

最終報告書

2, 6-ジメチルアニリンのラットを用いる単回経口投与毒性試験

(試験番号：02-237-1)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

目次

要約	1
目的	2
材料および方法	2
結果	5
考察	6
文献	7

添付資料

群別平均表

Table 1	死亡率	8
Table 2	一般状態	9
Table 3	体重	10
Table 4	剖検	11

要 約

2, 6-ジメチルアニリンの急性毒性を調べるために、SD系[Crj:CD(SD)IGS]雌ラットを1群3匹として用い、固定用量を死亡状況を確認しながら段階的に単回経口投与する逐次法により検討した。

ステップ1として300mg/kgを投与した結果、死亡は認められなかった。ステップ2として、再度300mg/kgを投与したが、死亡は認められなかった。そこで、ステップ3では用量を上げて2000mg/kgを投与した結果、3匹中3匹の死亡が認められた。

300mg/kgにおいて、一般状態については、眼瞼下垂を伴った軽度な自発運動の低下が認められたが、投与後3時間以降には消失した。体重は、順調に増加し、観察期間終了時の剖検において、内部諸器官に異常は認められなかった。2000mg/kgにおいては、自発運動の低下に加えて、横臥、歩行異常、筋弛緩および呼吸深大が認められ、投与後6～24時間の間に全例が死亡した。剖検では、3匹中2匹の膀胱内に赤色尿が認められた。

以上の結果より、2, 6-ジメチルアニリンのラット経口投与における概ねの致死量は500mg/kgと推定され、化学物質危険度分類(GHS)ではカテゴリ4に分類された。

目 的

2, 6-ジメチルアニリンについて, ラットの経口投与における急性毒性を明らかにする。

材料および方法

1. 被験物質

2, 6-ジメチルアニリン (CAS No. 87-62-7) は, 有機溶媒およびオリーブ油に可溶性無色の液体である。試験には, 製造の試薬 (純度 99.7%) を購入し, 冷暗所 (3~5°C) に保管, 開封後は窒素ガスを充填・密栓し, 使用した。本被験物質の詳細は, Appendix 1 に示す。試験に使用した被験物質は, 投与終了後に分析し, 試験期間中安定であったことを確認した (Appendix 2)。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] の SPF ラットを日本チャールス・リバー株式会社 (神奈川県厚木市下古沢 795) より搬入 (9 週齢の雌 15 匹) し, 5 日間試験環境に馴化させ, その間に検疫を行い, 一般状態の良好な雌 12 匹を, 10 週齢で試験に供した。投与は最大 4 ステップを想定し, 1 群 3 匹の計 4 群を設けた。動物の各群への割り付けは, ステップ 1 の投与前日の体重に基づく層化無作為抽出法により行なった。投与時の平均体重 (体重の範囲) は, ステップ 1 で 214 (204~219) g, ステップ 2 で 214 (206~220) g, ステップ 3 では 216 (210~222) g であった。なお, ステップ 3 までの投与で概略の致死量が求められたので, ステップ 4 の投与は実施せず, そのまま実験終了時まで飼育し, エーテルの吸入麻酔により安楽死させた。

動物は, 馴化期間および投与後の観察期間とも, 室温 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55 \pm 10\%$, 換気回数 10 回以上/時 (オールフレッシュエア方式), 照明 12 時間/日 (午前 7 時点灯, 午後 7 時消灯) に設定されたバリアーシステム動物室 (第 8 室) で, ステンレス製金網ケージ (260W×380D×180Hmm) に, 3 匹ずつ収容して飼育した。飼料 (固型飼料ラボMRストック, 日本農産工業株式会社, Lot. No. 030557) と飲料水 (孔径 $1 \mu\text{m}$ のカートリッジフィルターで濾過後紫外線照射した殺菌水道水) は,

自由に摂取させた。給水には自動給水装置を用いた。

なお、動物の飼育期間中、動物室の温度は 22.0～23.7℃、湿度は 47～58%の範囲で推移 (Appendix 3) し、また飼料および飲料水の汚染物質の分析値 (Appendices 4&5) は、当研究所が定めた基準値以下であることが確認された。従って、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. 投与用量および投与方法

投与用量は、OECD の試験法ガイドライン 423 (急性毒性等級法) の別表 (Appendix 9 参照) に従って、5, 50, 300 あるいは 2000mg/kg の固定量とし、逐次法により各ステップごとに死亡状況を確認しながら、概略の致死量が推定できるまで、それぞれ 2 日間隔で段階的に投与を行った。ステップ 1 での用量は、本物質のラット経口投与における LD₅₀ 値が 705-840mg/kg との報告¹⁾に基づき、300mg/kg とした。

投与方法は、テフロン製胃ゾンデを用い、動物の胃内に単回投与した。なお、動物は各ステップ毎に、投与前日の午後 5 時から投与後 3 時間まで除餌し、飲料水のみを自由に摂取させた。投与は、午前中 (ステップ 1 で 9:43～9:44, ステップ 2 で 9:08～9:09, ステップ 3 では 9:11～9:12) に実施した。

4. 投与液の調製

本被験物質はオリーブ油に可溶なことから、投与液はオリーブ油 (宮澤薬品株式会社, ロット番号 KA22) を溶媒とし、所定の濃度 (300mg/kg 群:6w/v%, 2000mg/kg 群:40w/v%) になるような溶液に調製した。投与液の調製は投与直前に行い、各個体の投与液量は投与直前の体重より算出した。投与液量は、体重 1kg 当たり 5mL とした。

5. 観察事項

観察期間は投与後 14 日間とし、一般状態の観察および生死の確認は、観察 1 日 (投与日) においては投与後 1 時間まで、1～3 時間の間および 3～6 時間の間になくとも 1 回ずつ行った。観察 2 日は午前、午後の各 1 回、観察 3 日以降は午前中に 1 回行った。体重は、観察 1 (投与直前), 4, 8 および 15 日に測定した。剖検

は、死亡動物は発見後速やかに、生存動物は観察 15 日の観察終了後にエーテル麻酔により安楽死させ、内部器官を肉眼的に観察した。

6. 概略の LD₅₀ 値の推定および化学物質危険度分類

OECD の試験法ガイドライン 423 (急性毒性等級法) の別表 (Appendix 9 参照) に従って、各ステップでの死亡率から概略の LD₅₀ 値を推定し、化学物質危険度分類の万国共通分類法 [Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures (GHS)] に従って、毒性の最も強いカテゴリー 1 から最も弱いカテゴリー 5 のいずれかに分類した。

結 果

1. 死亡率(Table 1)

ステップ 1 として 300mg/kg を投与したが、死亡は認められなかった。確認のため、ステップ 2 として再度 300mg/kg を投与したが、死亡は認められなかった。そこで、ステップ 3 として 2000mg/kg を投与した結果、3 匹中 3 匹の死亡が認められた。

2. 一般状態(Table 2, Appendix 6)

300mg/kg において、ステップ 1 およびステップ 2 の全例に、投与後 15~30 分以降から眼瞼下垂を伴った軽度な自発運動の低下が認められた。これらの症状は投与後 3 時間以降には消失し、その後は、一般状態の変化は認められなかった。

なお、投与直後に一過性の流涎を示す例があったが、少数の所見であった。2000mg/kg においては、自発運動の低下に加えて、全例に、投与 1 時間以内から横臥、歩行異常、筋弛緩および呼吸深大が認められ、投与後 6 時間~24 時間の間に死亡した。

3. 体重推移(Table 3, Appendix 7)

300mg/kg において、ステップ 1 およびステップ 2 とも、体重は順調な増加を示した。

4. 剖検(Table 4, Appendix 8)

300mg/kg において、観察期間終了時の剖検では内部諸器官の肉眼的変化は認められなかった。

2000mg/kg においては、死亡した 3 匹中 2 匹の膀胱内に赤色尿が認められた。

考 察

2, 6-ジメチルアニリンを雌ラットに、ステップ1として300mg/kgを単回経口投与したが死亡は認められず、ステップ2として再度300mg/kgを投与したが、死亡は認められなかった。そこで、ステップ3として2000mg/kgを投与したところ、3匹中3匹が死亡した。

投与した動物に共通した毒性徴候として、300mg/kgでは、眼瞼下垂を伴った軽度な自発運動の低下が認められた。この症状は投与後3時間以降には回復し、体重は順調な増加を示した。観察期間終了時の剖検において、内部諸器官の肉眼的変化は認められなかった。2000mg/kgでは、自発運動の低下に加えて、横臥、歩行異常、筋弛緩および呼吸深大が認められ、動物は投与後6時間～24時間の間に全例が死亡した。剖検では、3匹中2匹の膀胱内に赤色尿が認められた。

赤色尿については、本被験物質のラットにおける反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験²⁾で、乳頭壊死などを特徴とした腎臓の変化が認められていることから、腎臓に対する影響と関連した所見である可能性が考えられた。

以上の結果により、2, 6-ジメチルアニリンのラット経口投与における概ねの致死量は500mg/kgと推定され、化学物質危険度分類（GHS）ではカテゴリー4に分類された。

文 献

- 1) Richardson, M.L. and Gangolli, S. “The dictionary of substances and their effects, Volume 3(D-Dim)” pp592-594, The royal society of chemistry, Cambridge, 1993.
- 2) 山口真樹子ら, 2, 6-ジメチルアニリンのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験, 財団法人 畜産生物科学安全研究所 所内資料 (試験番号 02-237-2, 2004)

Table 1 Mortality of female rats treated with aniline, 2,6-dimethyl- in the single dose oral toxicity test

Step	Dose (mg/kg)	Number of animals treated	Number of animals that died											Mortality	Category (GHS)	LD ₅₀ (mg/kg)	
			1				2	3	4	5	6	7	8~15(days)				
			~1	~3	~6	~24 (hrs)											
1	300	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ^a /3 ^b		
2	300	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3	4	500
3	2000	3	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3/3		

a : Number of animals that died; b : Number of animals treated

Table 2 Clinical signs of female rats treated with aniline, 2,6-dimethyl- in the single dose oral toxicity test

Step	Dose (mg/kg)	Findings	Grade	1			2	3	4~15(days)
				~1	~3	~6(hrs)			
1	300	Number of animals examined		3	3	3	3	3	3
		Decresed locomotor activity	1	3	0	0	0	0	0
		Ptosis	1	3	3	0	0	0	0
		Salivation	1	2	0	0	0	0	0
2	300	Number of animals examined		3	3	3	3	3	3
		Decresed locomotor activity	1	3	0	0	0	0	0
		Ptosis	1	3	3	0	0	0	0
3	2000	Number of animals examined		3	3	3	0	0	0
		Decresed locomotor activity	3	3	3	3			
		Prone position	1	3	3	3			
		Ptosis	1	1	0	0			
		Abnormal gait	2	3	0	0			
		Hypotonia	1	3	0	0			
		Deep respiration	3	0	3	3			
	1	3	3	3					

Grade, 1 : Slight; 2 : Moderate; 3 : Severe

Table 3 Body weights of female rats treated with aniline, 2,6-dimethyl- in the single dose oral toxicity test

Step	Dose (mg/kg)	Number of animals treated	Body weight (g)			
			1	4	8	15 (days)
1	300	3	214 ± 8 (3)	237 ± 12 (3)	243 ± 14 (3)	259 ± 16 (3)
2	300	3	214 ± 7 (3)	244 ± 1 (3)	245 ± 13 (3)	256 ± 5 (3)
3	2000	3	216 ± 6 (3)	(0)	(0)	(0)

Values represent mean body weight ± S.D. (number of animals examined)

Table 4 Incidence of necropsy findings of female rats treated with aniline, 2,6-dimethyl-
in the single dose oral toxicity test

Step	Dose (mg/kg)	Findings	Grade	Fate	
				Terminal kill	Found dead
1	300	Number of animals examined		3	0
		No abnormalities detected		3	
2	300	Number of animals examined		3	0
		No abnormalities detected		3	
3	2000	Number of animals examined		0	3
		No abnormalities detected			1
		Urinary bladder : red urine	1		2

TK : Terminal kill, FD : Found dead
Grade, 1 : Slight