トリ-p-クメニルフォスフェート（CAS No.26967760）のラットにおける
単 回 経 口 投 与 毒 性 試 験

最 終 報 告 書

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

NBR－1

目　　次

頁

要　約 …… 1

緒　言 …… 2

試験材料および試験方法

1．被験物質および媒体 …… 2

2．投与検体 …… 2

3．使用動物および飼育条件 …… 3

4．投与経路、投与方法、群構成および投与量 …… 4

5．観察および検査項目 …… 4

6．統計学的方法 …… 5

試験成績および考察

1．一般状態および死亡状況 …… 6

2．体重推移 …… 6

3．剖検所見 …… 6

資　料 …… 7

Table (1～5) …… 9

Fig. (1～2) …… 14

Table、Fig.およびAppendixの目次

頁

Table 1 General sign of male rats in single dose toxicity study of Tri-p-cumenylphosphate by oral administration ····· 9
Table 2 General sign of female rats in single dose toxicity study of Tri-p-cumenylphosphate by oral administration ····· 10
Table 3 Mortality and LD_{50} value of rats in single dose toxicity study of Tri-p-cumenylphosphate by oral administration ····· 11
Table 4 Body weight of male rats in single dose toxicity study of Tri-p-cumenylphosphate by oral administration ····· 12
Table 5 Body weight of female rats in single dose toxicity study of Tri-p-cumenylphosphate by oral administration ····· 13

Fig.1 Body weight of male rats in single dose toxicity study of Tri-p-cumenylphosphate by oral administration ····· 14
Fig.2 Body weight of female rats in single dose toxicity study of Tri-p-cumenylphosphate by oral administration ····· 15

要　　約

トリ-p-クメニルフォスフェート（CAS No.26967760）を雌雄ラットに１回経口投与し、その毒性について検討した。投与量は、ガイドラインで限界用量とされている2000mg/kgを高用量とし、以下1000および500mg/kgとした。なお、対照として媒体（コーンオイル）投与群を設けた。

１．一般状態、死亡状況およびLD_{50}値

投与後14日間の観察期間中に、死亡発現はなかった。また、一般状態では500mg/kg以上の群の雄および1000mg/kg以上の群の雌で投与後２～６時間に下痢がみられた。

LD_{50}値は、雌雄とも2000mg/kg以上であった。

２．体重推移

1000および2000mg/kg群では、雌雄とも投与後１日には対照群に比して有意な増加抑制が認められたが、剖検日の体重は雌雄の各投与群とも対照群との有意差は認められなかった。

３．剖検所見

著変は認められなかった。

トリ-p-クメニルフォスフェートのLD_{50}値は雌雄ラットともに2000mg/kg以上であり、1000mg/kg以上の投与により投与後１日には体重増加抑制が認められるが、その後の回復は良好であることが知られた。

緒　　言

トリ-p-クメニルフォスフェート（CAS No.26967760）が人に摂取された場合の健康への影響を推定するために、OECD毒性試験ガイドライン[1]に従ってトリ-p-クメニルフォスフェートを雌雄ラットに１回経口投与し、その毒性について検討した。

試験材料および試験方法

１．被験物質および媒体

被験物質であるトリ-p-クメニルフォスフェート（CAS No.26967760）は、分子量452、融点27～28℃、沸点255℃/1mmHgで、水にきわめて溶けにくい黄色液体である。当試験には、平成４年９月18日に　　から提供されたものを用いた［製造元：　　Lot No.　　規格値：純度99%、測定値：99.9%（測定日：平成４年９月10日）］。入手後は少量ずつ分割し、遮光・気密条件下で試験施設の被験物質保管室の保管庫に室温下で保管した。なお、投与終了後（平成５年３月12日）に製造元に保管されていた被験物質を分析した結果、純度は99.7%であり、当試験施設での保管期間中は安定であったと思われた。

媒体として、コーンオイルを用いた。コーンオイル（片山化学工業株式会社、Lot No. 8250）は平成４年８月21日に購入し、入手後は試験施設の被験物質保管室の保管庫に室温下で保管した。

２．投与検体

被験物質を秤取し、コーンオイルに溶解して必要濃度の投与検体を用時調製した。なお、被験物質は純度換算しないで、原体重量で表示した。また、投与後の残余検体は廃棄した。

投与日に調製した各投与検体液の一部を財団法人日本食品分析センターに送付し、被験物質濃度を測定した。その結果、被験物質濃度は表示濃度の97.0～98.5%を示し、濃度に問題はないと考えられた（Attached table 1）。

３．使用動物および飼育条件

(1) 動物種、系統

試験には、毒性試験に一般的に用いられている動物種で、その系統維持が明らかであり、集積データも揃っているSprague-Dawley系雌雄ラット［Crj:CD(SD)］を用いた。動物は、平成４年10月28日に日本チャールス・リバー株式会社から雌雄とも４週齢で各31匹を購入した。入手後２日の体重範囲は、雄が78～90g、雌が72～85gであった。

(2) 検疫および馴化、群分け法ならびに個体識別法

入手した動物は、５日間の検疫期間およびその後３日間の馴化期間を設けた。この間に、３回の体重測定および毎日一般状態の観察を行って検疫・馴化とし、一般状態および体重推移に異常の認められない動物を群分けして試験に用いた。

群分けは、コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に、無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように投与日に行った。群分け後の残余動物は、投与日にエーテルで麻酔致死させた後に廃棄処分した。

動物は、検疫・馴化期間中は入手日に油性インクおよび色素による染毛法により、群分け後は色素による染毛法および耳パンチ法を併用して識別した。さらに、検疫・馴化期間中の各ケージには試験番号、入手年月日、性別および馴化動物番号を記入したラベルを、群分け後の各ケージには試験番号、被験物質名、投与量、性別および動物番号を記入し、群ごとに色分けしたラベルを取り付けた。

(3) 環境条件および飼育管理

動物は、室温20～24℃、湿度40～70%、明暗各12時間（照明：午前６時～午後６時）、換気回数12回／時（フィルターにより除菌した新鮮空気）に設定した飼育室（Ｃ棟７号室：ただし、検疫期間中はＣ棟８号室で飼育し、検疫期間終了後にＣ棟７号室に移動した。）で飼育した。

検疫・馴化期間中および絶食期間中はステンレス製懸垂式ケージ（W:240xD:380xH:200mm）を用いて１ケージあたり５匹までの群飼育とし、群分け後はステンレス製五連ケージ（W:755xD:210xH:170mm）を用いて個別飼育した。ケージの受けⅢおよび給水瓶の交換は１週間に２回以上行った。なお、動物飼育室の清掃（床の掃き掃除）および500倍希釈次亜塩素酸ナトリウム水溶液での床のモップ拭きによる消毒は毎日行った。

(4) 飼料および飲料水

飼料は、入手後３カ月以内の固型飼料（CRF-1、オリエンタル酵母工業株式会社）を給餌器に入れ、自由に摂取させた。ただし、投与前日の夕刻（午後３時12分）から投与までの約19時間と、投与後約６時間まで絶食させ、その後に飼料を与えた。使用した飼料の分析結果は、財団法人日本食品分析センターおよびオリエンタル酵母工業株式会社から入手した。

飲料水は、水道水を給水瓶を用いて自由に摂取させた。ただし、群分け時から投与後約6時間までは絶水させ、その後に飲料水を与えた。飲料水の水質検査結果は、ほぼ3カ月ごとに財団法人岐阜県公衆衛生検査センターで実施した成績を入手した。

飼料および飲料水の検査の結果、いずれも検査結果は試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

4．投与経路、投与方法、群構成および投与量

(1) 投与経路および投与方法

トリ-p-クメニルフォスフェートは、経口的に人に摂取される可能性が考えられたため、投与経路として経口投与を選択した。

投与に際しては、金属製経口胃ゾンデを取り付けたプラスチック製ディスポーザブル注射筒を用いて、強制経口投与した。投与液量は、投与直前に測定した体重を基準として10 ml/kgで算出した。投与時刻は午前10時5分～10時24分の間で、投与回数は1回とした。

投与時の体重範囲は、雄が114～121g、雌が98～105gであった。

(2) 群構成および投与量

群構成は、以下の如くとした。

群	試験群	投与量 （濃度）	雄（動物番号）	雌（動物番号）
第1群	対照(ｺｰﾝｵｲﾙ)	0mg/kg（ 0%）	5（001～005）	5（051～055）
第2群	ﾄﾘ-p-ｸﾒﾆﾙﾌｫｽﾌｪｰﾄ	500mg/kg（ 5%）	5（101～105）	5（151～155）
第3群	ﾄﾘ-p-ｸﾒﾆﾙﾌｫｽﾌｪｰﾄ	1000mg/kg（10%）	5（201～205）	5（251～255）
第4群	ﾄﾘ-p-ｸﾒﾆﾙﾌｫｽﾌｪｰﾄ	2000mg/kg（20%）	5（301～305）	5（351～355）

投与量は、雄ラットを用いた予備試験（投与段階：0、2、20、200、2000mg/kg）の結果を参考として決定した。すなわち、最高用量の2000mg/kgでも死亡発現はなく、一般状態では20mg/kg以上の群で下痢が認められた以外には異常症状は観察されなかった。体重推移に異常はみられず、また剖検でも著変はみられなかった[2)]。

そこで、当試験の投与量はガイドラインで限界用量とされている2000mg/kgを高用量とし、以下公比2により1000および500mg/kgを設定した。なお、対照として、同一容量の媒体（コーンオイル）投与群を設けた。

5．観察および検査項目

(1) 観察期間

観察期間は、投与後14日間とした。

(2) 一般状態

投与日は投与前および投与後6時間（投与後30分まで、投与後2、4および6時間）まで、投与翌日からの観察期間中は1日1回、一般状態および死亡の有無を観察した。

(3) 体重測定

投与日（投与直前）および投与後1、3、7、10日ならびに14日（剖検日）の午前中に測定した。

(4) 剖　検

死亡動物は発見後速やかに剖検することとしたが、死亡動物は認められなかった。生存動物は観察期間終了時にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、所見を記録した。

なお、投与後24時間以上生存した動物の内で、剖検時に被験物質投与と関連したと思われる所見が得られた器官・組織の代表例および対照群の同一部位の代表例について病理組織学的検査を実施することとしたが、該当部位はみられなかった。

6．統計学的方法

LD_{50}値は、観察期間中の死亡率から概略の範囲を推定した。

体重は、各群で平均値および標準偏差を算出した。

有意差検定は対照群と被験物質各投与群の間で多重比較検定を用いて行い、危険率5%未満を有意とし、5%未満（$p<0.05$）と1%未満（$p<0.01$）とに分けて表示した。

すなわち、Bartlett法による等分散性の検定を行い、等分散の場合には一元配置法による分散分析を行い、有意ならば対照群との群間比較をDunnett法により行った。一方、等分散と認められなかった場合は順位を利用した一元配置法による分析（Kruskal-Wallisの検定）を行い、有意ならば対照群との群間比較は順位を利用したDunnett法を用いて行った。

試験成績および考察

1．一般状態および死亡状況

一般状態観察成績をTable 1および2に示した（Appendix 1-1～1-4、2-1～2-4）。

対照群では、雌雄とも一般状態の観察で異常症状はみられなかった。

一方、被験物質投与群では500mg/kg以上の群の雄および1000mg/kg以上の群の雌で投与後２～６時間には１～４例で下痢がみられた。下痢の発現頻度には、必ずしも用量依存性は認められなかった。また、投与後１日以降には雌雄のいずれの投与群とも異常症状は観察されなかった。

雌雄の各投与群とも死亡発現はなかった。したがって、トリ-p-クメニルフォスフェートのLD_{50}値は、雌雄とも2000mg/kg以上であった（Table 3）。

2．体重推移

体重推移をTable 4および5（Appendix 3-1～3-4、4-1～4-4）ならびにFig.1および2に示した。

投与後１日では、1000mg/kg以上の群の雌雄で対照群に比して有意な増加抑制が認められた。個別的には、1000および2000mg/kg群の雌で投与前の体重に比して1～3gの減少を示す例もあった。500mg/kg群では雌雄とも対照群との間に有意差は認められなかった。

投与後３日以降は、雌雄の各投与群とも対照群との間に有意差は認められなかった。

3．剖検所見

雌雄各群のいずれの例とも、著変はみられなかった。

以上のように、トリ-p-クメニルフォスフェートは限界用量とされている2000mg/kgの

投与によっても死亡例はみられず、LD_{50}値は2000mg/kg以上であった。投与当日には下痢がみられたが、翌日には消失していた。また、体重は1000mg/kg以上で雌雄とも投与後1日には増加抑制が認められたが剖検時の体重は対照群とほぼ同程度であり、回復性は良好と考えられた。

資　　料

1)OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS、SECTION 4、HEALTH EFFECTS、SHORT TERM TOXICOLOGY、401 Acute Oral Toxicity ［（厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修、OECD毒性試験ガイドライン、薬業時報社、平成３年12月25日）から引用］

2)　「トリ-p-クメニルフォスフェート（CAS No.26967760）のラットにおける単回経口投与毒性試験の予備試験」の最終報告書（試験番号：4182P）（株式会社日本バイオリサーチセンター　羽島研究所、平成５年９月10日）

Table 1. General sign of male rats in single dose toxicity study of Tri-p-cumenylphosphate by oral administration

Group (mg/kg)		Number of males and general sign	Hours after administration				Days after administration													
			0 ~0.5	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Control		Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	0	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Tri-p-cumenylphosphate		Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	500	Normal	5	4	2	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Diarrhea	0	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	1000	Normal	5	4	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Diarrhea	0	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	2000	Normal	5	4	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Diarrhea	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2. General sign of female rats in single dose toxicity study of Tri-p-cumenylphosphate by oral administration

Group (mg/kg)		Number of females and general sign	Hours after administration				Days after administration													
			0~0.5	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Control		Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	0	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Tri-p-cumenylphosphate		Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	500	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	1000	Normal	5	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Diarrhea	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	2000	Normal	5	4	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Diarrhea	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 3. Mortality and LD_{50} value of rats in single dose toxicity study of Tri-p-cumenylphosphate by oral administration

Sex	Group (mg/kg)	Number of animals	Hours after administration				Days after administration														Total number of deaths	LD_{50} (mg/kg)
			0.5	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
Male	Control	5	0[a]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2000<
	Tri-p-cumenylphosphate 500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Tri-p-cumenylphosphate 1000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Tri-p-cumenylphosphate 2000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Female	Control	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2000<
	Tri-p-cumenylphosphate 500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Tri-p-cumenylphosphate 1000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Tri-p-cumenylphosphate 2000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

a): Number of deaths.

Table 4. Body weight of male rats in single dose toxicity study of Tri-p-cumenylphosphate by oral administration

Group (mg/kg)	Control 0	Tri-p-cumenylphosphate 500	1000	2000
Number of males	5	5	5	5
Days after administration 0	117.8 ± 2.3	118.2 ± 2.4	118.6 ± 1.8	118.0 ± 2.3
1	138.6 ± 2.6	134.8 ± 4.1	131.0 ± 3.8*	128.4 ± 6.3**
3	160.8 ± 2.4	161.0 ± 5.2	157.6 ± 3.2	157.2 ± 8.5
7	200.6 ± 3.4	199.0 ± 7.1	193.0 ± 7.2	194.8 ± 10.0
10	225.4 ± 7.1	224.4 ± 9.2	220.6 ± 9.9	220.6 ± 12.4
14	260.0 ± 7.6	255.8 ± 11.5	251.8 ± 12.1	255.0 ± 12.7

Each value shows mean (g) ± S.D.
Significantly different from control (*: $P<0.05$, **: $P<0.01$).

Table 5. Body weight of female rats in single dose toxicity study of Tri-p-cumenylphosphate by oral administration

Group (mg/kg)	Control 0	Tri-p-cumenylphosphate 500	1000	2000
Number of females	5	5	5	5
Days after administration 0	102.0 ± 2.0	101.6 ± 2.4	102.0 ± 2.1	101.2 ± 2.6
1	117.8 ± 3.6	113.0 ± 2.9	105.2 ± 4.9**	105.4 ± 6.3**
3	135.4 ± 6.3	135.0 ± 3.7	129.6 ± 5.0	127.8 ± 8.5
7	157.0 ± 8.9	154.4 ± 4.5	153.6 ± 7.6	154.0 ± 17.2
10	167.2 ± 11.6	163.6 ± 2.9	162.2 ± 10.2	161.8 ± 17.0
14	180.8 ± 16.8	176.6 ± 7.4	172.2 ± 15.9	175.2 ± 22.5

Each value shows mean (g) ± S.D.
Significantly different from control (**: $P<0.01$).

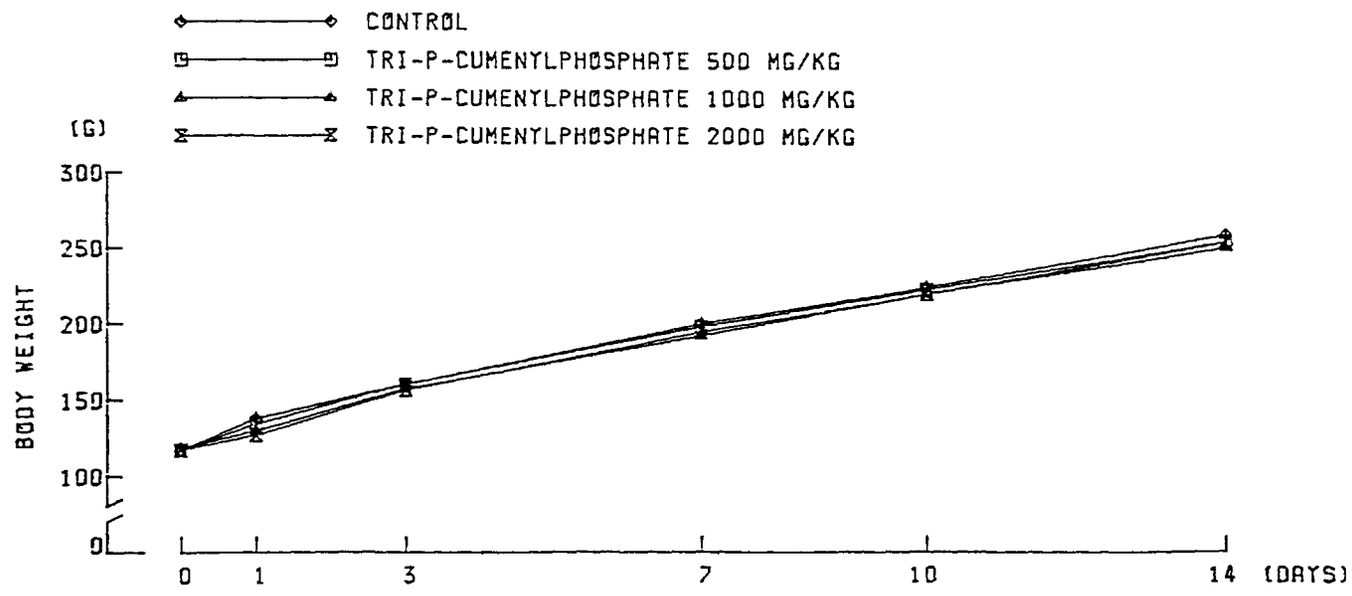

Fig. 1. Body weight of male rats in single dose toxicity study of Tri-p-cumenylphosphate by oral administration.

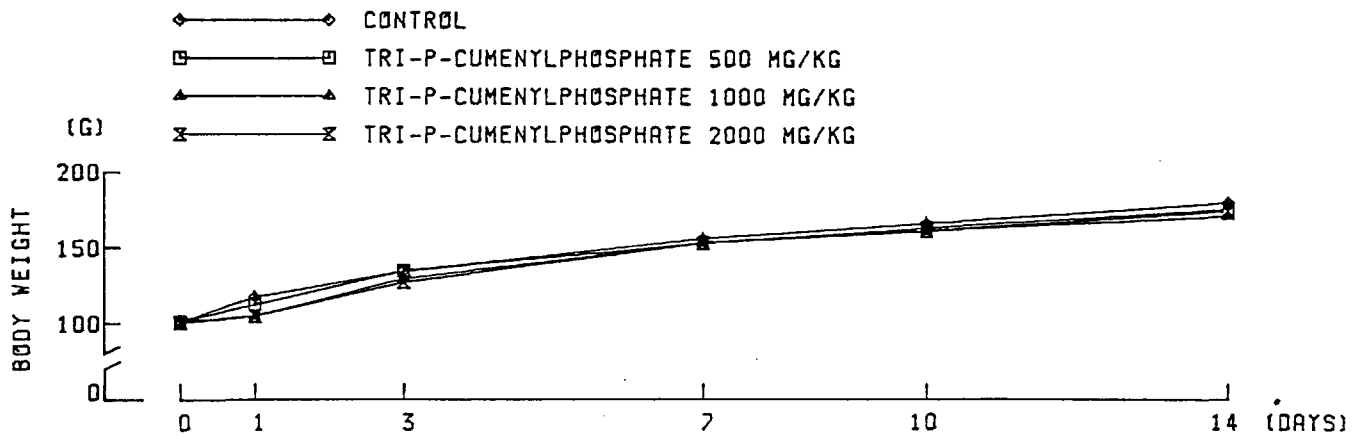

Fig. 2. Body weight of female rats in single dose toxicity study of Tri-p-cumenylphosphate by oral administration.