を添加]を加えて懸濁させ、20.0 w/v% 液を調製した。さらに、20.0 w/v% 液を媒体で希釈して3.00 w/v%液を調製した。調製した20.0 w/v% 液の検体は冷蔵・遮光下で保管し(実測値2～6℃)、調製後7日以内に使用した。一方、調製した3.00 w/v% 液は、同様に冷蔵・遮光下で保管していたが投与に使用しなかったため、廃棄した。

2) 安定性試験

投与に先立ち、秦野研究所で濃度0.0500 w/v% (0.500 mg/mL)および20.0 w/v% (200 mg/mL)の調製検体の冷蔵・遮光下(実測値2～4℃)での調製後3および8日間の安定性試験を実施した(開始日:2009年11月16日、3日目:2009年11月19日、8日目:2009年11月24日)。調製直後および各保管期間経過後の平均含量がそれぞれの調製濃度の91.6～101%、また、各測定値のばらつきがそれぞれ平均値の98.6～101%、かつ、調製直後の測定平均値に対する各保管期間後の測定値比の平均が95.5～104%であった(Annex C)。これらの値は、試験計画書に記載した判定基準の範囲内(調製直後および各保管期間経過後の平均含量:それぞれの調製濃度の85.0～115%、各測定値のばらつき:それぞれ平均値の90.0～110%、調製直後の測定平均値に対する各保管期間後の測定値比の平均:90.0%以上)であった。

3) 含量および均一性試験

初回調製時(2009年11月24日)に、投与検体の3.00 w/v% (30.0 mg/mL)および20.0 w/v% (200 mg/mL)の濃度における含量および均一性を測定した。試料溶液は、各調製検体につきn=3で調製した。その結果、平均含量がそれぞれ調製濃度の101および99.1%であり、均一性も各測定値が平均値の97.3～102%であった(Annex D)。これらの値は、試験計画書に記載した判定基準の範囲内(平均含量:調製濃度の85.0～115%、各測定値のばらつき:平均値の90.0～110%)であった。

調製検体中の被験物質濃度は以下の方法で測定した。

調製検体の0.5または1 mLを採取し、メタノールで希釈して試料溶液を調製した。別に、被験物質約10 mgを精密に量り、メタノールに溶解して正確に50 mLとし、さらにこの溶液1 mLを採り、メタノールを加えて正確に20 mLとして、標準原液とした。この標準原液をそれぞれ1、2および4 mLずつ採り、メタノールを加えて正確に20、10および10 mLとし、標準溶液を調製した。試料溶液および標準溶液を、以

下に示す高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法により測定し、標準溶液から作成した検量線を用いて調製検体中の 2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノン濃度を算出した。各試料溶液は n=1 で測定し、標準溶液については n=3 で測定した。

HPLC 条件

分析カラム	YMC-Pack C4 (内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm、(株)ワイエムシイ)
移動相	アセトニトリル/水混液(4:1 v/v)
流量	1.0 mL/min
カラム設定温度	40℃
試料設定温度	室温
測定波長	290 nm
試料注入量	10 μL
オートインジェクタ洗浄液	アセトニトリル/水混液(4:1 v/v)

4. 投与方法

投与経路は OECD 化学物質試験法ガイドライン[423]に抛り、ラット用胃管による強制経口投与とした。

本試験の投与量は、既報の 2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験 (http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/home/paper/paper1843-05-6b.html) の結果をもとに設定した。すなわち、2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験において、純度 99% 以上の被験物質を 0.1% Tween80 添加 0.5% カルボキシメチルセルロース・ナトリウムに溶解させ、20、140 および 1000 mg/kg の割合で SD 系ラット雌雄各 5 匹に 28 日間反復経口投与した結果、1000 mg/kg 投与群では、一般状態、体重および摂餌量に変化はみられず、血液学検査、血液生化学検査および病理学検査においても被験物質投与に起因した毒性変化は認められなかった。以上のことから、本被験物質を単回投与した時、死に至るには、高濃度の投与量が必要であると推定した。そこで、OECD 化学物質試験法ガイドライン[423](急性経口毒性試験—急性毒性クラス法)に従い、2000 mg/kg を投与開始時の投与量に選択した。

動物は投与前日の 16 時から絶食させた。投与直前に測定した体重を基に個体別に投与液量を算出し、2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンをラット用胃管を用いて強制経口投与した。投与は第 1 段階(動物番号 F01001~F01003)を 2009 年 11 月 26 日、9 時 26 分~9 時 28 分の間に 2000 mg/kg の用量で行った。第 1 段階で死亡動物が認められなかったことより、ガイドラインに従い、第 2 段階(動物番号 F02004~F02006)は 2000 mg/kg の用量で 12 月 1 日、9 時 39 分~9 時 41 分の間に投与した。いずれの投与段階も給餌は投与後約 3 時間後から行った。各投与段階における投与量と投与容量は以下の通りである。なお、第 2 段階の投与においても、動物の死亡は認められなかったことから、第 3 段階以降の投与は行わなかった。

投与段階	投与物質	投与量 (mg/kg)	濃度 (%w/v)	投与容量 (mL/kg)	動物番号
1	HOBP	2000	20	10	F01001～F01003
2	HOBP	2000	20	10	F02004～F02006

なお、各投与日の体重範囲は、使用した動物の平均体重の 80～120% 以内であった。

投与日(第1段階) 2009年11月26日 185.7～194.5 g

投与日(第2段階) 2009年12月1日 193.9～219.0 g

5. 観察と検査

投与日を観察第1日として第15日まで毎日、動物の一般状態の観察をした。投与日(観察第1日)の一般状態の観察は投与前に一度、投与後は1時間にわたり継続的に、その後は約1時間毎に投与後6時間まで全例について行った。観察第2日以降は毎日1回の頻度で観察した。体重は、投与直前、観察第2、5、8、11および15日に測定した。観察第15日にはペントバルビタール麻酔下でいずれの動物も放血致死させて剖検し、器官・組織の肉眼的観察を実施した。また、各投与段階の動物番号の最も若い1例(動物番号 F01001 および F02004)の主要器官・組織(脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、消化管(胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸および直腸))を0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定保存した。これらの動物については、剖検時に異常が認められなかったため、組織学検査は実施しなかった。

6. データの解析

体重について、平均値および標準偏差を算出した。

予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

今回の試験において、予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったことはなかった。

試験成績と結論

1. 死亡および一般状態(Table 1)

14日間の観察期間中に死亡例は認められなかった。

一般状態の観察では、投与日から最終観察日(観察第15日)まで異常所見は認められなかった。

2. 体重(Table 2)

投与日から観察終了日まで全例で順調な体重増加を示した。

3. 病理学検査 (Table 3)

被験物質の影響と考えられる異常所見は認められなかった。

4. 結論

2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンの 2000 mg/kg の投与では、一般状態、体重推移および病理検査において、被験物質投与によると考えられる異常は認められなかった。以上の結果から、2000 mg/kg の単回経口投与による 2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンの毒性は認められず、GHS (Globally Harmonised Classification System) の毒性分類はクラス 5 以下または分類該当せず、LD₅₀ 区切り値 (LD₅₀ cut-off 値) は ∞ と判断された。

Table 1
 Single dose toxicity study of 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone by oral administration in rats
 Clinical observation of females

Dose (mg/kg)	Step	Animal Number	Hours after administration							Days of observation													
			1	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
2000	Step 1	F01001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		F01002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		F01003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Step 2	F02004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		F02005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		F02006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
No. of animals observed abnormal signs			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 2
 Single dose toxicity study of 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone by oral administration in rats
 Body weight changes (g) of females

Dose (mg/kg)	Step	Animal Number	Days of observation					
			1	2	5	8	11	15
2000	Step1	F01001	185.7	209.1	222.8	225.1	232.6	239.2
		F01002	194.5	221.4	242.2	253.4	256.9	275.2
		F01003	192.2	212.3	227.1	238.5	249.7	257.1
	Step2	F02004	219.0	251.2	251.5	270.4	278.1	281.6
		F02005	193.9	218.2	230.2	236.3	246.3	249.9
		F02006	207.6	233.8	245.6	256.3	260.8	271.8
	Mean	198.8	224.3	236.6	246.7	254.1	262.5	
	±S.D.	12.2	15.7	11.5	16.4	15.3	16.4	
	N	6	6	6	6	6	6	

Table 3
 Single dose toxicity study of 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone by oral administration in rats of females
 Macroscopic findings of female

Step 1 (2000 mg/kg)	
Female No.	Findings
F01001	All organs No abnormality
F01002	All organs No abnormality
F01003	All organs No abnormality

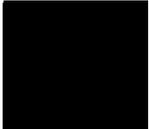
Step 2 (2000 mg/kg)	
Female No.	Findings
F02004	All organs No abnormality
F02005	All organs No abnormality
F02006	All organs No abnormality

検査成績書

2009年10月15日
和光純薬工業株式会社

御中

Code No. 081-06915
2-ヒドロキシ-4- (オクチルオキシ) ベンゾフェノン



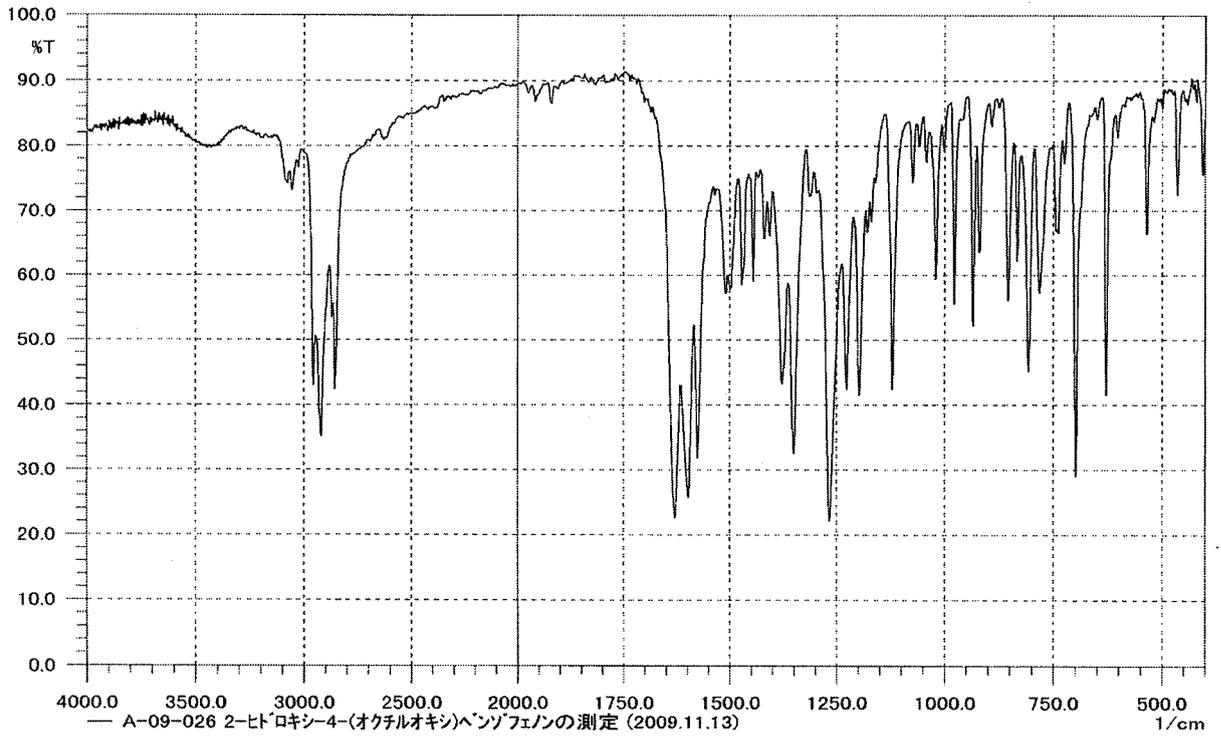
規格/等級	和光特級	
Lot No.	CAQ0588	
数量	500g	
検査項目	検査成績	規格値
外観	うすい黄色結晶性粉末	わずかにうすい黄色～黄色、結晶～結晶性粉末
エタノール溶状	澄明	試験適合(ほとんど澄明以内)
融点	49.5℃	(実測値報告)
水分	0.03%	(実測値報告)
含量(毛管カラムGC)	100.0%	99.0%以上
検査年月日	2009/10/14	

判定	合格	検査責任者	
----	----	-------	--

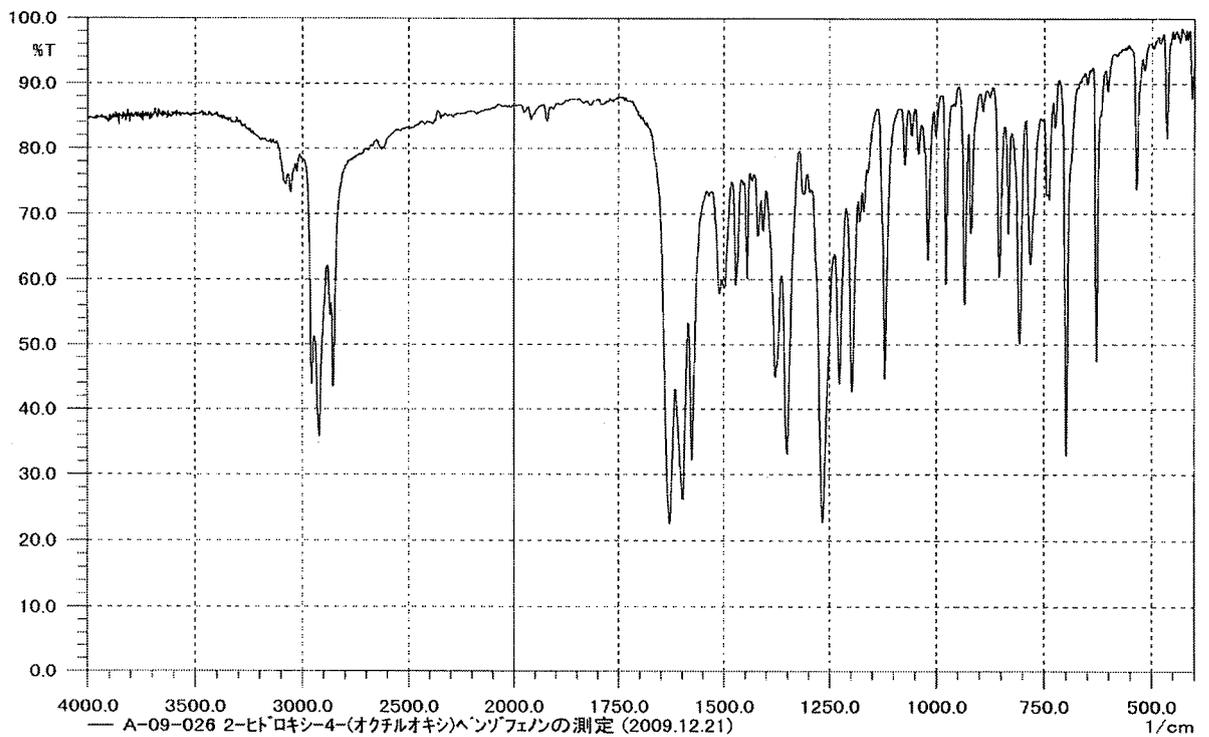
成績書発行番号 3000042087

Annex B

投与開始前



投与終了後



Annex C

Stability of the test article in the prepared sample

Test article : 2-Hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone
 Lot No. : CAQ0588
 Carrier : 0.5%CMCNa solution added 0.1%Tween80

Date of preparation : Nov. 16, 2009
 Date of determination A : Nov. 16, 2009 (0 Day)
 B : Nov. 19, 2009 (3 Days)
 C : Nov. 24, 2009 (8 Days)

Condition for storage : Cooling , shading

Indicated (mg/mL)	A			B			C						
	Sample No.	Found-1 (mg/mL)	Content ^{a)} (%)	Variance ^{b)} (%)	Sample No.	Found-2 (mg/mL)	Content ^{a)} (%)	Variance ^{b)} (%)	Sample No.	Found-2 (mg/mL)	Content ^{a)} (%)	Variance ^{b)} (%)	
0.500	1	0.4858	97.2	99.9	7	0.4674	93.5	101	13	0.4799	96.0	98.7	100
	2	0.4831	96.6	99.3	8	0.4684	93.7	101	14	0.4804	96.1	98.8	100
	3	0.4900	98.0	101	9	0.4581	91.6	98.6	15	0.4802	96.0	98.7	100
	mean	0.4863	97.3		mean	0.4646	92.9	95.5	mean	0.4801	96.0	98.7	
200	4	193.7	96.9	99.8	10	201.0	101	104	16	200.5	100	103	99.7
	5	193.3	96.7	99.6	11	198.4	99.2	99.2	17	200.9	100	104	99.9
	6	195.2	97.6	101	12	200.6	100	103	18	202.0	101	104	100
	mean	194.0	97.1		mean	200.0	100	103	mean	201.1	100	104	

a): Found / Indicated × 100

b): Found / Found mean × 100

c): Found / Found-1 mean × 100

Investigator _____
 Director, Chemical Analysis _____

Annex D

Content and Uniformity of the test article in the prepared sample

Test article : 2-Hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone

Date of preparation : Nov. 24, 2009

Lot No. : CAQ0588

Date of determination : Nov. 24, 2009

Carrier : 0.5%CMCNa solution added 0.1%Tween80

Sample No.	Indicated (A) (mg/mL)	Found (B) (mg/mL)	Mean (C) (mg/mL)	Content B/A×100 (%)	Mean (%)	Variance B/C×100 (%)
19	30.0	30.72	30.34	102	101	101
20		29.53		98.4		97.3
21		30.77		103		101
22	200	202.3	198.1	101	99.1	102
23		193.7		96.9		97.8
24		198.5		99.3		100

Investigator

Director, Chemical Analysis

信頼性保証書

表題 2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンのラットを用いる単回経口投与毒性試験

試験番号 A-09-026

この試験に関する信頼性保証部門による査察および監査状況等は下記のとおりであった。

査察・監査項目	査察・監査年月日	運営管理者および試験責任者への報告年月日
試験計画書	2009年11月12日	2009年11月12日
試験計画書変更書		
A-09-026-No.1	2009年11月13日	2009年11月13日
A-09-026-No.2	2009年11月20日	2009年11月20日
A-09-026-No.3	2009年11月24日	2009年11月24日
A-09-026-No.4	2010年1月12日	2010年1月12日
被験物質の安定性(投与開始前)	2009年11月13日	2009年11月13日
動物の受入れおよび検疫	2009年11月18日	2009年11月18日
検体調製および含量・均一性試験	2009年11月24日	2009年11月24日
投与および一般状態の観察	2009年11月26日	2009年11月26日
病理学検査(剖検)	2009年12月10日	2009年12月10日
報告書草案および生データ	2010年4月7、8日	2010年4月8日
最終報告書	2014年5月9日	2014年5月9日

試験は、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成15年11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環企発第031121004号、最終改正:平成20年7月4日)を遵守して実施され、また、この報告書は試験に使用された方法および手順を正確に記載し、記載された結果は試験の生データを正確に反映していることを保証する。

2014年5月9日

一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所
信頼性保証部門責任者

