原本

最 終 報 告 書

1,3,5-トリス(3,5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシベンジル)イソシアヌル酸の
ラットを用いた経口投与による急性毒性試験

B-4921

2003年10月10日

株式会社ボゾリサーチセンター

東 京 本 部 〒151-0065 東京都渋谷区大山町36－7
本社・東京研究所 〒156-0042 東京都世田谷区羽根木1－3－11
御殿場研究所 〒412-0039 静岡県御殿場市かまど1284
函南研究所 〒419-0101 静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125

目　次

頁

目　次 …… 1

要　約 …… 6

緒　言 …… 7

試験材料及び方法

1. 被験物質及び媒体 …… 8
   1) 被験物質 …… 8
   2) 媒体 …… 8
2. 被験液の調製 …… 9
   1) 被験液の調製 …… 9
   2) 被験液の安定性 …… 9
   3) 被験液の濃度・均一性確認 …… 9
3. 試験動物 …… 9
4. 飼育条件 …… 10
5. 投与経路、投与方法及び観察期間とその選択理由 …… 10
6. 投与量及びその設定理由、群構成並びに動物数 …… 10
7. 動物の識別及びケージへの表示 …… 11
8. 検査方法 …… 11
   1) 一般状態の観察 …… 11
   2) 体重測定 …… 11
   3) 病理学検査 …… 11
9. 統計解析 …… 12

頁

試験結果

1. 死亡状況、死亡率及び LD_{50} 値 …… 13
2. 一般状態 …… 13
3. 体重 …… 13
4. 剖検 …… 13

考　　察 …… 14

文　　献 …… 15

Figure and Tables

Fig. 1	Body weight
Table 1	Mortality and LD_{50} value
Table 2-1、2-2	Clinical signs
Table 3-1、3-2	Body weight
Table 4-1、4-2	Gross pathological findings

要　約

1,3,5-トリス(3,5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシベンジル)イソシアヌル酸の 0（0.5 w/v%ヒドロキシプロピルメチルセルロース溶液：対照群）及び 2000 mg/kg を 6 週齢の Crj:CD(SD)IGS 雌雄ラットに 10 mL/kg の投与容量で単回強制経口投与し、その急性毒性を検討した。1 群の動物数は雌雄各 5 匹とした。

2000 mg/kg 投与群の雌雄ともに、死亡はみられず、LD_{50} 値は 2000 mg/kg を上回ると推定された。また、一般状態、体重及び剖検にも被験物質投与の影響は認められなかった。

緒　言

厚生労働省医薬局審査管理課　化学物質安全対策室の依頼により、1,3,5-トリス(3,5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシベンジル)イソシアヌル酸をヒトが摂取した場合の影響を推定する目的で、被験物質をラットに1回経口投与したときの影響を調べたのでその成績を報告する。なお、本試験は以下の基準を遵守及びガイドラインに準拠して実施した。

試験材料及び方法

1. 被験物質及び媒体

1) 被験物質

1,3,5-トリス(3,5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシベンジル)イソシアヌル酸は、厚生労働省医薬局審査管理課　化学物質安全対策室から提供された。使用した被験物質のロット番号及び性状などを以下に示した。

製造者：

名称：1,3,5-トリス(3,5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシベンジル)イソシアヌル酸

CAS 番号：27676-62-6

構造式又は示性式

：$C_{48}H_{69}N_3O_6$

ロット番号：

純度：100 wt%

性状：白色粉末、無臭

分子量：784.10

比重：1.08

融点：221℃

保存方法：冷暗所に密閉して保存した（実測値：2～8℃）。

取扱い上の注意

：吸い込んだり、眼、皮膚及び衣類に触れない様に注意し保護具を着用した。取り扱った後は顔、手を良く洗い、取扱い場所での火気使用を厳禁した。

安定性：返却後の被験物質の分析結果から、動物試験期間中安定であったことが確認された。

保存場所：御殿場研究所　被験物質保存室及び第 1 研究棟被験物質調製室

2) 媒体

メーカー：信越化学工業株式会社

名称：ヒドロキシプロピルメチルセルロース

ロット番号：709017

保存方法 ： 室温

保存場所 ： 御殿場研究所 第1研究棟被験物質調製室

2. 被験液の調製

1) 被験液の調製

先ず、ヒドロキシプロピルメチルセルロース 1.0 g を注射用水に溶解して 200 mL とした。次に各濃度ごとに必要量の被検物質を秤取し、乳鉢を用いて 0.5 w/v%ヒドロキシプロピルメチルセルロース溶液に懸濁して規定量とした。調製は投与の 4 日前に行い、使用時まで褐色ガラス瓶（遮光瓶）に入れて 4～6℃で保存した。

2) 被験液の安定性

本被験物質の 5 及び 200 mg/mL 懸濁液（媒体、0.5 w/v%ヒドロキシプロピルメチルセルロース溶液）は、冷蔵（約 4℃）で 8 日間、その後室温で 4 時間安定であることが株式会社ボゾリサーチセンターで確認されている（Attached Data 1）。

3) 被験液の濃度･均一性確認

投与前に、投与に用いる被験液について HPLC 法により株式会社ボゾリサーチセンターで測定した。その結果、被験物質濃度は表示値に対して 102%、均一性（C.V.値）は 1.0%であり、いずれも許容範囲内（濃度：表示値±10%、均一性：CV10%以内）で適正であった（Attached Data 2）。

3. 試験動物

Sprague-Dawley 系 SPF ラット〔Crj:CD(SD)IGS、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター〕の雌雄各 31 匹[注]を 5 週齢で入手し、10 日間検疫・馴化飼育した後、一般状態に異常のみられない健康な雌雄各 10 匹を選び 6 週齢で試験に供した。

投与日における動物の体重範囲は、雄で 205～216 g（平均値：209 g）、雌で 148～170 g（平均値：156 g）であり、いずれの動物も平均値±20%以内であった。

動物は、検疫・馴化期間中の体重増加量により選別後、群分け当日（投与日）の体重に基づいて層別化し、各群の平均体重ができるだけ均等となるよう各群を構成した。動物の割り付けはコンピュータを用いてブロック配置法及び無作為抽出法の組合せ（ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割り当てた）により実施した。群分け後の余剰動物は試験系より除外し、投与 7 日後にエーテル深麻酔により安楽死させた。

注： 試験計画書に従い、注文匹数は雌雄各 30 匹であったが、実際には雌雄各 31 匹が納入さ

れた。

4. 飼育条件

動物は、温度 21～25 ℃、相対湿度 45～58 %、換気回数 1 時間 10～15 回、照明 1 日 12 時間（07：00～19：00）の飼育室（101 号室）で飼育した。動物は、ブラケット式金属製網ケージ（W 250 x D 350 x H 200 mm：日本ケージ株式会社）に 1 匹ずつ収容し、固形飼料 CRF-1（オリエンタル酵母工業株式会社、Lot No.020403）及び飲料水（御殿場市営水道水：給水瓶使用）を自由に摂取させて飼育した。飼料中の混入物質などについては、使用したロットについて財団法人日本食品分析センターで分析を行いデータを入手し、また、飲料水については、水道法に準拠した水質の分析を財団法人静岡県生活科学検査センターに定期的（年 4 回）に依頼し、得られたデータを入手し、それぞれ異常のないことを確認して保存した。

5. 投与経路、投与方法及び観察期間とその選択理由

投与経路は毒性試験法のガイドラインに準じて経口投与を選択した。投与方法はげっ歯類の経口投与に際して一般的に行われている方法を選択した。すなわち、投与前約 16 時間絶食させたラットに、胃ゾンデを用いて被験液を 10 mL/kg 体重の投与容量で 1 回強制経口投与した。対照群には媒体（0.5 w/v%ヒドロキシプロピルメチルセルロース溶液）を同様に投与した。投与後の再給餌は投与後 6 時間に実施し、給水は投与に関係なく継続して行った。観察期間は投与後 14 日とした。

6. 投与量及びその設定理由、群構成並びに動物数

投与量は予備試験[1)]の成績を参考にして設定した。すなわち、1,3,5-トリス(3,5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシベンジル)イソシアヌル酸の 125、250、500、1000 及び 2000 mg/kg を 1 群雌雄各 3 匹のラットに 1 回強制経口投与した結果、いずれの群にも死亡はみられなかった。このことから、2000 mg/kg の 1 用量を設定し、これに対照群を加えて 2 群構成とした。1 群の動物数は雌雄各 5 匹とした。以下に群構成を示す。

試験群	投与量 (mg/kg)	濃　度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号
対照群	0	0	10	雄 雌	5 5	1001～1005 1101～1105
投与群	2000	200	10	雄 雌	5 5	2001～2005 2101～2105

7. 動物の識別及びケージへの表示

動物は入荷時に小動物用耳標をつけて個体識別を行った。各飼育ケージには、用量（群）ごとに色分けしたケージラベルをつけ、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号及び投与日を明記した。

8. 検査方法

1) 一般状態の観察

全個体について、投与6時間後までは頻繁（投与直後～5分後、～15分後、～30分後、～1時間後、～2時間後、～4時間後、～6時間後）に、その後は1日1回、14日間にわたって体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態を観察した。

2) 体重測定

全個体について、投与日（投与直前、08：46～08：51）に体重を測定し、これを投与液量算出の基準にした。更に、投与1、2、3、7、10及び14日後の一定時刻（08：44～10：56）に体重を測定した。

3) 病理学検査

全個体について、観察期間終了後にエーテル深麻酔下で放血致死させた後、体外表、頭部、胸部及び腹部を含む全身の器官・組織の肉眼観察を行い、記録した。

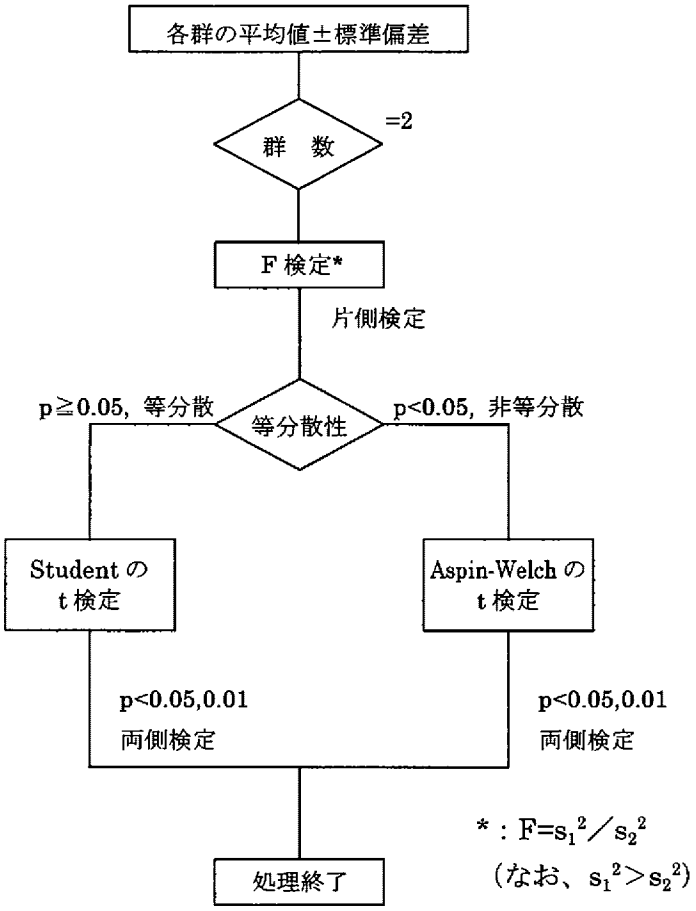
9. 統計解析

1) 致死量

投与後 14 日間の観察においても死亡はみられないことから、LD_{50}値を推定した。

2) 体重

下記の模式図に示す方法に従って検定した。



試験結果

1. 死亡状況、死亡率及び LD_{50} 値

経日死亡状況、死亡率及び LD_{50} 値を Table 1 に示した。

2000 mg/kg 投与群の雌雄ともに、死亡はみられず、LD_{50} 値は 2000 mg/kg を上回ると推定された。

2. 一般状態

成績を Table 2-1、2-2 及び Appendix 1～4 に示した。

いずれの動物にも異常はみられなかった。

3. 体重

成績を Fig. 1、Table 3-1、3-2 及び Appendix 5～8 に示した。

2000 mg/kg 投与群の雌雄ともに、対照群と同様な体重推移を示し、有意差は認められなかった。

4. 剖検

成績を Table 4-1、4-2 及び Appendix 9～12 に示した。

いずれの動物にも異常はみられなかった。

考　察

1,3,5-トリス(3,5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシベンジル)イソシアヌル酸の 0 (0.5 w/v%ヒドロキシプロピルメチルセルロース溶液：対照群) 及び 2000 mg/kg を 6 週齢の Crj:CD(SD)IGS 雌雄ラットに 10 mL/kg の投与容量で単回強制経口投与し、その急性毒性を検討した。

2000 mg/kg 投与群の雌雄ともに、死亡はみられず、一般状態、体重及び剖検においても被検物質投与による影響は認められなかった。これらのことから、ラットにおける 1,3,5-トリス(3,5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシベンジル)イソシアヌル酸の経口投与時の急性毒性は極めて弱いことが示唆された。

文　献

1) 石田茂：1,3,5-トリス(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシベンジル)イソシアヌル酸のラットを用いた経口投与による急性毒性試験の予備試験（株式会社ボゾリサーチセンター、試験番号：C-B056、2002 年実施）

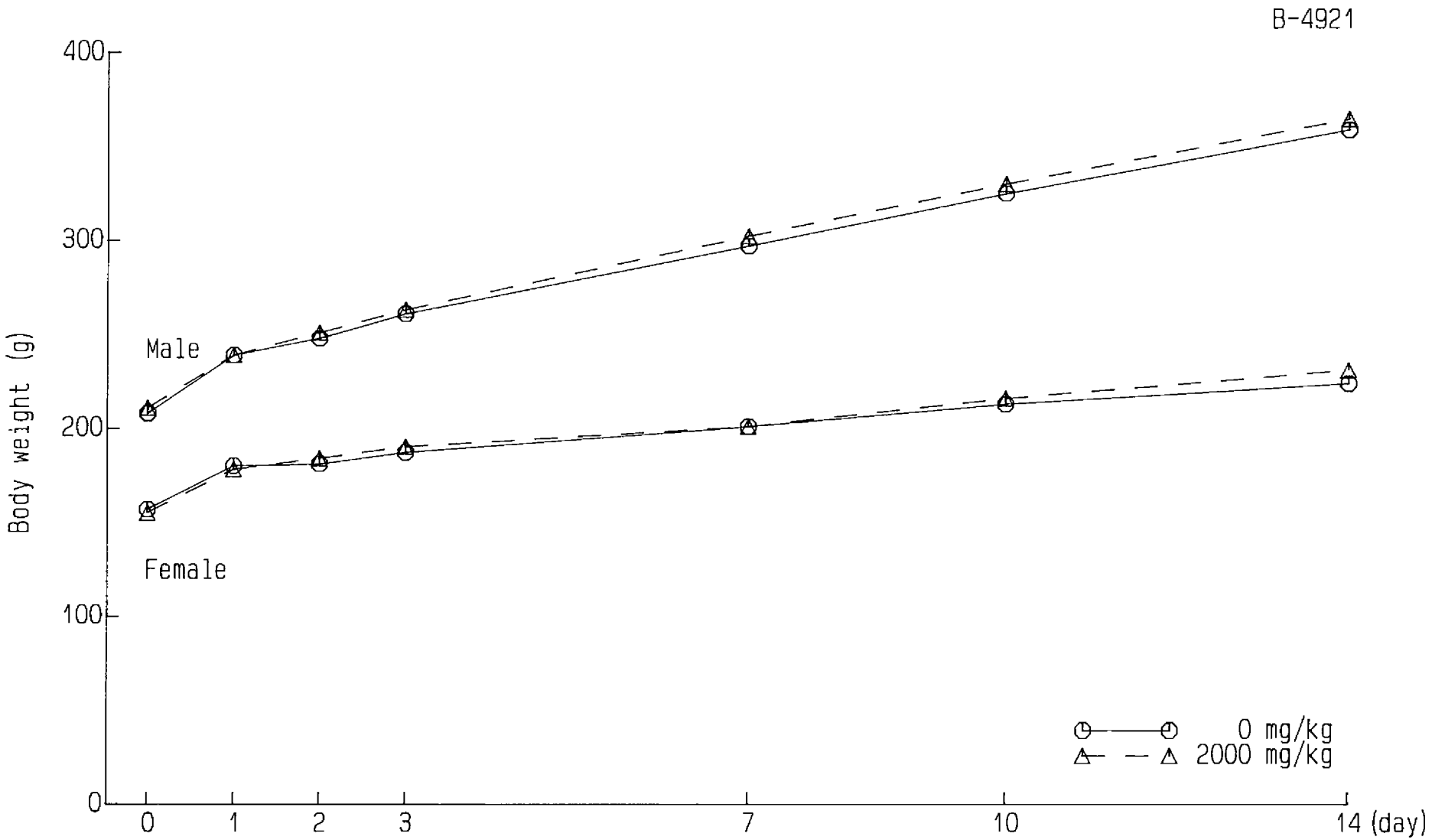


Fig. 1 Body weight oral acute toxicity study of 1, 3, 5-Tris (3, 5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl) isocyanuric acid in rats

Table 1 Mortality and LD_{50} oral acute toxicity study of 1,3,5-Tris(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl)isocyanuric acid in rats

Sex	Dose	Number of animals	Distribution of death																					Mortality	LD_{50}
			minutes			hours				days															
	mg/kg		i~5	~15	~30	~1	~2	~4	~6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		mg/kg
Male	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	> 2000
	2000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
Female	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	> 2000
	2000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	

i : Immediately after dosing

Table 2-1 Clinical signs oral acute toxicity study of 1,3,5-Tris(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl) isocyanuric acid in rats

Male

Dose mg/kg	Findings	minutes			hours				days													
		i~5	~15	~30	~1	~2	~4	~6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0	No. of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
2000	No. of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

i : Immediately after dosing

Table 2-2 Clinical signs oral acute toxicity study of 1,3,5-Tris(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl) isocyanuric acid in rats

Female

Dose mg/kg	Findings	minutes			hours				days													
		i~5	~15	~30	~1	~2	~4	~6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0	No. of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
2000	No. of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

i : Immediately after dosing

Table 3-1 Body weight oral acute toxicity study of 1,3,5-Tris(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl) isocyanuric acid in rats

Male

Dose mg/kg		Day after administration 0	1	2	3	7	10	14	Gain 0-14
0	No.	5	5	5	5	5	5	5	5
	Mean	208	239	248	261	297	325	359	151
	S.D.	4	6	5	5	4	5	8	10
2000	No.	5	5	5	5	5	5	5	5
	Mean	211	239	251	263	302	330	365	155
	S.D.	4	6	7	8	7	8	12	9

Unit : g
No significant difference between treated group and control group.

Table 3-2 Body weight oral acute toxicity study of 1,3,5-Tris(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl) isocyanuric acid in rats

Female

Dose mg/kg		Day after administration 0	1	2	3	7	10	14	Gain 0-14
0	No.	5	5	5	5	5	5	5	5
	Mean	157	180	181	187	201	213	224	67
	S.D.	8	8	8	7	4	6	9	5
2000	No.	5	5	5	5	5	5	5	5
	Mean	155	178	184	190	201	216	231	76
	S.D.	5	4	7	6	7	9	12	9

Unit : g
No significant difference between treated group and control group.

Table 4-1 Gross pathological findings oral acute toxicity study of 1,3,5-Tris(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl)isocyanuric acid in rats

Male

Organs	Findings	Dose (mg/kg)	0	2000
		No. of animals	5[a] (0)[b]	5[a] (0)[b]
External appearance	No abnormality		5 (0)	5 (0)
Viscera of cranial cavity	No abnormality		5 (0)	5 (0)
Viscera of thoracic cavity	No abnormality		5 (0)	5 (0)
Viscera of abdominal cavity	No abnormality		5 (0)	5 (0)

a : Survived
b : Died

Table 4-2 Gross pathological findings oral acute toxicity study of 1,3,5-Tris(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl)isocyanuric acid in rats

Female

Organs	Findings	Dose (mg/kg)	0	2000
		No. of animals	5[a] (0)[b]	5[a] (0)[b]
External appearance	No abnormality		5 (0)	5 (0)
Viscera of cranial cavity	No abnormality		5 (0)	5 (0)
Viscera of thoracic cavity	No abnormality		5 (0)	5 (0)
Viscera of abdominal cavity	No abnormality		5 (0)	5 (0)

a : Survived
b : Died