

最終報告書

2, 4-ジニトロフェノールのラットを用いる
経口投与による急性毒性試験

(試験番号：98-091)

目次

要約	-----	1
目的	-----	2
材料および方法		
1. 被験物質	-----	2
2. 供試動物および飼育条件	-----	2
3. 供試動物数および投与量	-----	2
4. 投与液調製および投与方法	-----	3
5. 観察事項	-----	3
結果	-----	4
考察および結論	-----	4

添付資料

A. 群別平均値表

Table 1	死亡およびLD ₅₀ 値	-----	1
Table 2	一般状態	-----	2
Table 3	体重	-----	10
Table 4	剖検	-----	11

要 約

2,4-ジニトロフェノールの急性毒性試験を、5週齢のSD系[Crj:CD(SD)IGS]ラットを1用量群雌雄各5匹用い、0(対照)、45、59、76、99、129および167mg/kg用量を単回経口投与して実施した。

死亡は、雄で45mg/kg以上、雌で59mg/kg以上の群において投与後15分頃から6時間の間に認められた。主な中毒症状として雌雄とも自発運動の低下、腹臥姿勢、歩行時の這いずり姿勢および強直性痙攣が認められ、雄では浅速呼吸、雌では全身の硬直も散見された。生存動物の症状は、投与翌日までに概ね回復し、体重は順調に増加した。剖検では、死亡動物に肺の暗赤色化が認められた。

以上より、LD50値は、雄で49mg/kg、雌で51mg/kgであった。

目的

この試験は、2,4-ジニトロフェノールのラットにおける経口投与による急性毒性を明らかにする目的で実施する。

材料および方法

1. 被験物質

2,4-ジニトロフェノール(CAS No. 51-28-5)は、分子量184.11、融点112℃の黄色の結晶性物質である。試験には 製造のもの（ロット番号 純度85.2%、含水量13.9%）を入手し、冷暗所(4℃)で密栓保管し使用した。本被験物質の詳細はAppendix 1に示した。試験に用いた被験物質は使用期間中安定であったことを確認した(Appendix 2)。なお、被験物質の分析は、 に委託して実施した。

2. 供試動物および飼育条件

SD系 [Crj:CD(SD)IGS] SPFラットを日本チャールス・リバー(株) (神奈川県厚木市下古沢795番地)より4週齢(雄42匹, 雌42匹)で搬入し、6日間試験環境に馴化させた後、発育が順調で一般状態の良好な雌雄各35匹を5週齢で供試した。投与時の平均体重(体重の範囲)は、雄124(119~131)g, 雌105(100~111)gであった。

動物は、馴化期間および投与後の観察期間とも室温 21~23℃, 湿度 56~60%, 換気回数10回以上/時(オールフレッシュエアー方式), 照明12時間/日(午前6時点灯, 午後6時消灯)に制御されたバリアーシステム動物飼育室(第8室)で, ステンレス製金網ケージ(260W×380D×180Hmm)に馴化期間は原則として3匹, 投与後の観察期間は2~3匹ずつ雌雄別に収容して飼育した。飼料[日本農産工業(株)製, 固型飼料ラボMRストック, LotNo. 98.11.62]と水(1μmカートリッジフィルター濾過後紫外線照射した殺菌水道水)は自由に摂取させた。動物室の温度・湿度測定結果, 飼料および水の汚染物質の分析結果(Appendix 3~5)などから, 動物の飼育期間を通じて, 試験成績の信頼性に影響を及ぼすと思われる環境要因の変化はなかったものと判断された。

3. 供試動物数および投与量

供試動物数は, 1群雌雄各5匹とし, 各用量群への振り分けは, 投与直前の体重に基づい

て層化無作為抽出法により行い、各群の体重が均一になるようにした。

投与用量は、予備試験の結果に基づいて設定した。すなわち、1用量群雌雄各3匹のラットを用い、雌雄とも14, 20, 30, 46, 69, 104および155mg/kg用量を単回経口投与した結果、雌雄とも14mg/kg以上の用量で中毒症状がみられ、死亡率(死亡動物数/供試動物数)は、それぞれ雄で0/3, 0/3, 0/3, 0/3, 0/3, 2/3および3/3, 雌で0/3, 0/3, 0/3, 0/3, 0/3, 1/3および3/3であった。したがって、本試験の投与用量は、雌雄ともLD₅₀値が得られると判断された45, 59, 76, 99, 129および167mg/kg(公比1.3)の6用量を設定した。他に、媒体のみ投与の対照を設けた。

4. 投与液調製および投与方法

2,4-ジニトロフェノールは、油溶性で水に溶けにくいですが、水の非存在下で自己反応を起こす性質を有する物質である。そこで1%メチルセルロース水溶液に懸濁したところ、均一な投与液の調製が可能であった。したがって、本投与液は、被験物質を1%メチルセルロース水溶液[メチルセルロース100cP:和光純薬工業(株)製 Lot No. ACL4654; 局方精製水: 共栄製薬(株)製 Lot No. 181178]を媒体にして、所定の投与用量になるような濃度(45mg/kg: 0.53^{w/v}%; 59mg/kg: 0.69^{w/v}%; 76mg/kg: 0.89^{w/v}%; 99mg/kg: 1.16^{w/v}%; 129mg/kg: 1.51^{w/v}%; 167mg/kg: 1.96^{w/v}%, 以上純度換算濃度)の懸濁液に調製した。調製は投与直前に行った。投与液量は、体重100g当り1mLとした。投与方法は、テフロン製胃ゾンデおよび注射筒を用いて動物の胃内に単回投与(投与時刻: 午前10:55~11:40)した。なお、動物は前日の午後5時より投与後3時間まで除餌し、水のみを自由に摂取させた。

5. 観察事項

観察期間は投与後14日間とし、その間の一般状態の観察と生死の確認は、投与日においては投与後1時間までと投与後1~3時間および3~6時間の間に少なくとも1回ずつ行い、これを投与0日とした。また、翌日(投与後1日)以降は、前日の午後5時から当日の午後5時までを1日とし、実際の観察は午前9時から午後5時までの間に、投与翌日は午前午後各1回、その後は1回行った。体重は、投与直前(投与0日)、投与後1, 3, 7および14日に測定し、測定日間の体重増加量を算出した。剖検は、死亡例は発見後直ちに、生存例は観察期間終了後にエーテル麻酔死させて行った。病理組織学検査は、剖検で投与後24時間以降の死亡動物はなく、また生存動物においても器官の変化が認められなかったため、実施しなかった。

致死量については、0および100%を除く死亡率が雄では1用量、雌では得られなかったの
で、Van der Wearden法により雄ではLD₅₀値および95%信頼限界、雌ではLD₅₀値のみ算出した。

結果

1. LD₅₀値 (Table 1)

死亡は、雄で45mg/kg以上の群で認められ、死亡率は45mg/kg群で20%、59mg/kg以上の群
では、いずれも100%であった。また、雌では、45mg/kg群では死亡はみられず、59mg/kg以
上の群では、全例死亡し、死亡率は100%であった。死亡率より算出されたLD₅₀値 (95%信
頼限界) は、雄49(44-54)mg/kg、雌51mg/kgであった。

2. 一般状態 (Table 2, Appendix 6)

被験物質の投与の全用量群の雌雄に共通して、投与後約10分から自発運動の低下および
腹臥姿勢が多く例で認められた。その他に、歩行時の這いずり姿勢および強直性痙攣が
雌雄に、さらに浅速呼吸が雄に、全身の硬直が雌に散見され、雌では流涎も1例に認められ
た。死亡動物では、これらの症状が重度化し、投与後15分頃から6時間の間に死亡した。生
存動物の症状は、投与後3~6時間から回復傾向が認められ、多くの症状は投与翌日までに
回復した。

3. 体重推移 (Table 3, Appendix 7)

雌雄とも投与翌日(投与後1日)から対照群と同様に順調な増加が認められた。

4. 病理学検査 (Table 4, Appendices 8, 9)

死亡動物の剖検において、雌雄とも肺の軽度から中等度の暗赤色化が認められた。生存
動物には器官の肉眼的変化は認められなかった。

考察および結論

2,4-ジニトロフェノールのラットを用いる急性毒性試験を単回経口投与により実施した。

2,4-ジニトロフェノールのラットにおける急性毒性については、中毒症状として腹臥姿
勢、浅速呼吸、強直性痙攣、振戦および死亡前後の硬直などが、また経口 LD₅₀値は 71mg
/kgとの報告¹⁾がある。今回の試験では、LD₅₀値は約50mg/kgであり、主な中毒症状として、

自発運動の低下，腹臥姿勢，這いずり姿勢，強直性痙攣，さらに雄では浅速呼吸，雌では全身の硬直が認められ，上述の報告とほぼ同様な毒性徴候が認められた．死亡動物の発現は投与後15分頃から6時間までであり，生存動物の症状の多くは投与翌日までに消失し，回復が速く，投与翌日以降の体重増加への影響も認められなかった．剖検においては死亡動物に肺の暗赤色化が認められた．

以上の結果より，LD₅₀値は，雄で49mg/kg，雌で51mg/kgであった．

文献

- 1) Kaiser, J. A., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 6, 232-244 (1964)

2,4-ジニトロフェノールのラットを用いる
経口投与による急性毒性試験

(試験番号 98-091)

最終報告書 添付資料 A

(群別平均値表)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

Table 1 Mortality and LD₅₀ value of rats treated orally with 2,4-dinitrophenol in the acute oral toxicity test

Sex	Dose (mg/kg)	Number of rats treated	Number of rats that died						Mortality	LD ₅₀ (mg/kg) [95% confidence limit]
			0~1 hr	1~3 hr	3~6 hr	6~24 hr	1~3 days	3~14 days		
Male	0	5	0	0	0	0	0	0	0/5	49 [44~54]
	45	5	0	1	0	0	0	0	1/5	
	59	5	1	3	1	0	0	0	5/5	
	76	5	2	2	1	0	0	0	5/5	
	99	5	5	0	0	0	0	0	5/5	
	129	5	4	1	0	0	0	0	5/5	
	167	5	5	5	0	0	0	0	5/5	
Female	0	5	0	0	0	0	0	0	0/5	51 ^a
	45	5	0	0	0	0	0	0	0/5	
	59	5	2	2	1	0	0	0	5/5	
	76	5	3	2	0	0	0	0	5/5	
	99	5	5	0	0	0	0	0	5/5	
	129	5	3	2	0	0	0	0	5/5	
	167	5	5	5	0	0	0	0	5/5	

a : 95% confidence limit was not calculated from the mortality

Table 2-1 Incidence of clinical signs of rats treated orally with 2,4-dinitrophenol in the acute oral toxicity test

Clinical sign	Sex	Dose (mg/kg)	Day			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
			Hr.	0 1	0 3															0 6	
No abnormalities detected	Male	0	5 ^a /5 ^b	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	
		45	0/5	0/4	0/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
		59	0/5	0/1																	
		76	0/5	0/1																	
		99	0/5																		
		129	0/5																		
		167	0/5																		
	Female	0	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
		45	0/5	0/5	0/5	3/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
		59	0/5	0/1	0/1																
		76	0/5																		
		99	0/5																		
		129	0/5																		
167	0/5																				

a : Number of animals with sign: b : Number of animals examined

Table 2-2 Incidence of clinical signs of rats treated orally with 2,4-dinitrophenol in the acute oral toxicity test

Clinical sign	Sex	Dose (mg/kg)	Day Hr.	0			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
				1	3	6																
Decreased locomotor activity	Male	0	0 ^a /5 ^b	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
		45	5/5	4/4	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	
		59	5/5	1/1																		
		76	5/5																			
		99	5/5																			
		129	5/5																			
		167	5/5																			
	Female	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
		45	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
		59	5/5	1/1	0/1																	
		76	5/5																			
		99	5/5																			
		129	5/5																			
		167	5/5																			

a : Number of animals with sign; b : Number of animals examined

Table 2-3 Incidence of clinical signs of rats treated orally with 2,4-dinitrophenol in the acute oral toxicity test

Clinical sign	Sex	Dose (mg/kg)	Day Hr.	0			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14				
				1	3	6																		
Prone position	Male	0		0 ^a /5 ^b	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5			
		45		5/5	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4		
		59		5/5	1/1																			
		76		5/5	0/1																			
		99		5/5																				
		129		5/5																				
		167		5/5																				
			Female	0		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
				45		5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
				59		5/5	1/1	0/1																
				76		5/5																		
				99		5/5																		
				129		5/5																		
	167			5/5																				

a : Number of animals with sign; b : Number of animals examined

Table 2-4 Incidence of clinical signs of rats treated orally with 2,4-dinitrophenol in the acute oral toxicity test

Clinical sign	Sex	Dose (mg/kg)	Day Hr.	0			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14				
				1	3	6																		
Panting	Male	0		0 ^a /5 ^b	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5			
		45		0/5	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4		
		59		1/5	0/1																			
		76		2/5	0/1																			
		99		0/5																				
		129		0/5																				
		167		0/5																				
		Panting	Female	0		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
				45		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
				59		0/5	0/1	0/1																
				76		0/5																		
				99		0/5																		
				129		0/5																		
167				0/5																				

a : Number of animals with sign; b : Number of animals examined

Table 2-5 Incidence of clinical signs of rats treated orally with 2,4-dinitrophenol in the acute oral toxicity test

Clinical sign	Sex	Dose (mg/kg)	Day			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
			Hr.	0 1	0 3															0 6	
Crawling position	Male	0	0 ^a /5 ^b	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
		45	0/5	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	
		59	0/5	1/1																	
		76	0/5	0/1																	
		99	1/5																		
		129	0/5																		
		167	1/5																		
Crawling position	Female	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
		45	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
		59	0/5	0/1	0/1																
		76	1/5																		
		99	0/5																		
		129	1/5																		
		167	0/5																		

a : Number of animals with sign; b : Number of animals examined

Table 2-6 Incidence of clinical signs of rats treated orally with 2,4-dinitrophenol in the acute oral toxicity study

Clinical sign	Sex	Dose (mg/kg)	Day Hr.	0			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
				1	3	6																	
Tonic convulsion	Male	0		0 ^a /5 ^b	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
		45		0/5	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	
		59		0/5	0/1																		
		76		0/5	0/1																		
		99		0/5																			
		129		0/5																			
		167		3/5																			
	Tonic convulsion	Female	0		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
			45		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
			59		1/5	0/1	1/1																
			76		0/5																		
			99		0/5																		
			129		0/5																		
			167		1/5																		

a : Number of animals with sign; b : Number of animals examined

Table 2-7 Incidence of clinical signs of rats treated orally with 2,4-dinitrophenol in the acute oral toxicity test

Clinical sign	Sex	Dose (mg/kg)	Day Hr.	0			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14				
				1	3	6																		
Rigidity	Male	0		0 ^a /5 ^b	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5			
		45		0/5	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4		
		59		0/5	0/1																			
		76		0/5	0/1																			
		99		0/5																				
		129		0/5																				
		167		0/5																				
		Rigidity	Female	0		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
				45		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
				59		0/5	0/1	0/1																
				76		0/5																		
				99		2/5																		
				129		0/5																		
167				1/5																				

a : Number of animals with sign; b : Number of animals examined

Table 2-8 Incidence of clinical signs of rats treated orally with 2,4-dinitrophenol in the acute oral toxicity test

Clinical sign	Sex	Dose (mg/kg)	Day Hr.	0			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
				1	3	6																
Salivation	Male	0		0 ^a /5 ^b	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
		45		0/5	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
		59		0/5	0/1																	
		76		0/5	0/1																	
		99		0/5																		
		129		0/5																		
		167		0/5																		
	Female	0			0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		45			0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		59			0/5	0/1	0/1															
		76			0/5																	
		99			1/5																	
		129			0/5																	
		167			0/5																	

a : Number of animals with sign; b : Number of animals examined

Table 3 Body weights of rats treated with 2,4-dinitrophenol in the acute oral toxicity test

Sex	Dose (mg/kg)	Number of rats treated	Days after treatment				
			0	1	3	7	14
Male	0	5	124 ± 3 (5)	141 ± 4 [+17] (5)	166 ± 3 [+25] (5)	202 ± 5 [+36] (5)	265 ± 9 [+63] (5)
	45	5	124 ± 4 (5)	139 ± 6 [+15] (4)	165 ± 8 [+26] (4)	204 ± 10 [+39] (4)	268 ± 13 [+64] (4)
	59	5	124 ± 3 (5)				
	76	5	124 ± 3 (5)				
	99	5	124 ± 3 (5)				
	129	5	124 ± 4 (5)				
	167	5	125 ± 3 (5)				
Female	0	5	105 ± 4 (5)	120 ± 6 [+15] (5)	140 ± 8 [+20] (5)	157 ± 12 [+17] (5)	180 ± 18 [+23] (5)
	45	5	105 ± 3 (5)	120 ± 4 [+15] (5)	141 ± 5 [+21] (5)	163 ± 6 [+22] (5)	191 ± 10 [+28] (5)
	59	5	105 ± 4 (5)				
	76	5	105 ± 3 (5)				
	99	5	106 ± 3 (5)				
	129	5	105 ± 4 (5)				
	167	5	105 ± 4 (5)				

Values present mean body weights ± S.D.

[n] : Increase from last mean body weight measured(g)

(n) : Number of rats examined

Table 4 Incidence of necropsy findings of rats treated orally with 2,4-dinitrophenol in the acute toxicity test

Findings	Dose(mg/kg)	0	45	59	76	99	129	167
		No. of animals	5 ^a (0) ^b	4(1)	0(5)	0(5)	0(5)	0(5)
Male	No abnormalities detected	5(0)	4(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	Lung : Dark red in color	0(0)	0(1)	0(5)	0(5)	0(5)	0(5)	0(5)
Findings	Dose(mg/kg)	0	45	59	76	99	129	167
		No. of animals	5 ^a (0) ^b	5(0)	0(5)	(5)	0(5)	0(5)
Female	No abnormalities detected	5(0)	5(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	Lung : Dark red in color	0(0)	0(0)	0(5)	0(5)	0(5)	0(5)	0(5)

a : No. of animals that survived; b : No. of animals that died