最終報告書

表　　題：4, 4'-ビフェニルジオールのラットにおける急性経口投与毒性試験

試験番号：ＳＲ０２１１５

株式会社 化合物安全性研究所

目　次

頁

表紙 ---------- 1

目次 ---------- 5

要約 ---------- 9
緒言 ---------- 10
材料および方法 ---------- 10
成績および考察 ---------- 16

Figure

1 Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of 4,4'-Biphenyldiol (SR02115) ----------18

Tables

1 Mortality of female rats in acute oral toxicity test of 4,4'-Biphenyldiol (SR02115) ---------- 19
2 General appearance of female rats in acute oral toxicity test of 4,4'-Biphenyldiol (SR02115) ---------- 20
3 Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of 4,4'-Biphenyldiol (SR02115) ---------- 21
4 Autopsy findings of female rats in acute oral toxicity test of 4,4'-Biphenyldiol (SR02115) ---------- 22

要　約

4,4'-ビフェニルジオールの2000 mg/kgを1群につき各3匹のCrj:CD(SD)IGS雌ラットに単回経口投与してその毒性を検討し、以下の成績を得た。

一般状態では、2000 mg/kgの投与後1日に赤色尿が認められたが、投与後2日には回復した。

体重でも、投与後1日に体重増加抑制傾向が認められたが、投与後3日以降には変化が認められなかった。

剖検所見では、異常は認められなかった。

以上のことより、4,4'-ビフェニルジオールの2000 mg/kgを投与後、赤色尿および体重増加抑制傾向がみられたが、投与後2日以降には異常は認められず、死亡例も認められなかった。

したがって、4,4'-ビフェニルジオールはOECD試験法ガイドライン(423)のAnnex 2dよりGHS(Globally Harmonized Classification System)のCategory 5(>2000-5000 mg/kg)であると結論された。

緒　言

4,4'-ビフェニルジオールの 2000 mg/kg を 1 群につき各 3 匹の Crj:CD(SD)IGS 雌ラットに単回経口投与してその毒性を検討した。

材料および方法

1. 被験物質

被験物質は 4,4'-ビフェニルジオールであり、CAS 番号は 92-88-6、化学式は $C_{12}H_{10}O_2$、分子量は 186.21 である。本試験では、　　より提供された純度 99.96wt%のロット番号　　を使用した。

4,4'-ビフェニルジオールは融点 281～284℃、沸点 300℃／13.3kPa(100 mmHg)、引火点 281.5℃(0.C)、発火点 638℃以上、嵩密度は 500 kg/m^3 等の物理化学的性状を示す白色結晶である(Appendix 1-1～1-4)。4,4'-ビフェニルジオールは室温で安定であることから、受入後は室温(実測範囲 19～26℃)に保存し、吸入、皮膚との接触、着衣への付着等に注意し、ゴム手袋およびマスク等を着用して、クリーンベンチ内で取り扱った。

2. 媒体

4,4'-ビフェニルジオールの溶解性は、水に難溶、DMSO に 5 wt%以上、メタノール・アセトン等の溶剤に易溶である。このことから、本試験における媒体として、0.5(w/v)%カルメロースナトリウム水溶液(0.5%CMC-Na)を選択した。0.5%CMC-Na は、カルメロースナトリウム(日本薬局方カルメロースナトリウム、ロット番号 1526、丸石製薬株式会社)を精秤し、精製水(日本薬局方精製水、ロット番号 2XN1、ヤクハン製薬株式会社) で 0.5(w/v)%となるように溶解した。

3. 投与液の調製および化学分析

(1) 投与液の調製

被験物質を乳鉢で細砕後、精秤し、所定の濃度となるように媒体を用いて懸濁し、スターラーを用いて分散させた。調製は投与毎に用時に2回行った。調整後は遮光気密容器に入れ、そのまま投与に用いた。

(2) 調製液の安定性

200 mg/mL 調製液について調製液中での均一性および室温保存 24 時間の安定性を確認した。

その結果、変動係数は5%以内であり、均一と判断した。また、室温保存 24 時間後の濃度を分析し、初期値に対する残存率が 102.0%であることから安定であると判断した。

以上の分析は株式会社 化合物安全性研究所において実施した(Appendix 2-1、2-2)。

(3) 調製液の濃度確認

投与に用いた 200 mg/mL 調製液について、濃度を分析し、含有率が 102.7%であることから、投与液の調製法は的確であったと判断した。分析は株式会社 化合物安全性研究所において実施した(Appendix 2-3)。

(4) 濃度分析方法

1) 標準溶液(以下の割合で調製)

4,4'-ビフェニルジオールの 20 mg を正確に量り、アセトニトリル(和光純薬工業株式会社)を加えて正確に 10 mL とした後、約 1 分間の超音波処理を行った。この液を正確に 1 mL 採取し、アセトニトリルを加えて 20 mL とした(標準溶液)。調製は 1 回、注入は 3 回行った。

2) 移動相(以下の割合で調製)

アセトニトリル 300 mL に蒸留水(和光純薬工業株式会社)700 mL を加え、十分に混合したものを移動相とした。調製後は室温に保存し、4 週間以内に使用した(調製日を 0 日として起算)。

3) オートサンプラ洗浄液(以下の割合で調製)

アセトニトリル 80 mL に蒸留水 20 mL を加え、十分に混合したものをオートサンプラ洗浄液とした。調製後は室温に保存し、4 週間以内に使用した。

4) 試料溶液

被験物質調製液を採取し、被験物質の濃度が 2000 μg/mL 以下となるようにアセトニトリルを加えた後、約 1 分間超音波処理を行った。この液の一定量を採取し、被験物質の最終濃度が 100 μg/mL 付近となるようにアセトニトリルを加えたものを試料溶液とした。濃度確認試験および安定性試験は調製液の中層から 3 回、均一性試験は上層、中層および下層付近から各 3 回の計 9 回採取し、それぞれ試料溶液を調製した。試料溶液は HPLC に各 1 回注入した。

5) HPLC 条件

カラム　：L-column ODS(4.6 mm I.D. ×250 mm、財団法人 化学物質評価研究機構)

移動相　：アセトニトリル/蒸留水 (300:700)

測定波長　：264 nm

カラム温度　：40 ℃

流量　：1 mL/min

注入量　：10 μL

オートサンプラ温度　：10 ℃

分析時間　：15 分

オートサンプラ洗浄液　：アセトニトリル/蒸留水 (80:20)

6) 使用機器

UV Detector	L-4000	株式会社 日立製作所
Intelligent Pump	L-6200	株式会社 日立製作所
Column Oven	655A-52	株式会社 日立製作所
Autosampler	AS-2000	株式会社 日立製作所
Degasser	ERC-3315α	株式会社 イーアールシー
Chromato-Integrator	D-2500	株式会社 日立製作所
電子式上皿天秤	ER-182A	株式会社 エー・アンド・デイ
卓上型超音波洗浄器	B42JH	日本エマソン株式会社

7) 計算

標準溶液のピーク面積と濃度から、以下の式より調製液中の被験物質濃度、変動係数、含有率および残存率を求めた。

調製液の被験物質濃度(mg/mL)＝(試料溶液のピーク面積/標準溶液のピーク面積平均値)×標準溶液濃度(μg/mL)×希釈係数/1000

変動係数(%)＝(被験物質濃度標準偏差/被験物質濃度平均値)×100

含有率(%)＝(調製液の被験物質濃度/調製液の表示濃度)×100

残存率(%)＝(保存後の被験物質濃度平均値/調製日の被験物質濃度平均値)×100

8) 数値の表示

①調製液の被験物質濃度は四捨五入して有効数字 3 桁に丸めた。

②含有率、残存率および変動係数は四捨五入して小数点以下第 1 位に丸めた。

9) 判定基準

①濃度確認試験：含有率が 90～110%の場合を適とした。

②安定性試験：残存率が 90～110%の場合を適とした。

③均一性試験：変動係数が 5%以下を適とした。

4. 試験方法

(1) 試験系

試験には、日本チャールス・リバー株式会社生産の SPF Crj:CD(SD)IGS 雌ラットを用いた。ラットはこの種の試験で通常用いられている動物種であり、当研究所での使用経験が豊富であることからこの系統を選定した。

2003 年 5 月 7 日に第 1、2 群用として 8 週齢、第 3、4 群用として 7 週齢の雌ラット各 8 匹を同時に購入した。受入時の動物の体重範囲は、7 週齢で 163～182 g、8 週齢で 178～195 g であり、微生物学的モニタリングでも問題がないことを確認した。

(2) 検疫および馴化

受入後、個々の動物について第 1 群の動物は 6 日間、第 2 群の動物は 9 日間、第 3、4 群の動物は 14 日間の検疫および馴化期間を設け、それぞれの一般状態を 1 日 1 回観察した。さらに、受入時および投与前日の群分け時に体重測定を行った。なお、受入時 7 週齢の動物については、馴化 8 および 13 日にも体重測定を行った。検疫および馴化期間中、動物に異常はみられなかった。

(3) 群分け

馴化期間の差による体重増加を考慮し、投与前日の体重に基づいて、各群の平均体重が均一になるように体重の高い個体を優先して、1 群あたり 3 匹、計 6 匹を馴化期間の短い順に選抜した。これらの動物の体重範囲は、224～238 g であり、最終的な全使用動物の平均体重(229.8 g)の±20%以内であった。第 1、2 群用の動物で選抜から外れた雌ラット 2 匹と第 3、4 群用の雌ラット 8 匹は試験から除外して、安楽死とした。

(4) 動物およびケージの識別

動物は、油性フェルトペンで尾部に印を付け、個体識別を行った。

飼育ケージについては、各ケージの前面に、群分け前は試験番号および入荷時の動物番号を、群分け後は試験番号、試験群および動物番号を、ラベルに明記して標示した。

(5) 動物飼育

1) 飼育環境

動物を温度 22±3℃(実測範囲 21～24℃)、湿度 50±20%(実測範囲 48～61%)、換気回数 10～15 回／時間、照明時間 12 時間(人工照明、8:00～20:00)の動物飼育室(310 号室)で飼育した。動物飼育室の温度および湿度を毎日監視し、異常のないことを確認した。

2) 飼育器材および飼育方法

ブラケット式金属製金網床ケージ(260W×380D×180H, mm)に、検疫および馴化期間中は2匹、群分け後は1匹収容した。ケージおよび給餌器は群分け時に1回、受皿は週2回洗浄滅菌済みのものと交換した。自動給水装置の水抜きは週1回実施した。動物飼育室内の清掃および清拭消毒は、1日1回の頻度で実施した。清拭消毒に際しては、塩素系消毒薬およびヨウ素系消毒薬を1週間単位で交互に使用した。

3) 飼料

オリエンタル酵母工業株式会社製γ線照射固型飼料、CRF-1 を金属製給餌器により自由摂取させた。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質あるいは微生物の有無を、使用したロット(030306)の飼料について分析した。汚染物質の分析は財団法人日本食品分析センターにおいて、微生物検査は飼料製造業者がそれぞれ行った。分析項目と許容値は(株)化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容値を超える値は認められなかった(Appendix 3-1、3-2)。

4) 飲料水

札幌市水道水を、自動給水装置を用いて自由に摂取させた。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質の有無を、2003年4月17日に試料を採取して分析した。分析は日本衛生株式会社において行った。分析項目と許容値は(株)化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容値を超える値は認められなかった(Appendix 4)。

(6) 試験群の構成

試験群の構成と各群の動物番号を以下に示す。

試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	動物数(動物番号) 雌
第1群	2000	200	3 (151～153)
第2群	2000	200	3 (251～253)

(7) 被験物質の投与

1) 投与量の設定

製品安全データシートのラットにおける LD_{50} 値が 4920 mg/kg であるとの記載を参考として、本試験では 2000 mg/kg を第1群の投与用量に設定した。投与後3日までに死亡例がみられなかったため、第2群にも再度 2000 mg/kg を設定した。第2群においても第1群と同様に死亡例がみられなかったこと、また、製品安全データシートの LD_{50} 値に関する記載が 4920 mg/kg と 5000 mg/kg 未満であることから、5000 mg/kg の投与群は設定しなかった。

2) 投与

OECD 試験法ガイドラインに従って、一晩(16～18 時間)の絶食後、胃ゾンデを用いて強制的に胃内に経口投与した。給餌の再開は投与後4時間とした。9:30 から 10:30 の間に、10 mL/kg の投与容量で、各個体毎に投与日の体重に基づいて算出した投与液量を投与した。

(8) 観察、測定および検査項目

1) 一般状態観察

全例について動物の生死、外観、行動等を、投与日(0日)の投与直後から投与後1時間までは連続して観察し、以降は投与後2および4時間に観察した。投与後1日から投与後14日までは、1日1回観察した。

2) 体重測定

全例について動物の体重を、0(投与日の投与前)、投与1、3、5、7、10 および 14 日後に、電子式上皿天秤(LIBROR ED-2000M；株式会社島津製作所)を用いて測定し、1g単位で記録した。

3) 剖検

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

5. 統計学的方法

体重、体重増加量および増加率の成績について平均値および標準偏差を算出した。

成績および考察

1. 死亡状況および死亡率

死亡状況および死亡率を Table 1 に示す。

2000 mg/kg の投与後に、第 1 および 2 群のいずれにも、死亡例は認められなかった。

2. 一般状態

一般状態の成績を Table 2、INDIVIDUAL DATA 1 に示す。

2000 mg/kg の投与後に、第 1 および 2 群のいずれにも、投与後 1 日に全例(6 例)で赤色尿が認められたが、投与後 2 日には回復し、以降異常は認められなかった。

3. 体重

体重推移を Figure 1、Table 3、INDIVIDUAL DATA 2 に示す。

2000 mg/kg の投与後に、第 1 および 2 群のいずれにも、投与後 1 日に軽度な体重増加抑制傾向がみられたが、投与後 3 日以降には順調な体重増加が認められた。

4. 剖検

剖検所見を Table 4、INDIVIDUAL DATA 3 に示す。

2000 mg/kg を投与した第 1 および 2 群のいずれにも、剖検所見で異常は認められなかった。

以上のことから、4,4'-ビフェニルジオールの 2000 mg/kg を投与後、赤色尿および体重増加抑制傾向がみられたが、投与後 2 日以降に異常は認められず、死亡例も認められなかった。

したがって、4,4'-ビフェニルジオールは OECD 試験法ガイドライン(423)の Annex 2d より GHS(Globally Harmonized Classification System)の Category 5(>2000-5000 mg/kg)であると結論された。

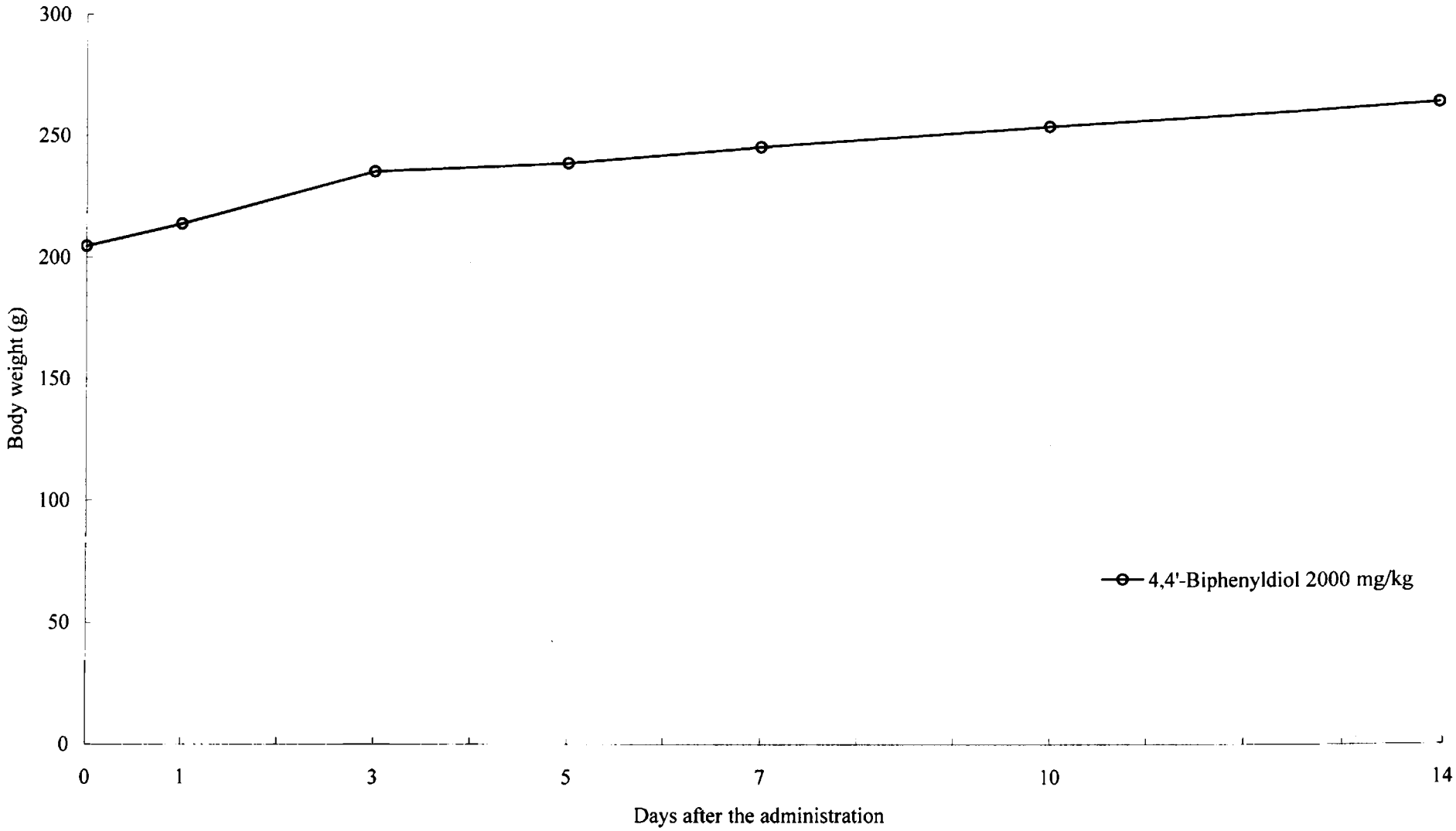

Figure 1 Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of 4,4'-Biphenyldiol (SR02115)

Table 1 Mortality of female rats in acute oral toxicity test of 4,4'-Biphenyldiol (SR02115)

Group	Number of dead animals						Mortality	GHS
	Hours after the administration					Days after the administration		
	0	0.5	1	2	4	1 - 14		
4,4'-Biphenyldiol 2000 mg/kg	0	0	0	0	0	0	0 / 6	Category 5 > 2000-5000 mg/kg

Mortality : Number of dead animals / number of animals dosed.
GHS : Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures.

Table 2 General appearance of female rats in acute oral toxicity test of 4,4'-Biphenyldiol (SR02115)

Group Findings	Hours after the administration					Days after the administration	
	0	0.5	1	2	4	1	2 - 14
4,4'-Biphenyldiol 2000 mg/kg							
Number of animals examined	6	6	6	6	6	6	6
No abnormal findings	6	6	6	6	6	0	6
Reddish urine	0	0	0	0	0	6	0

Values are number of animals with findings.

Table 3 Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of 4,4'-Biphenyldiol (SR02115)

Group	Number of animals	Body weight (g) on day after the administration							Body weight gain 1-14	
		0	1	3	5	7	10	14	(g)	(%)
4,4'-Biphenyldiol 2000 mg/kg	6	204.7	213.7	235.3	238.8	245.5	253.8	263.7	59.0	28.820
		4.1	7.2	7.3	6.8	10.8	10.0	10.1	8.2	3.927

Table 4 Autopsy findings of female rats in acute oral toxicity test of 4,4'-Biphenyldiol (SR02115)

Findings	Group	4,4'-Biphenyldiol 2000mg/kg
Number of animals		6
No abnormal findings		6

Values are number of animals with findings.