食薬セ研第１１－１７３７号

２００１年　７月　５日

1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリオクチルのラットを用いる急性経口投与毒性試験

厚生省生活衛生局　委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

【目　　次】

要約 …… 1
緒言 …… 2
方法 …… 3
1．被験物質 …… 3
2．使用動物および飼育方法 …… 3
3．投与検体の調製 …… 4
4．投与量の設定および投与方法 …… 5
5．観察および検査 …… 5
1) 一般状態の観察 …… 5
2) 体重測定 …… 5
3) 病理学検査 …… 5
6．データ解析法 …… 6
結果 …… 7
1．死亡動物 …… 7
2．一般状態 …… 7
3．体重推移 …… 7
4．病理学検査 …… 7
考察 …… 8

Tables 1～5

【要　　約】

1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリオクチル（以下 BCTO と略記）の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD)IGS, SPF] ラットを用いる急性経口投与毒性試験を実施した。

雌雄各5匹に BCTO 2000 mg/kg を単回経口投与し、観察第1日（投与日）から14日間観察を行い、観察第15日に剖検した。なお、対照として媒体（コーン油）投与群を設けた。

雌雄ともに死亡例はみられなかった。また、一般状態観察、体重推移および剖検では BCTO 投与による影響は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下における BCTO の LD_{50} は、雌雄ともに 2000 mg/kg を上回ると判断された。

【緒　　言】

OECD 既存化学物質安全性点検等に係る毒性調査の一環として、1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリオクチルの安全性確認の資料を得るために、ラットを用いる急性経口投与毒性試験を実施したので、その結果を報告する。

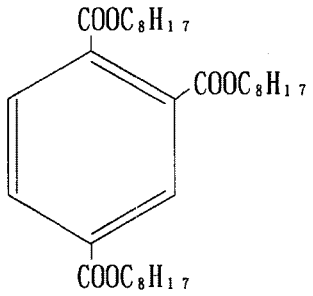
本試験は、OECD 化学物質試験法ガイドライン「[401] 急性経口毒性試験」（1987年2月24日採択）」および「化学物質 GLP」（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和63年11月18日改正、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に準拠して実施した。

【方　　法】

1．被験物質

被験物質として用いた1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリオクチル（以下 BCTO と略記）の性状は下記のとおりである。

化学名	1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリオクチル
別名	トリメリット酸トリ-n-オクチル
英名	1,2,4-benzenetricarboxylic acid,trioctyl ester
CAS No.	89-04-3
分子量	546.78
分子式	$C_{33}H_{54}O_6$
物理化学的性質	
性状	淡黄色透明液体
流動点	-50℃
構造式	



本試験には、　　より提供された純度 99wt%以上（不純物：主に異性体）の BCTO（ロット番号：　　）を用いた。受領した被験物質は、使用時まで被験物質受領保管室において、容器を完全密閉し、室温で保管した。使用した被験物質は、　　に返却し、再度品質試験を実施することにより、使用中の安定性を確認した（Appendix A）。

2．使用動物および飼育方法

4 週齢の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD)IGS, SPF] 雌雄ラットを、日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センターから購入し、飼育環境への馴化と検疫を兼ねて 7 日間予備飼育した。予備飼育中、雄の 1 例（入荷時仮番号：13）に眼瞼周囲暗赤色の汚れが一過性に認められたが、その他の動物に一般状態の異常はなかった。群分けは、検疫終了時（投与前日）の測定体重を基に、体重別層化無作為抽出法により行い、上記異常動物は群分け対象から除外した。投与開始時の週齢は、雌雄ともに 5 週齢であった（注：次頁）。

（注）動物入荷日：2000年3月22日
入荷時匹数：雄13匹、雌13匹
入荷時体重：雄 77.9～87.9g、雌 68.3～76.2g
投　与　日：2000年3月29日
投与時体重：雄 115.8～126.8g、雌 97.0～107.6g

全飼育期間を通じ、動物を金属製金網床ケージ（220w×270d×190h mm）に1匹ずつ収容し、基準温度22～25℃、基準湿度50～65%、換気回数約15回／時、照明12時間（7時～19時点灯）に制御された飼育室で、固型飼料（CE-2、日本クレア株式会社）および水道水（秦野市水道局給水）を自由に摂取させて飼育した。なお、飼育期間中、飼育室の温湿度の実測値は、それぞれ 23.0～24.0℃、47.5～65.5%で、湿度は基準値をわずかながらはずれる値を示したが、いずれも1時間以内の逸脱であり、試験への影響はないと判断した。それ以外は基準の範囲内にあった。また、供給した飼料および水には試験に支障を来す可能性のある混入物はなかった。

動物の個体識別は、各動物の尾にフェルトペンで雄から雌に一連の番号を付した。また、各飼育ケージには個体識別の補助として試験計画番号、投与量、性および動物番号を記入した動物カードを掛けた。

3．投与検体の調製

投与検体の調製においては、被験物質を正確に秤量し、コーン油（英名：corn oil、Lot No. V9F1299、ナカライテスク株式会社）に溶解して 20 w/v%溶液を調製し、投与時まで冷蔵、遮光下で気密容器に入れ保存し、調製2日後に使用した。

本試験に先立ち、被験物質の1および 25 w/v%調製検体の、冷蔵、遮光条件下における8日間の安定性を確認した（Appendix B）。また、投与検体中の被験物質の含量を測定し、規定範囲内にあることを確認した（Appendix C）。なお、本投与検体は溶液であることから、均一性試験は実施しなかった。

調製検体中の被験物質濃度の測定は、各濃度の調製検体を2mLずつ採取し、1-プロパノールで一定量とした後、適宜1-プロパノールで希釈し、高速液体クロマトグラフ（HPLC）により測定した。同時に作成する検量線（BCTO ： 12.5～50μg/mL）を用いて濃度を求めた。HPLC の条件を以下に示す。

分析カラム：Nucleosil 100-C8、4.6 mm i.d.×150 mm、粒子径 10 μm、
[ジーエルサイエンス㈱]
移動相　　：水／アセトニトリル（10:90）
流量　　：1.0 mL/min
カラム温度：40℃
検出波長　：235 nm
試料注入量：10 μL

4．投与量の設定および投与方法

本試験における投与量は、本試験に先立ち実施した予備試験（試験計画番号：A-99-058）の結果に基づいて決定した。予備試験では、BCTO の 1000 および 2000 mg/kg を雌雄各3匹のラットに単回投与し、1週間の観察を行った。その結果、雌雄ともに被験物質投与によると判断される毒性症状がみられず、体重も順調に増加したことから、雌雄とも OECD 化学物質試験法ガイドラインに定める限度試験を実施することとし、2000 mg/kgの1群および媒体（コーン油）投与群を設けた。

投与容量は体重1kg 当たり 10 mL とし、動物を投与前日の16時より絶食させた後、投与直前に測定した体重を基に投与液量を算出し、ラット用胃管を用いて強制的に単回経口投与した。投与は9時37分～9時51分の間に行い、給餌は投与後約3時間に行った。

各群の投与物質、投与量、濃度、投与容量および動物番号は次の通りである。

投与物質	投与量 (mg/kg)	濃度 (w/v%)	投与容量 (mL/kg)	動物番号	
				雄	雌
コーン油（対照群）	0	0	10	1～5	11～15
BCTO	2000	20	10	6～10	16～20

5．観察および検査

1）一般状態の観察

観察第1日（投与日）から14日間にわたって死亡の有無を確認し、各動物の一般状態を観察した。観察は投与日においては投与直後から1時間まで連続して行い、その後は投与後6時間まで約1時間間隔で実施した。観察第2日から15日までは毎日1回行った。

2）体重測定

体重は全例について、投与直前、観察第2、4、8、11および15日に測定した。

3）病理学検査

剖検は、観察第15日に全例をペントバルビタール・ナトリウム麻酔下で放血屠殺して実施した。剖検時に、脳、下垂体、眼球、甲状腺、心臓、気管、肺、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、消化管、生殖器、乳腺、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、大腿骨骨髄、膵臓、顎下腺、舌、食道、大動脈、ハーダー腺および皮膚の肉眼的観察を行った。これらのうち、各群の動物番号の若い例（動物番号：1、6、11、16）を1例ずつ、主要器官・組織（脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、消化管）を 0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶

液で固定した。なお、一般状態に異常がみられず、体重も順調に増加し、剖検においても異常所見がみられなかったことより、組織学検査は実施しなかった。

6．データ解析法

体重の測定値について、群ごとに平均値と標準偏差を求めた。ついで、F-検定を行い、等分散の場合は Student の t 検定を行い、不等分散の場合は Aspin-Welch の検定を行い、対照群と被験物質投与群との平均値の差を検定した。いずれの検定においても有意水準は5％とした。

【結　　果】

1．死亡動物

雌雄ともに、死亡例はなかった。

2．一般状態（Table 1、2）

観察第1日に粘液便の排泄あるいはそれに伴う肛門周囲の汚れが対照群および BCTO 投与群の雌雄各2～3例にみられたが、観察第2日以降に一般状態の異常は観察されなかった。

3．体重推移（Table 3、4）

BCTO 投与群は、雌雄とも対照群と同様の体重推移を示し、いずれの測定日とも有意差はみられなかった。

4．病理学検査（Table 5）

観察第15日に実施した剖検では、雌雄全例の器官・組織に肉眼的異常所見は認められなかった。

【考　　察】

BCTO の 2000 mg/kg を、5 週齢の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD)IGS, SPF] 雌雄ラットに単回強制経口投与し、BCTO の単回投与毒性を検討した。

死亡例は雌雄ともにみられなかった。

一般状態の観察において、粘液便の排泄あるいはそれに伴う肛門周囲の汚れが BCTO 投与群にみられたが、対照群でも観察されていることから、媒体であるコーン油投与によるものと考えられた。

体重推移および剖検では BCTO 投与による影響は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下における BCTO の LD_{50} は、雌雄ともに 2000 mg/kg を上回ると判断された。

Table 1 Clinical findings in male rats after single oral administration of BCTO

Dose (mg/kg)	Animal No.	Clinical findings	Hours after administration						Days of observation								
			0～1	2	3	4	5	6	2[a)]	3	4	5	6	7	8	9	10～15
0 (Corn oil)	1	No abnormality															
	2	No abnormality															
	3	No abnormality															
	4	Mucous feces	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	5	Mucous feces	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
2000	6	No abnormality															
	7	No abnormality															
	8	No abnormality															
	9	Mucous feces	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
		Perianal smudge	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	10	Mucous feces	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
		Perianal smudge	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

[a)], the next day of administration
+, positive; −, negative

Table 2 Clinical findings in female rats after single oral administration of BCTO

Dose (mg/kg)	Animal No.	Clinical findings	Hours after administration						Days of observation								
			0～1	2	3	4	5	6	2 [a)]	3	4	5	6	7	8	9	10～15
0 (Corn oil)	11	Mucous feces	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	12	No abnormality															
	13	Mucous feces	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
		Perianal smudge	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	14	No abnormality															
	15	No abnormality															
2000	16	Mucous feces	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
		Perianal smudge	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	17	Mucous feces	−	−	+	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	18	No abnormality															
	19	Mucous feces	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
		Perianal smudge	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	20	No abnormality															

[a)], the next day of administration
+, positive; −, negative

Table 3 Body weight changes in male rats after single oral administration of BCTO

Dose (mg/kg)	Animal No.	Days of observation					
		1 [a)]	2	4	8	11	15
0 (Corn oil)	1	118.1 [b)]	140.2	161.1	203.5	225.9	262.4
	2	121.9	144.2	168.4	208.7	232.9	273.9
	3	121.6	149.0	168.9	211.9	239.4	281.7
	4	121.3	142.2	164.0	207.6	235.0	276.1
	5	123.4	147.3	167.5	209.8	236.8	275.5
	Mean	121.3	144.6	166.0	208.3	234.0	273.9
	±S.D.	1.9	3.6	3.3	3.1	5.1	7.1
2000	6	125.4	148.3	165.4	206.6	230.7	268.1
	7	115.8	135.8	156.5	194.8	218.6	253.2
	8	122.2	147.0	167.9	212.4	241.2	284.1
	9	126.8	151.1	172.0	216.0	246.6	286.6
	10	121.7	138.3	163.6	202.7	225.0	262.8
	Mean	122.4	144.1	165.1	206.5	232.4	271.0
	±S.D.	4.3	6.7	5.7	8.3	11.5	14.2

[a)], the day of administration, [b)], g

Table 4 Body weight changes in female rats after single oral administration of BCTO

Dose (mg/kg)	Animal No.	Days of observation					
		1 [a)]	2	4	8	11	15
0 (Corn oil)	11	98.4 [b)]	115.1	132.4	154.9	164.7	183.8
	12	102.8	119.9	132.3	157.2	165.1	188.1
	13	105.0	125.8	141.8	165.0	176.2	192.6
	14	97.0	119.3	137.3	159.6	170.2	182.2
	15	104.3	122.8	141.5	164.7	174.4	188.7
	Mean	101.5	120.6	137.1	160.3	170.1	187.1
	±S.D.	3.6	4.0	4.7	4.5	5.2	4.1
2000	16	102.0	117.8	138.4	163.5	177.3	192.6
	17	99.1	114.0	133.0	156.3	165.2	177.7
	18	101.6	116.5	139.1	166.2	175.8	190.8
	19	107.6	126.0	140.4	158.3	165.0	181.8
	20	106.0	123.6	138.0	167.3	178.7	197.0
	Mean	103.3	119.6	137.8	162.3	172.4	188.0
	±S.D.	3.5	5.0	2.8	4.8	6.7	8.0

[a)], the day of administration, [b)], g

Table 5 Macroscopic findings in rats after single oral administration of BCTO

Sex	Dose (mg/kg)	Animal No.	Findings
Male	0 (Corn oil)	1	No abnormality
		2	No abnormality
		3	No abnormality
		4	No abnormality
		5	No abnormality
	2000	6	No abnormality
		7	No abnormality
		8	No abnormality
		9	No abnormality
		10	No abnormality
Female	0 (Corn oil)	11	No abnormality
		12	No abnormality
		13	No abnormality
		14	No abnormality
		15	No abnormality
	2000	16	No abnormality
		17	No abnormality
		18	No abnormality
		19	No abnormality
		20	No abnormality