
2-sec-ブチル-4,6-ジニトロフェノールのラットを用いる

単回経口投与毒性試験

最 終 報 告 書

作成日 2004年10月22日

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

目次

要約	8
緒言	9
方法	9
1. 被験物質及び媒体	9
2. 投与検体及び濃度確認	9
3. 使用動物及び飼育条件	10
4. 投与経路, 投与方法, 群構成及び投与量	11
5. 観察及び検査項目	11
6. 統計解析	12
結果	12
1. 死亡状況, LD ₅₀ 値及び一般状態	12
2. 体重	12
3. 剖検	12
考察	13
文献	13

Attachment, Table, Fig. 及び Appendix の目次

Table 1	Mortality and LD ₅₀ value of female rats in single dose oral toxicity test of phenol, 2- <i>sec</i> -butyl-4, 6-dinitro-	18
Table 2	General signs of female rats in single dose oral toxicity test of phenol, 2- <i>sec</i> -butyl-4, 6-dinitro-	19
Table 3	Body weights of female rats in single dose oral toxicity test of phenol, 2- <i>sec</i> -butyl-4, 6-dinitro-	20
Table 4	Necropsy findings of female rats in single dose oral toxicity test of phenol, 2- <i>sec</i> -butyl-4, 6-dinitro-	21
Fig.1	Chemical structure of phenol, 2- <i>sec</i> -butyl-4, 6-dinitro-	22

要約

2-sec-ブチル-4,6-ジニトロフェノールを雌ラットに1回経口投与し、その毒性について検討した。投与量は、第1回試験は50 mg/kg、第2回試験は5 mg/kg、第3回試験は5 mg/kgとした。媒体にはトウモロコシ油を用いた。各群の使用動物数は各3例とした。

1. 死亡状況及び一般状態

死亡例は、50 mg/kg 投与で投与後1日までに3例全例に認められた。

一般状態において、50 mg/kg 投与で腹臥、緩徐呼吸、下痢便及び自発運動の低下がみられた。5 mg/kg 投与では、異常はみられなかった。

2. 体重

5 mg/kg 投与では、体重推移に異常はみられなかった。

3. 剖検

50及び5 mg/kg 投与とも、異常はみられなかった。

以上の結果から、2-sec-ブチル-4,6-ジニトロフェノールのLD₅₀値は、5 mg/kgと50 mg/kgの間にあると推定される。

緒言

2-sec-ブチル-4,6-ジニトロフェノール(CAS No.88-85-7)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 Guideline for Testing of Chemicals for Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method (Revised Guideline 423)に従って、2-sec-ブチル-4,6-ジニトロフェノールを雌ラットに1回経口投与して、その毒性について検討した。

方法

1. 被験物質及び媒体

被験物質の 2-sec-ブチル-4,6-ジニトロフェノール(CAS No.88-85-7)は、Fig.1 に示す化学構造を有し、分子量:240.22, 融点:41.0 °C, 黄色の塊, 溶融時, 黄色澄明液体であり, 水に不溶である。当試験には、

から購入したものをを用いた[製造元:

, Lot No.

, 純度:96.0%]。入手後は、試験施設の被験物質保管室の

保管庫に冷蔵(設定:4 °C, 実測値:1.4~7.8 °C)条件下で保管した。なお、反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験の投与期間終了後に当試験施設での保存分を除いた残余被験物質を

に送付し、分析した結果、純度は 96.3%であり、使用期間中の安定性が確認された。

媒体として、トウモロコシ油[以下, Corn oil, Lot No.V2P1660, ナカライテスク株式会社, 使用期限:2007年10月29日, 保管条件:室温(設定:23°C, 実測値:20.8~24.0 °C), 保管場所:被験物質保管室の保管庫]を用いた。

2. 投与検体及び濃度確認

2-sec-ブチル-4,6-ジニトロフェノールは、Corn oil で所定濃度となるように、溶解して調製した。なお、被験物質の調製に際して、純度による換算を実施した。

0.02, 1 及び 30 mg/mL の調製液は、冷蔵(2~10 °C)・遮光条件下で7日間保管後、さらに室温(15~30 °C)・遮光条件下で6時間保管しても安定性に問題のないことが確認されている¹⁾(Attachment 1)。投与検体は、用時調製とし、調製後6時間以内に使用した。残余投与検体は廃棄した。

投与に使用した投与検体中の被験物質濃度を試験施設内でHPLC法により測定した。その結果、被験物質濃度は表示濃度の91.4~104.9%であり、濃度に問題はなかった(Attachment 2-1~2-3)。

3. 使用動物及び飼育条件

3.1. 動物種及び系統

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る Crj : CD(SD)IGS 雌ラット(SPF)を用いた。動物は、日本チャールス・リバー株式会社(日野飼育センター)から7週齢で2003年8月27日(第1回試験用)、2003年9月17日(第2回試験用)及び2003年10月8日(第3回試験用)に各5匹を入手した。入手後1日の体重範囲は、178~192 gであった。

3.2. 検疫及び馴化、群分け法並びに個体識別法

入手した動物は、第1回試験、第2回試験及び第3回試験とも5日間の検疫期間及びその後2日間の馴化期間を設けた。この間に、体重測定を4回と一般状態の観察を毎日行って検疫・馴化とし、一般状態及び体重推移に異常の認められなかった動物を群分けして試験に用いた。

群分けは、第1回試験、第2回試験及び第3回試験とも投与日にコンピュータを用いて無作為抽出法により試験に用いる各3例に動物番号を割り当てた。群分け後の残余動物は、投与日にジエチルエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に廃棄処分した。

動物の個体識別は、検疫・馴化期間中は入手日に油性インクによる記入法及び油性インクによる色素塗布法を、群分け後は油性インクによる色素塗布法及び耳パンチ法を併用して行った。さらに、検疫・馴化期間中の各ケージには試験番号、入手年月日及び検疫・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、投与量及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。

3.3. 環境条件及び飼育管理

動物は、室温20~26℃(実測値:20~23℃)、湿度40~70%(実測値:40~68%)、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)に維持された飼育室(E棟4号室、ただし、検疫期間中はE棟7号室)で飼育した。

検疫・馴化期間中及び群分け後とも、ステンレス製五連ケージ(W:755×D:210×H:170 mm)を用いて個別飼育した。ケージの受け皿及び給水瓶の交換は1週間に2回以上、ケージ及び給餌器の交換は2週間に1回以上行った。なお、動物飼育室の清掃(床の掃き掃除)及び0.02%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。

3.4. 飼料及び飲料水

飼料は、製造後5ヵ月以内の固型飼料(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3~4時)から投与までの約18~19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。使用した飼料と同一ロットの飼料の分析結果は、財団法人日本食品分析センター及びオリエンタル酵母工業株式会社で実施した成績を入手した。

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6ヵ月ごとに東西

化学産業株式会社 東日本分析センターで実施した成績を入手した。

飼料及び飲料水の分析結果は、いずれも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，群構成及び投与量

4.1. 投与経路及び投与方法

2-sec-ブチル-4,6-ジニトロフェノールは、経口的に人に摂取される可能性が考えられるため、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ポリプロピレン製ディスプレイ注射筒(テルモ株式会社)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 03 分～10 時 14 分の間で、投与回数は 1 回とした。

投与日の週齢は 8 週齢であり、体重範囲は 178～190 g であった。

4.2. 群構成及び投与量

群構成は、下記のように設定し、各試験の動物数は、3 例とした。

<第 1 回試験>

試験群	投与量(濃度)	動物数(動物番号)
2-sec-ブチル-4,6-ジニトロフェノール	50 mg/kg(5 mg/mL)	3(F01151～F01153)

2-sec-ブチル-4,6-ジニトロフェノールのラット経口投与による LD₅₀値は 25 mg/kg との情報がある²⁾。従って、50 mg/kg を第 1 回試験の投与量とした。

<第 2 回試験>

試験群	投与量(濃度)	動物数(動物番号)
2-sec-ブチル-4,6-ジニトロフェノール	5 mg/kg(0.5 mg/mL)	3(F01251～F01253)

第 1 回試験の 50 mg/kg 投与で 3 例全例が死亡したため、5 mg/kg を第 2 回試験の投与量とした。

<第 3 回試験>

試験群	投与量(濃度)	動物数(動物番号)
2-sec-ブチル-4,6-ジニトロフェノール	5 mg/kg(0.5 mg/mL)	3(F01351～F01353)

第 2 回試験の 5 mg/kg 投与で死亡例が認められなかったため、5 mg/kg を第 3 回試験の投与量とした。

5. 観察及び検査項目

5.1. 観察期間

投与後 14 日間とした。

5.2. 一般状態

投与日は投与後 6 時間(投与直後～投与後 30 分, 投与後 2, 4 及び 6 時間)まで, 投与翌日からの観察期間中は 1 日 1 回, 一般状態及び死亡の有無を観察した。

5.3. 体重測定

投与日(投与直前)並びに投与後 1, 3, 7, 10 及び 14 日に測定した。

5.4. 剖検

死亡動物は, 速やかに剖検した。生存動物は, 観察期間終了時にジエチル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た。

6. 統計解析

LD₅₀ 値は概略の範囲を推定した。

体重は, 各群で平均値及び標準偏差を算出した。

結果

1. 死亡状況, LD₅₀ 値及び一般状態(Table 1~2, Appendix 1-1~1-3)

死亡例は, 第 1 回試験の 50 mg/kg 投与で投与後 4 時間に 1 例と投与後 1 日に 2 例の全例に認められた。第 2 回試験及び第 3 回試験の 5 mg/kg 投与では, 死亡例は認められなかった。2-sec-ブチル-4,6-ジニトロフェノールの LD₅₀ 値は, 5 mg/kg と 50 mg/kg の間にあると推定される。

一般状態において, 第 1 回試験の 50 mg/kg 投与で投与後 2 時間に腹臥, 緩徐呼吸及び下痢便が各 1 例, 投与後 4 時間に下痢便及び自発運動の低下が各 1 例, 投与後 6 時間に自発運動の低下が 2 例にみられた。第 2 回試験及び第 3 回試験の 5 mg/kg 群では, 異常はみられなかった。

2. 体重(Table 3, Appendix 2-1~2-3)

第 2 回試験及び第 3 回試験の 5 mg/kg 投与では, 体重は順調に推移した。

3. 剖検(Table 4, Appendix 3-1~3-3)

第 1 回試験の死亡例では, 50 mg/kg 投与で胃に検体様物質残留が 1 例にみられた。

第 2 回試験及び第 3 回試験の生存例では, 5 mg/kg 投与で異常はみられなかった。

考察

2-*sec*-ブチル-4,6-ジニトロフェノールの LD₅₀値は、5 mg/kg と 50 mg/kg の間にあると推定される。

2-*sec*-ブチル-4,6-ジニトロフェノールの 50 mg/kg 投与による死因は、投与後に腹臥、緩徐呼吸及び自発運動の低下がみられたことから呼吸障害と考えられる。

文献

- 1) 渡邊ゆかりほか:2-*sec*-ブチル-4,6-ジニトロフェノール調製液の安定性確認試験(試験番号: 401422P)(株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所)
- 2) ;, MSDS

Table 1 Mortality and LD₅₀ value of female rats in single dose oral toxicity test of phenol, 2-*sec*-butyl-4, 6-dinitro-

Group	mg/kg	Number of animals	Number of deaths																Total number of deaths	LD ₅₀ (mg/kg)		
			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
Test group1 phenol, 2- <i>sec</i> -butyl-4, 6-dinitro-	50	3	0	0	1	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	>5 and <50	
Test group2 phenol, 2- <i>sec</i> -butyl-4, 6-dinitro-	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
Test group3 phenol, 2- <i>sec</i> -butyl-4, 6-dinitro-	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0

Table 2 General signs of female rats in single dose oral toxicity test of phenol, 2-sec-butyl-4, 6-dinitro-

Group	mg/kg	Number of females and general signs	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	
Test group1 phenol, 2-sec-butyl-4, 6-dinitro-	50	Number of females	3	3	3	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Normal	3	1	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Prone position	0	1	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Bradypnea	0	1	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Diarrhea	0	1	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Decrease in locomotor activity	0	0	1	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Death	0	0	1	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Test group2 phenol, 2-sec-butyl-4, 6-dinitro-	5	Number of females	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
		Normal	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
Test group3 phenol, 2-sec-butyl-4, 6-dinitro-	5	Number of females	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
		Normal	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	

Table 3. Body weights of female rats in single dose oral toxicity test of phenol, 2-sec-butyl-4, 6-dinitro-

Group	Test group 1 phenol, 2-sec-butyl-4, 6-dinitro-	Test group 2 phenol, 2-sec-butyl-4, 6-dinitro-	Test group 3 phenol, 2-sec-butyl-4, 6-dinitro-
mg/kg	50	5	5
Number of females	3	3	3
Days after administration			
0	186 ± 4	184 ± 2	182 ± 4
1	-	199 ± 4	203 ± 5
3	-	202 ± 8	206 ± 7
7	-	219 ± 18	217 ± 11
10	-	221 ± 11	223 ± 8
14	-	230 ± 11	230 ± 9

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 4. Necropsy findings of female rats in single dose oral toxicity test of phenol, 2-*sec*-butyl-4, 6-dinitro-

Group	Test group 1 phenol, 2- <i>sec</i> -butyl-4, 6-dinitro-	Test group 2 phenol, 2- <i>sec</i> -butyl-4, 6-dinitro-	Test group 3 phenol, 2- <i>sec</i> -butyl-4, 6-dinitro-
mg/kg	50	5	5
Number of surviving females	0	3	3
Findings			
Normal	-	3	3
Number of dead females	3	0	0
Findings			
Normal	2	-	-
Stomach			
Residual test substance-like material	1	-	-

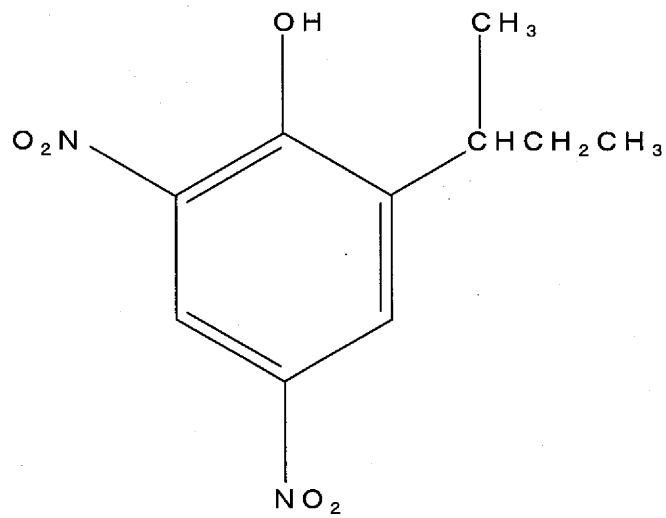


Fig. 1 Chemical structure of phenol, 2-*sec*-butyl-4, 6-dinitro-

Study No. 401422