ベンゼン-1,2-ジカルボン酸ジヘプチル

(CAS No. 3648213)

試験番号：SR - 9433

試験名　：フタル酸ジヘプチルエステルのラットにおける急性経口毒性試験

株式会社 化合物安全性研究所

目　次

頁

表題・試験番号

要　　約 ---------- 4
緒　　言 ---------- 5
材料及び方法 ---------- 5
成　　績 ---------- 9
考　　察 ---------- 10

Figures ---------- 添付

1. Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)
2. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)

Tables ---------- 添付

1. Experimental design for acute oral toxicity test of DHP in rats (SR-9433)
2. Mortality and LD50 values of rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)
3. General appearance of rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)
4. Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)
5. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)
6. Gross findings of rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)
7. Histopathological findings of rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)

表　　題　　フタル酸ジヘプチルエステルのラットにおける急性経口毒性試験

試験番号　　SR－9433

要　約

フタル酸ジヘプチルエステル（CAS No.3648-21-3）の 500、1000及び 2000mg/kgを５週齢の Crj:CD（SD） 系雌雄ラットに経口単回投与した結果、以下の知見が得られた。

１．死亡例は雌雄のいずれの群においても認められず、LD_{50}値は 2000mg/kg以上と推察された。

２．一般状態観察、体重推移、剖検及び病理組織学的検査では、雌雄のいずれにもフタル酸ジヘプチルエステル投与による影響は認められなかった。

緒　　言

フタル酸エステルは、プラスチックの可塑剤として用いられ、一般にその急性毒性は低いとされている。今回、日本における既存化学物質の安全性の点検事業の一環としてフタル酸ジヘプチルエステル（CAS No.3648-21-3）をラットに経口単回投与して死亡状況、一般状態などを観察し、その毒性を検討したので、その成績を報告する。

なお、本試験は「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第４条に規定する試験施設に関する基準」（昭和59年３月31日環保業第39号環境庁企画調整局長、薬発第 229号厚生省薬務局長、 59基局第 85号通商産業省基礎産業局長連名通知）並びに「OECD優良試験所指針Ｃ（81）30最終別添２」に従い、試験方法は「新規化学物質に係る試験の方法について」（昭和49年７月13日環保業第５号環境庁企画調整局長、薬発第 615号厚生省薬務局長、49基局第 392号通商産業省基礎産業局長連名通知）、「新規化学物質に係る試験の方法についての一部改正等について」（昭和61年12月５日環保業第 700号環境庁企画調整局長、薬発第 1039号厚生省薬務局長、61基局第1014号通商産業省基礎産業局長連名通知）及び OECD テストガイドラインに準拠した。

材料及び方法

１．被験物質

被験物質は、　　より提供されたフタル酸ジヘプチルエステル[CAS No. 3648-21-3、以下 DHP と略す。Lot番号：　　製造者：　　純度：99.56％] である。被験物質は、常温で無色透明液体であり、アセトン・DMSO・芳香族炭化水素に溶けやすく、水にほとんど溶けない（被験物質参考資料、Appendix 1）。また、被験物質は、金属缶またはガラス瓶にて冷暗所で保存した。なお、投与終了後の被験物質の一部を製造者へ送付して分析した結果、試験開始前と比較して品質の変化は認められなかった（フタル酸ジヘプチルエステルの安定性試験結果、Appendix 2）。

2．試験群の構成

本試験の投与量設定のために実施した限界試験では、DHPの 500、1000及び 2000 mg/kg群、媒体であるオリブ油を投与する対照群の計４群を設定し、１群当たり雌雄各５匹のラットに投与した。投与後５日間の観察において、対照群を含む各群で投与日に下痢便が認められたのみで、死亡例は認められなかったため、限界試験の観察期間を投与後14日まで延長し、本試験の成績とした（Table１）。

3．被験物質の調製方法

被験物質の調製は用時に次の通り行った。被験物質を精秤し、10、20及び 40w/v％となるように オリブ油（日本薬局方、Lot番号：108065及び408002、ヤクハン製薬株式会社）に溶解した。調製液の定量は試験施設において行い、各濃度の DHP調製液が規定の濃度に調製されていることを確認した（分析証明書番号：0313、Appendix 3）。

4．使用動物

生後４週齢の Crj:CD(SD)系の SPFラット（雄：26匹、体重範囲 83～100g，雌：26匹、体重範囲 67～84g）を、1994年９月28日に日本チャールス・リバー株式会社より受け入れ、８日間の馴化飼育を行った。馴化期間中、一般状態観察を１日１回、体重測定を期間中３回実施し、異常がなく順調な発育を示した動物を試験に用いた。

5．飼育環境条件

動物の飼育は、温度 23±３℃、湿度 RH55±10％、換気回数 10～15回／時間及び照明時間 12時間（午前８時から午後８時まで点灯）に設定されたバリアシステムの飼育室 301（検疫並びに馴化期間）及び 309号室において、ブラケット式金属製金網床ケージ（260W×380D×180H,mm)を用いて行った。ケージ当たりの収容匹数は、群分け前は５匹以内、群分け後は３匹以内とした。ケージの交換は群分け時に１回行った。

飼育室内の清掃及び床の清拭消毒は１日１回行った。なお、消毒には塩素系消毒薬（ヤクラックス、ヤクハン製薬株式会社）及びヨウ素系消毒薬（ダイヤザン、旭硝子株式会社）を１週間単位で交互に使用した。

飼料は固型飼料（CRF-1、オリエンタル酵母工業株式会社）を金属製給餌器を用いて、飲料水は水道水（札幌市水道水）を自動給水装置を用いて、それぞれ自由に摂取させた。給餌器の交換は群分け時に１回、自動給水装置の水抜きは週１回の頻度で実施した。

飼料の分析及び検査は財団法人日本食品分析センター（分析試験成績書：第47080749-001号、Appendix 4)及びオリエンタル酵母工業株式会社(微生物検査報告書：

No.94G01-008、全３頁の３、Appendix 5）で実施し、各混入物質について当社 SOPの許容範囲内であることを確認した。飲料水の水質検査は福田水文センターで実施（水質検査結果書：第 06517号、第 06521号、Appendix 6,7）し、当社SOPの水質基準の範囲内であることを確認した。

６．群分け及び個体識別

群分けは、馴化期間の最終日（投与前日）に各群の体重が均一になるように体重別層化無作為抽出法により行った。

動物の識別は、動物受け入れ時及び群分け時に油性フェルトペンを用いて尾部に行った。ケージには性別毎に色分けしたカードに試験番号、試験群及び動物番号を明記して標示した。

７．投与方法

投与経路は、被験物質が人体に経口的に曝露される可能性があることから、経口投与とした。投与は、動物を約 17～18 時間絶食させた後、胃ゾンデを用いて強制的に胃内に１回行った。投与容量は、体重１kg当たり５mlとして投与日に測定した体重に基づいて算出した。

投与時の週齢は雌雄ともに５週齢で、その平均体重（体重範囲）は雄で 136.2g（126～147g）、雌で105.3g（97～112g）であった。投与時刻は午前９時から午後２時の間とした。

８．観察、測定及び検査項目

(1) 一般状態観察

全例について、投与日は投与後６時間までは頻繁に、投与後１日以降は１日１回以上の頻度で投与後14日まで観察した。発現した症状については、その種類及び観察時刻を記録した。

(2) 体重測定

全例について、投与日を０日と起算し、０、１、３、５、７、10及び 14 日に電子天秤を用いて測定した。

(3) 剖検

全例について、投与後14日に体外表を観察した後、エーテル麻酔下で放血致死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。

(4) 病理組織学的検査

全例について、剖検時に肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳、胃（前胃・腺胃）、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸及び直腸を10％中性緩衝ホルマリン液で固定した。また、異常所見部位及びその関連器官・組織として、対照群及び高用量群の雄全例の精巣、対照群及び高用量群の各１例について精巣上体、前立腺、精嚢及び下垂体について10％中性緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。

摘出器官のうち、対照群及び DHP投与各群の雌雄各２例の肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳（大脳・小脳）、胃（前胃・腺胃）、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸及び直腸、また、異常所見のみられた 1000mg/kg群の雄 No.43と比較対照として対照群の雄 No.14 について精巣及び精巣上体をパラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、病理組織学的検査を行った。

９．統計処理

死亡率を算出した。

体重値について次の流れで検定を行った。すなわち、最初にBartlettの検定法により分散を検定し、その結果、等分散（$p>0.05$）を示した項目については一元配置分散分析法により解析し、有意な場合（$p<0.10$）、Dunnett の検定法により対照群と DHP投与群との比較を行った。一方、不等分散（$p<0.05$）を示した項目については Kruskal-Wallis 法により解析し、有意な場合（$p<0.10$）、 Mann-WhitneyのU-検定法により対照群と DHP投与群との比較を行った。なお、対照群との検定については、危険率５％以下を統計学的に有意とした。

成　　績

1．死亡状況及びＬＤ$_{50}$値

死亡状況及びＬＤ$_{50}$値を Table ２に示した。

雌雄ともに、いずれの群においても死亡は認められなかった。

2．一般状態観察

一般状態観察の成績を Table ３、INDIVIDUAL DATA 1-1-1～1-2-4に示した。

投与日に、雄の1000mg/kg群及び雌の対照群を除く各群で受皿上に下痢便が観察され、対照群の雄１例に下痢便が観察された。

投与後１日以降に異常は認められなかった。

3．体重推移

体重推移を Figure１、２、Table ４、５、INDIVIDUAL DATA 2-1-1～2-2-4に示した。

雌雄ともに、いずれの群においても対照群とほぼ同じ体重推移を示した。

4．剖検

剖検の成績を Table ６、INDIVIDUAL DATA 3-1-1～3-2-4に示した。

2000mg/kg群の雄１例で小型の精巣が認められた。

5．病理組織学的検査

病理組織学的検査の成績を Table ７、INDIVIDUAL DATA 4 に示した。

腎臓：近位尿細管を主とする尿細管上皮における硝子滴沈着（軽度）が対照群、500及び 1000mg/kgの雄各２例、2000mg/kg群の雄１例に、尿円柱（軽度）が対照群の雄１例に認められた。

精巣：剖検で小型が認められた雄１例の精巣は未成熟であった。

その他の検査した器官・組織に異常は認められなかった。

考　　察

DHP の 500、1000及び 2000mg/kg を５週齢の Crj:CD(SD)系雌雄ラットに経口単回投与し、その毒性を検討した。

死亡例は雌雄のいずれの群においても認められず、LD_{50}値は 2000mg/kg以上と推察された。また、一般状態観察、体重推移、剖検及び病理組織学的検査においても DHP投与による影響は認められなかった。

下痢便が投与日に認められたが、対照群でも認められていることから媒体であるオリブ油によるものと考えられた。この下痢便は投与後１日以降には認められず、体重推移など全身に悪影響を及ぼすものではなかった。

剖検では 2000mg/kg群の雄１例で小型の精巣が認められたが、病理組織学的検査で判明したように未成熟に起因するものと考えられることから DHP単回投与による精巣への影響はないものと考えられた。

Figures

Figure 1. Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)

Figure 2. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)

Tables

Table 1. Experimental design for acute oral toxicity test of DHP in rats (SR-9433)

Table 2. Mortality and LD50 values of rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)

Table 3. General appearance of rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)

Table 4. Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)

Table 5. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)

Table 6. Gross findings of rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)

Table 7. Histopathological findings of rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)

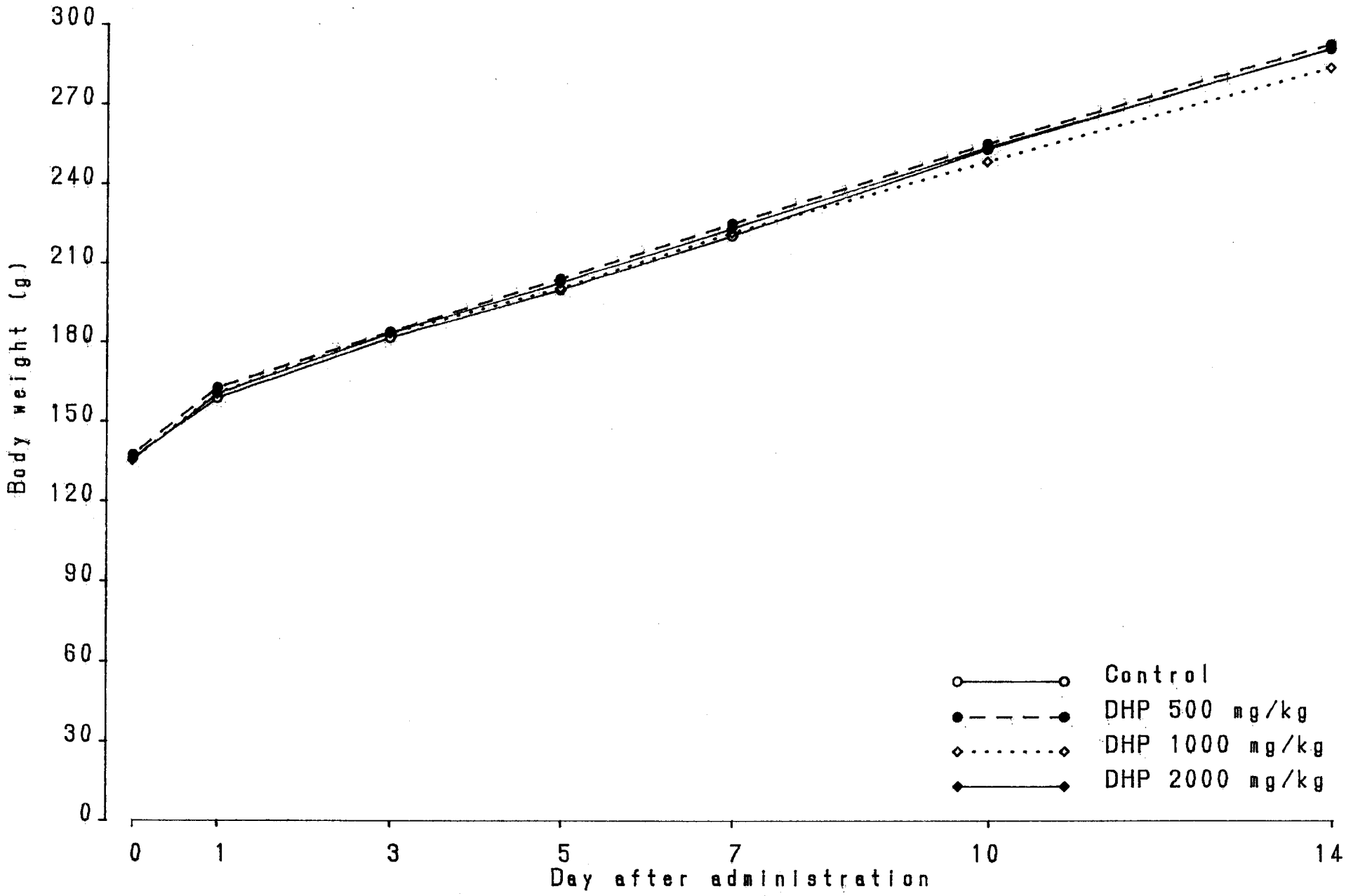

Figure 1. Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)

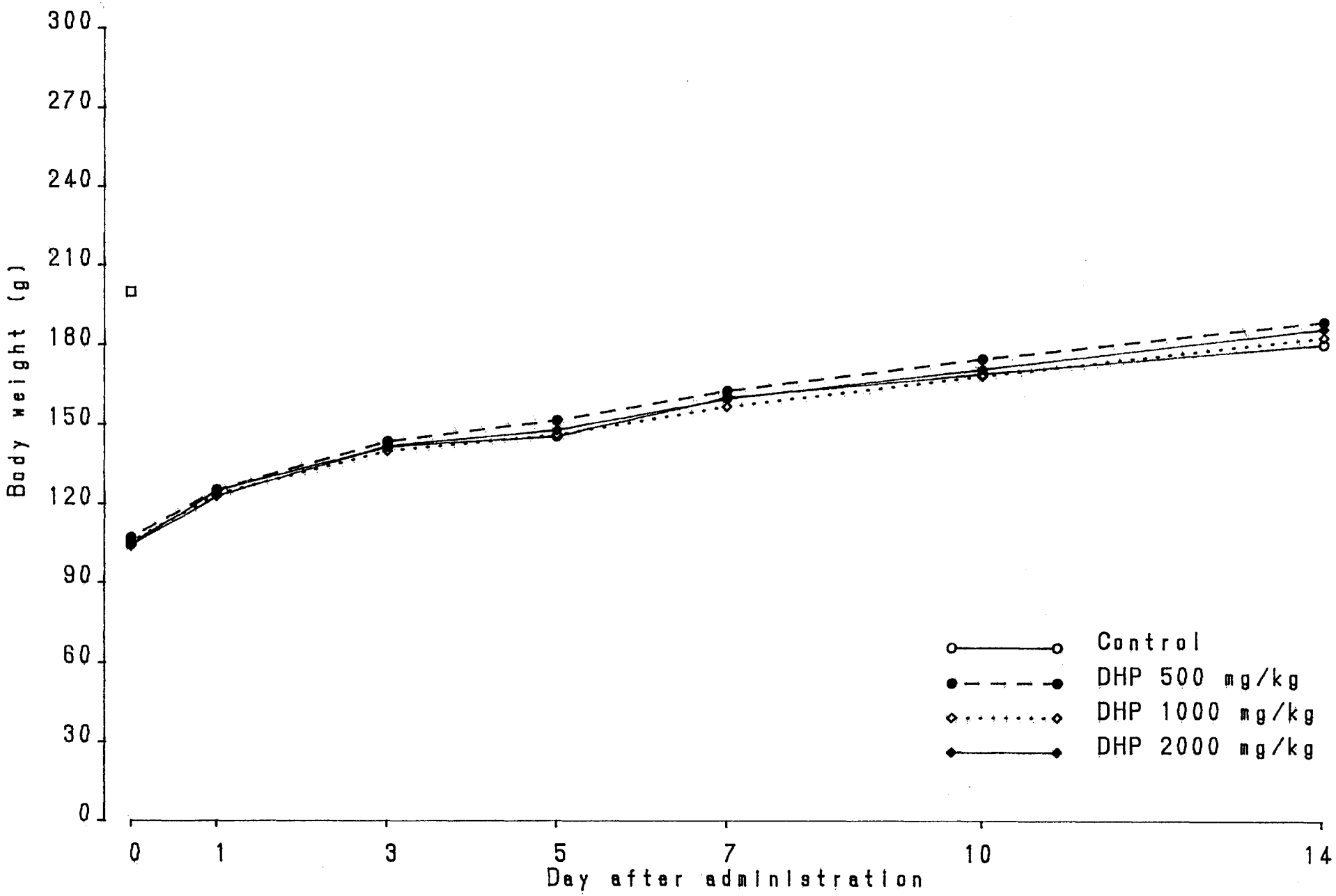

Figure 2. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)

Table 1. Experimental design for acute oral toxicity test of DHP in rats (SR-9433)

Sex	Group	Concentration of DHP (w/v %)	Volume (ml/kg)	No. of animals[a]
Male	Control[b]	0	5	5
	DHP 500 mg/kg[c]	10	5	5
	DHP 1000 mg/kg	20	5	5
	DHP 2000 mg/kg	40	5	5
Female	Control	0	5	5
	DHP 500 mg/kg	10	5	5
	DHP 1000 mg/kg	20	5	5
	DHP 2000 mg/kg	40	5	5

a: Crj:CD(SD) rats were dosed orally at the age of 5 weeks.
b: Control was olive oil.
c: DHP (diheptyl phthalate) was dissolved in olive oil.

Table 2. Mortality and LD50 values of rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)

Sex	Group	Distribution of dead animals			Mortality[b]	LD50 value (mg/kg)
		0	1	2-14[a]		
Male	Control	0	0	0	0/5	>2000
	DHP 500 mg/kg	0	0	0	0/5	
	DHP 1000 mg/kg	0	0	0	0/5	
	DHP 2000 mg/kg	0	0	0	0/5	
Female	Control	0	0	0	0/5	>2000
	DHP 500 mg/kg	0	0	0	0/5	
	DHP 1000 mg/kg	0	0	0	0/5	
	DHP 2000 mg/kg	0	0	0	0/5	

a: Day after administration.
b: No. of dead animals / no. of animals dosed.

Table 3. General appearance of rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)

Item	Male				Female			
		DHP (mg/kg)				DHP (mg/kg)		
	Control	500	1000	2000	Control	500	1000	2000
No. of animals examined [no. of cages examined]	5[2]	5[2]	5[2]	5[2]	5[2]	5[2]	5[2]	5[2]
Findings on administration day								
Diarrhea	1[a]	0	0	0	0	0	0	0
Diarrheal feces on cage tray	[2][b]	[2]	[0]	[1]	[0]	[1]	[1]	[1]

There were no abnormal findings from day 1 to 14 after administration.
a: Values are no. of animals with findings.
b: Values in brackets are no. of cages with findings.

Table 4. Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)

Group	No. of animals	Day after administration						
		0	1	3	5	7	10	14
Control	5	136.2[a] 5.4	159.0 7.6	181.8 12.3	200.0 13.8	220.6 16.6	253.2 17.8	291.0 15.4
DHP 500 mg/kg	5	137.6 6.7	163.0 8.2	184.0 9.8	204.2 11.0	225.2 12.0	255.2 14.5	292.8 15.9
DHP 1000 mg/kg	5	135.6 6.7	161.0 9.3	183.6 12.4	200.6 14.8	221.8 18.3	248.6 22.1	283.8 25.4
DHP 2000 mg/kg	5	135.4 5.3	160.6 7.0	183.6 8.9	202.6 10.7	223.4 15.1	253.8 20.0	291.0 29.4

a: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram.

Table 5. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)

Group	No. of animals	Day after administration						
		0	1	3	5	7	10	14
Control	5	104.4[a] 5.1	125.2 4.6	141.8 7.4	145.8 11.0	160.4 9.0	169.6 12.1	180.8 16.1
DHP 500 mg/kg	5	107.2 4.4	125.4 5.9	143.8 9.6	151.8 11.7	163.0 14.5	175.2 16.0	189.2 18.0
DHP 1000 mg/kg	5	105.6 4.8	123.8 5.6	140.2 6.9	146.4 10.2	157.0 12.8	168.8 15.3	183.4 19.3
DHP 2000 mg/kg	5	104.0 3.7	123.0 2.3	142.0 4.7	148.2 4.1	160.0 5.5	171.4 4.8	186.6 6.5

a: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram.

Table 6. Gross findings of rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)

Item	Male				Female			
		DHP (mg/kg)				DHP (mg/kg)		
	Control	500	1000	2000	Control	500	1000	2000
No. of animals examined	5	5	5	5	5	5	5	5
Organ : Findings								
Testis : Small size	[a] 0	0	0	1	[b] -	-	-	-

a: Values are no. of animals with findings.
b: - = blank value.

Table 7. Histopathological findings of rats in acute oral toxicity test of DHP (SR-9433)

Item		Male				Female			
			DHP (mg/kg)				DHP (mg/kg)		
		Control	500	1000	2000	Control	500	1000	2000
No. of animals examined		3	2	2	3	2	2	2	2
Organ : Findings[a]	Grade[b]								
Kidney : Hyaline droplets deposition in tubular epithelium, mainly proximal tubules	+	2(2)[c d]	2	2	1(2)	0	0	0	0
Hyaline cast	+	1(2)	0	0	0(2)	0	0	0	0
Testis : Immature	+	0(1)	-[e]	-	1(1)	-	-	-	-

a: There were no abnormal findings in the liver, spleen, heart, lung, cerebrum, cerebellum, forestomach, glandular stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum or epididymis.
b: + = slight change.
c: Values are no. of animals with findings.
d: Values in parentheses are no. of animals examined.
e: - = blank value.