２，４－ジクロロトルエンのラットにおける急性経口毒性試験報告書

株式会社化合物安全性研究所

目　次

頁

要　　約 ---------- 3
緒　　言 ---------- 4
材料及び方法 ---------- 4
成　　績 ---------- 7
考　　察 ---------- 9
試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因 ---------- 10
参 考 文 献 ---------- 10

Figures and tables ---------- 別添

要　約

2,4-ジクロロトルエン（CAS No.95738）の 500，1000及び 2000mg/kgを５週齢の Crj:CD（SD）系雌雄ラットに経口単回投与し、その毒性を試験し、以下の知見が得られた。

１．死亡例は、雌雄ともに認められず、LD_{50}値は 2000mg/kg 以上と推察された。

２．一般状態観察では、CAS No.95738 投与群の雌雄で投与後 20分後より自発運動の減少、よろめき歩行が認められた。これらの症状は高用量群ほど長く持続する傾向があり、重症の例では腹臥あるいは横臥の状態を呈した。2000mg/kg 群では、他に外尿道口周囲や肛門周囲の被毛汚染、軟便が認められた。

３．体重推移では、1000mg/kg 以上の群において、雄で投与後に体重の増加抑制が、雌で投与後１日目体重に有意な低値が認められた。

４．剖検及び病理組織学的検査では、雌雄ともに CAS No.95738 投与による影響は認められなかった。

緒　　言

2,4-ジクロロトルエン（CAS No.95738）をラットに経口単回投与し、死亡状況、一般状態などを観察し、その毒性を試験したので、その成績を報告する。

なお、本試験は「OECD優良試験所指針C（81）30最終別添2」に従い、試験方法はOECDテストガイドラインに準拠した。

材料及び方法

1．被験物質

被験物質は、　　より提供された 2,4-ジクロロトルエン（以下、CAS No.95738 と称す。Lot番号：　，純度：98.96%）である。被験物質は、無色透明の液体（比重 1.25）であり、室温、遮光下で保存した。なお、被験物質の品質は、1992年1月まで保証されており、原液をそのまま使用した。

2．試験動物

生後4週齢の Crj:CD（SD）系の SPF ラットを、1991年8月7日に（雄：26匹，体重範囲 78～87g、雌：26匹，体重範囲 69～79g）、日本チャールス・リバー株式会社より受け入れ、7日間の馴化飼育を行った。馴化期間中、一般状態観察を1日1回、体重測定を2回実施し、順調な発育を示した動物を試験に用いた。

3．飼育環境条件

動物の飼育は、温度 23±3℃、湿度 55±10%、換気回数 10～15回／時間及び照明時間 12時間（午前8時から午後8時まで点灯）に設定されたバリアシステムの飼育室（135号室）において、ブラケット式金属製金網床ケージ（260W×380D×180H,mm）を用いて行った。ケージ当たりの収容匹数は、群分け前は5匹以内、群分け後は3匹以内とした。ケージの交換は群分け時に1回の頻度で行った。

飼育室内の清掃は1日2回、床の清拭消毒は1日1回の頻度で行った。なお、消毒には塩素系消毒薬（ヤクラックス，ヤクハン製薬株式会社）及びヨウ素系消毒薬（ダイヤザン，旭硝子株式会社）を1週間単位で交互に使用した。

飼料は固型飼料（CRF-1、オリエンタル酵母工業株式会社）を金属製給餌器を用いて、飲料水は水道水（札幌市水道水）を自動給水装置を用いて、それぞれ自由に摂取させた。給餌器の交換は群分け時に１回、自動給水装置の水抜きは週１回の頻度で実施した。

飼料の分析及び検査は財団法人日本食品分析センターで実施（分析試験成績書：第 44070488-001号）し、各混入物質について当社 SOP の許容範囲内であることを確認した。飲料水の水質検査は株式会社福田水文センターで実施（水質検査結果書：第03521及び 03529号）し、当社 SOPの水質基準の範囲内であることを確認した。

４．試験群の設定、群分け及び個体識別

本試験の投与量設定のために実施した限界試験では、CAS No.95738の2000、1000及び500mg/kg群、日本薬局方精製水を投与する対照群の計４群を設定し、１群当たり雌雄各５匹のラットに投与した。投与後５日間の観察において、雌雄ともに 2000mg/kg投与により死亡が認められなかったため、限界試験の観察期間を投与後14日目まで延長し、本試験の成績とした（Table 1）。

動物数は、１群当たり雌雄各５匹とした。群分けは、馴化飼育の最終日（投与前日）に各群の体重が均一になるように体重別層化無作為抽出法により行った。

動物の識別は、群分け時に油性フェルトペンを用いて尾部に行った。ケージには性別毎に色分けしたカードに試験番号、試験群及び動物番号を明記して標示した。

５．投与経路及び投与方法

投与経路は、被験物質が人体に経口的に暴露される可能性があることから、経口投与とした。投与は、16～21時間絶食させ、胃ゾンデを用いて強制的に胃内に１回行った。投与容量は、被験物質が原液として規定の用量となるように体重1kg当たり 0.4、0.8及び 1.6mlとして投与日に測定した体重に基づいて算出した。

投与時の週齢は雌雄ともに５週齢で、その平均体重（体重範囲）は雄で 118.8g（114～123g)、雌で 100.1g（97～104g）であった。投与時刻は午前９時から午後２時の間とした。

６．観察、測定及び検査項目

(1) 一般状態観察

全例について、投与日は投与後６時間までは頻繁に、投与後１日目以降は１日１回以上の頻度で投与後 14日目まで観察した。

(2) 体重測定

全例について、投与日を０日目と起算し、０、１、３、５、７、10及び14日目に電子天秤（ザルトリウス 1401BMP7-2, 1407MP8-1、カールツァイス株式会社）を用いて測定した。

(3) 剖検

全生存例について投与後14日目に、体外表を観察した後、エーテル麻酔下で放血致死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。また、次の器官・組織を10％中性緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。

肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸及び異常所見部位

(4) 病理組織学的検査

雌雄各群２例の固定・保存した器官・組織について、また、2000mg/kg群の雄１例の異常所見部位（脾臓）について、パラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色あるいは特殊染色（鍍銀）標本を作製し、鏡検した。

７．統計処理

死亡率を算出した。

体重値について、Bartlettの検定法によって分散を検定した。その結果、等分散（$p>0.05$）を示した項目については一元配置分散分析法によって解析し、有意な場合（$p<0.10$）、Dunnettの検定法により対照群と CAS No.95738投与群との比較を行った。一方、不等分散（$p<0.05$）を示した項目については Kruskal-Wallis 法により解析し、有意な場合（$p<0.10$）、Mann-Whitney のU-検定法により対照群と CAS No.95738 投与群との比較を行った。なお、対照群との検定については、危険率５％以下を統計学的に有意とした。

成　　績

1．死亡状況及びLD_{50}値

死亡状況及びLD_{50}値を Table 2に示した。

雌雄ともに、いずれの群においても死亡は認められず、LD_{50}値は 2000mg/kg以上と推察された。

2．一般状態観察

一般状態観察の成績を Table 3、INDIVIDUAL DATA 1-1-1～1-2-8に示した。

雄では、500mg/kg 群で、投与約 20分後より自発運動の減少及びよろめき歩行が全例、流涎及び腹臥が各1例に認められたが、約5時間以降に症状は認められなかった。1000 mg/kg群では、投与約 40 分後より自発運動の減少及びよろめき歩行が全例、腹臥が1例に認められ、約6時間後においても自発運動の減少（2例）及びよろめき歩行（全例）が認められた。投与後1日目以降に症状は認められなかった。2000mg/kg 群では、投与約20分後より自発運動の減少、よろめき歩行及び腹臥が全例、流涎が1例に、約4時間後より横臥（全例）が認められ、約10時間後においても腹臥（2例）及び横臥（3例）が認められた。投与後1日目には自発運動の減少及びよろめき歩行が全例、肛門周囲の被毛汚染が全例、軟便が1例、外尿道口周囲の被毛汚染が1例に認められた。投与後2日目以降に症状は認められなかった。

雌では、500 及び 1000mg/kg群で、出現時間に若干相違はあるものの、雄と同様な症状が認められた。2000mg/kg群では、投与約 25分後より、自発運動の減少及びよろめき歩行が全例、流涎が1例に、約1時間後より腹臥あるいは横臥が全例に認められ、約9時間後においても腹臥（4例）及び横臥（1例）が認められた。投与後1日目には、自発運動の減少及びよろめき歩行が全例、外尿道口周囲の被毛汚染が4例、肛門周囲の被毛汚染が1例に認められた。投与後2日目以降に症状は認められなかった。

3．体重推移

体重推移を Figure1，2、Table 4，5、INDIVIDUAL DATA 2-1-1～2-2-4に示した。

雄では、CAS No.95738投与群で投与後に用量依存的な体重増加抑制傾向が認められ、1000mg/kg群で投与後3及び5日目に、2000mg/kg群で投与後1～14日目に有意な差が認められた。

雌では、1000及び2000mg/kg 群で投与後1日目の体重に有意な低値が認められたが、

その後は対照群とほぼ同じ推移を示した。なお、1000mg/kg群で投与後５及び 10日目の体重に有意な差がみられたが、用量依存的な変動ではなかった。

４．剖検

剖検の成績を Table ６、INDIVIDUAL DATA 3-1-1～3-2-4に示した。

雄では、脾臓の白色腫瘤が 2000mg/kg群で１例に認められた。その他に異常は認められなかった。

雌では、いずれの群においても異常は認められなかった。

５．病理組織学的検査

病理組織学的検査の成績を Table ７、INDIVIDUAL DATA ４に示した。

雄では、腎臓（右）に限局性の尿細管上皮の再生が 500mg/kg 群で検査をした２例中１例に認められた。また、2000mg/kg 群の１例でみられた脾臓の白色腫瘤に対応して限局性のリンパろ胞の増生が認められた。その他に異常は認められなかった。

雌では、いずれの群においても異常は認められなかった。

考　　察

CAS No.95738の 500、1000及び 2000mg/kg を５週齢の Crj:CD (SD) 系雌雄ラットに経口単回投与し、その毒性を試験した。

死亡例は、雌雄ともにいずれの群においても認められず、LD_{50}値は 2000mg/kg以上と推察された。

症状では、雌雄ともに投与後約 20 分より、自発運動の減少、よろめき歩行が認められた。これらの症状は、500mg/kg以上の群で認められ、高用量群ほど長く持続する傾向があり、重症の例では腹臥あるいは横臥の状態を呈した。CAS No.95738の基本骨格であるトルエンは、中枢に対して抑制的に働くこと[1]から、CAS No.95738も同様に中枢に対して作用するものと考えられた。しかし、以上の症状はいずれの群についても投与後２日目までに消失した。他に外尿道口周囲や肛門周囲の被毛汚染、軟便が 2000mg/kg群でみられ、腹臥あるいは横臥状態が持続したこと、あるいは大量投与による影響と考えられた。なお、肛門周囲被毛汚染及び軟便のみられた例については、投与後 14 日目の病理学的検査では消化管に異常は認められなかった。また、500 及び 2000mg/kg群では、流涎が少数例に認められた。これは、口腔に被験物質が付着したために出現したことが考えられた。

体重推移では、1000mg/kg 以上の群において、雄で投与後に体重の増加抑制が、雌で投与後１日目体重に有意な低値がみられ、CAS No.95738単回投与による影響が認められた。

病理組織学的検査では、500 あるいは 2000mg/kg群の雄各１例で腎臓に尿細管上皮の再生、脾臓にリンパろ胞の増生が認められた。これらの所見は、いずれも限局性に認められ、また、前者については背景データにおいても 5.6%の頻度で認められる変化であり、後者については対応する剖検所見（白色腫瘤）が CAS No.95738 の 500mg/kgを 14日間反復投与した場合（SR-9122）に認められないことから、CAS No.95738 投与との関連はないものと考えられた。

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因は認められなかった。

参考文献

1）北川晴雄ら（1982）．毒性学，p.195．株式会社　南江堂．第1刷発行．

Figures

Figure 1. Body weight changes of male rats in the acute oral toxicity study of CAS No.95738

Figure 2. Body weight changes of female rats in the acute oral toxicity study of CAS No.95738

Tables

Table 1. Experimental design for the acute oral toxicity study of CAS No.95738 in rats

Table 2. Mortality and LD_{50} values of rats in the acute oral toxicity study of CAS No.95738

Table 3. General appearance of rats in the acute oral toxicity study of CAS No.95738

Table 4. Body weight changes of male rats in the acute oral toxicity study of CAS No.95738

Table 5. Body weight changes of female rats in the acute oral toxicity study of CAS No.95738

Table 6. Gross findings of rats in the acute oral toxicity study of CAS No.95738

Table 7. Histopathological findings of rats in the acute oral toxicity study of CAS No.95738

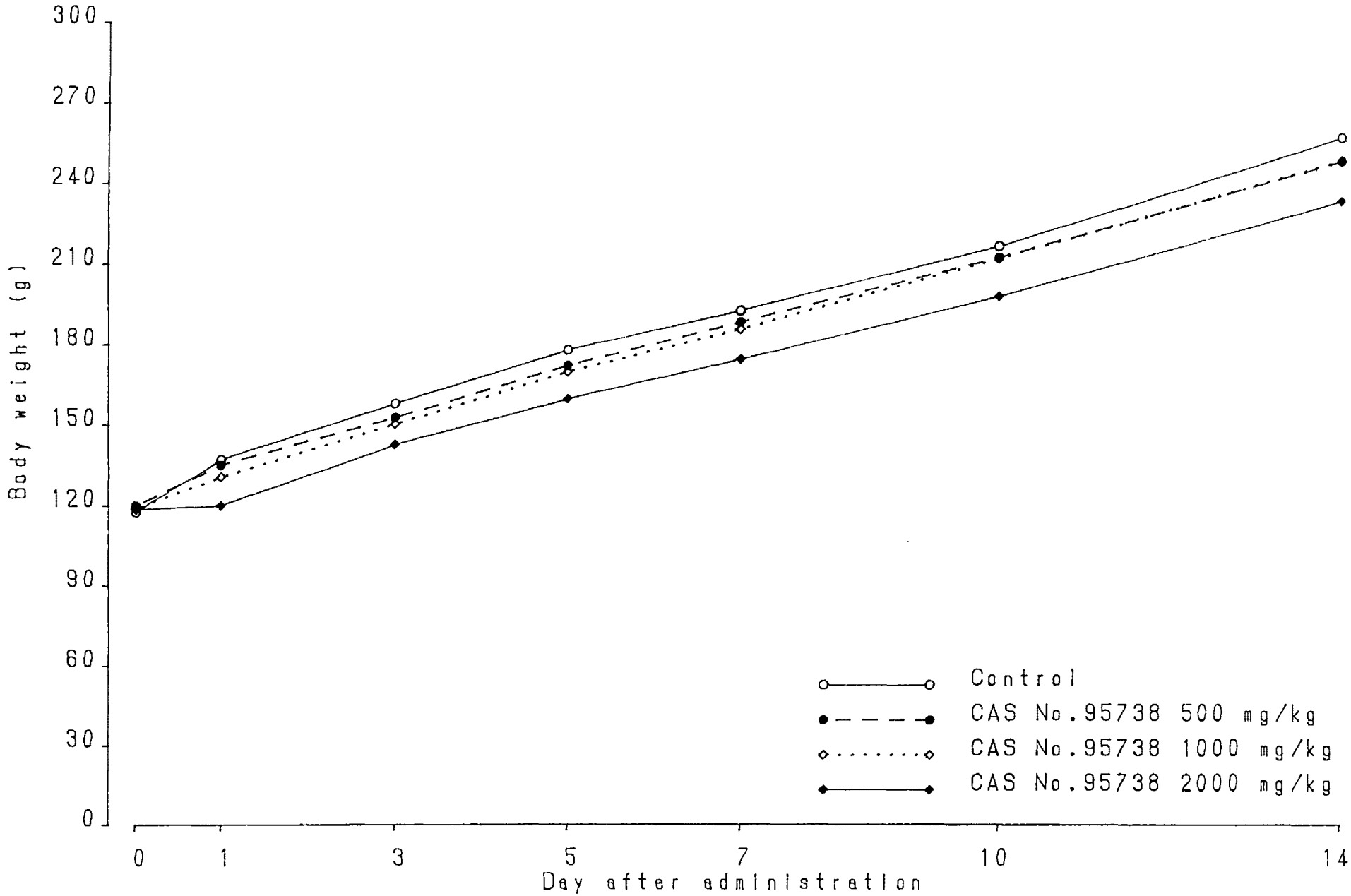

Figure 1. Body weight changes of male rats in the acute oral toxicity study of CAS No.95738

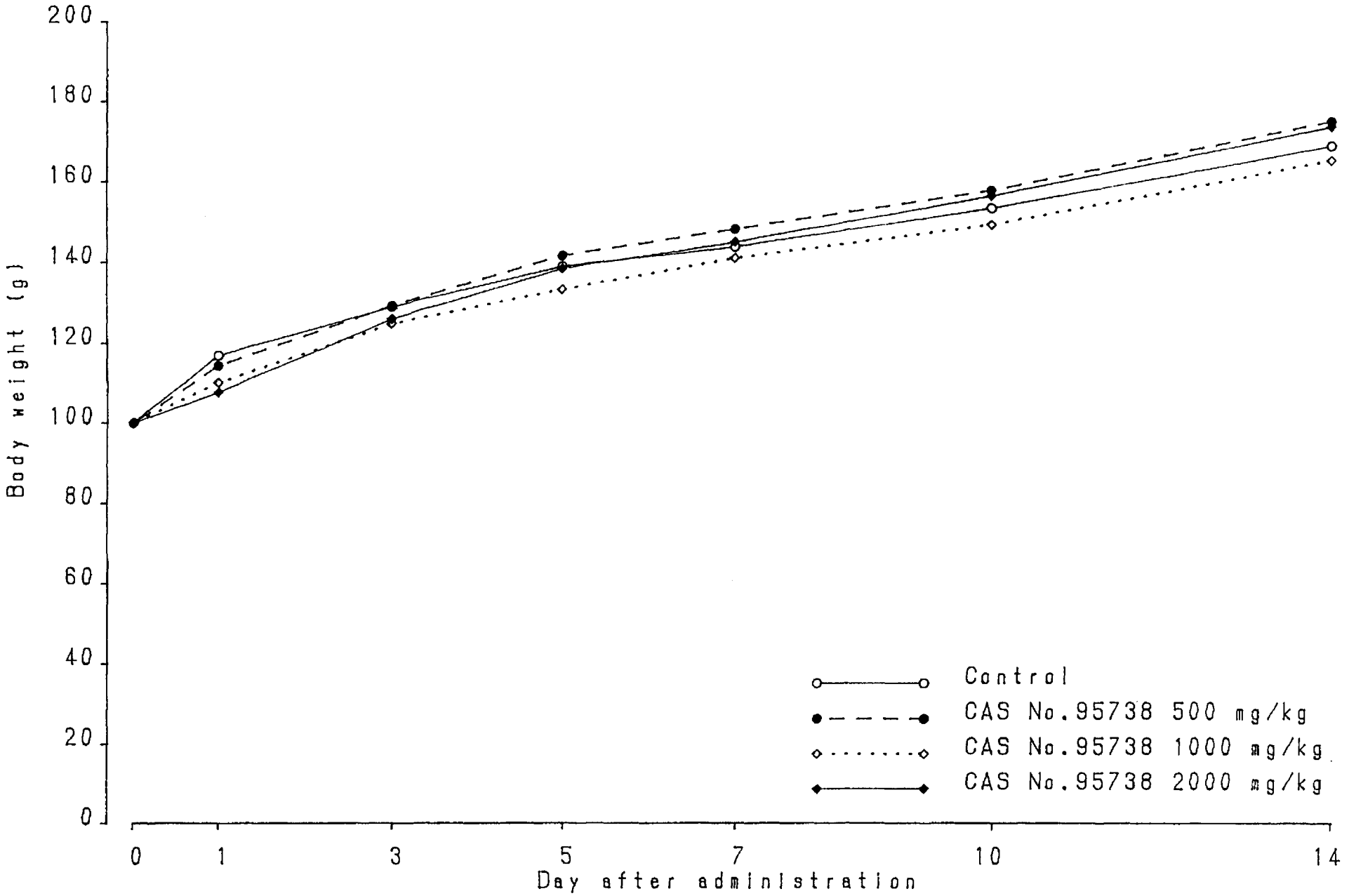

Figure 2. Body weight changes of female rats in the acute oral toxicity study of CAS No.95738

Table 1. Experimental design for the acute oral toxicity study of CAS No.95738 in rats

Sex	Group	Concentration of CAS No.95738 (w/v %)	Volume (ml/kg)	No. of animals[a]
Male	Control[b]	-	1.6	5
	CAS No.95738 500 mg/kg	100	0.4	5
	CAS No.95738 1000 mg/kg	100	0.8	5
	CAS No.95738 2000 mg/kg	100	1.6	5
Female	Control	-	1.6	5
	CAS No.95738 500 mg/kg	100	0.4	5
	CAS No.95738 1000 mg/kg	100	0.8	5
	CAS No.95738 2000 mg/kg	100	1.6	5

a: Crj:CD(SD) rats were dosed orally at the age of 5 weeks.
b: Control was purified water.

Table 2. Mortality and LD_{50} values of rats in the acute oral toxicity study of CAS No.95738

Sex	Group	Distribution of dead animals				
		0	1	2-14 [a]	Mortality [b]	LD_{50} value (mg/kg)
Male	Control	0	0	0	0/5	>2000
	CAS No.95738 500 mg/kg	0	0	0	0/5	
	CAS No.95738 1000 mg/kg	0	0	0	0/5	
	CAS No.95738 2000 mg/kg	0	0	0	0/5	
Female	Control	0	0	0	0/5	>2000
	CAS No.95738 500 mg/kg	0	0	0	0/5	
	CAS No.95738 1000 mg/kg	0	0	0	0/5	
	CAS No.95738 2000 mg/kg	0	0	0	0/5	

a: Day after administration.
b: No. of dead animals / no. of animals dosed.

Table 3. General appearance of rats in the acute oral toxicity study of CAS No.95738

Item	Male				Female			
		CAS No.95738 (mg/kg)				CAS No.95738 (mg/kg)		
	Control	500	1000	2000	Control	500	1000	2000
No. of animals examined	5	5	5	5	5	5	5	5
	a							
Decrease in spontaneous activity	0	5	5	5	0	5	5	5
Prone position	0	1	3	5	0	1	3	5
Lateral position	0	0	0	5	0	0	0	4
Salivation	0	1	0	1	0	1	0	1
Staggering gait	0	5	5	5	0	5	5	5
Soft feces	0	0	0	1	0	0	0	0
Soiling of perigenital hair	0	0	0	1	0	0	0	4
Soiling of perianal hair	0	0	0	5	0	0	0	0

a: Values are no. of animals with findings.

Tbale 4. Body weight changes of male rats in the acute oral toxicity study of CAS No.95738

Group	No. of animals	Day after administration						
		0	1	3	5	7	10	14
Control	5	a 117.6 2.6	137.0 4.1	157.8 4.5	177.8 4.5	192.4 5.9	216.4 3.6	256.8 4.0
CAS No.95738 500 mg/kg	5	120.0 1.6	135.0 4.5	152.6 3.5	172.0 4.7	188.2 5.4	212.2 5.8	248.0 6.7
CAS No.95738 1000 mg/kg	5	119.0 2.4	130.6 4.0	150.2* 3.6	169.6* 4.7	185.6 4.8	211.8 7.4	248.4 11.6
CAS No.95738 2000 mg/kg	5	118.6 2.7	120.0** 5.5	142.6** 4.8	159.6** 3.9	174.4** 4.7	197.8** 5.4	233.2** 3.6

a: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram.
*: Differs from control, $p<0.05$.
**: Differs from control, $p<0.01$.

Tbale 5. Body weight changes of female rats in the acute oral toxicity study of CAS No.95738

Group	No. of animals	Day after administration 0	1	3	5	7	10	14
Control	5	100.2[a] 2.3	117.0 3.5	129.0 4.1	139.0 4.6	143.8 4.1	153.4 3.6	168.8 4.5
CAS No.95738 500 mg/kg	5	100.0 2.6	114.4 4.3	129.2 4.1	141.6 6.8	148.2 5.8	157.8 8.2	175.0 9.9
CAS No.95738 1000 mg/kg	5	100.2 1.6	110.2* 2.2	124.8 2.5	133.2* 1.6	141.0 2.2	149.2* 0.8	165.2 3.6
CAS No.95738 2000 mg/kg	5	100.0 0.7	107.8** 3.8	126.0 2.1	138.4 1.9	145.0 2.9	156.4 3.4	173.6 4.3

a: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram.
*: Differs from control, $p<0.05$.
**: Differs from control, $p<0.01$.

Table 6. Gross findings of rats in the acute oral toxicity study of CAS No.95738 granule

	Male				Female			
		CAS No.95738 (mg/kg)				CAS No.95738 (mg/kg)		
Item	Control	500	1000	2000	Control	500	1000	2000
No. of animals examined	5	5	5	5	5	5	5	5
Spleen : White mass	0[a]	0	0	1	0	0	0	0

a: Values are no. of animals with findings.

Table 7. Histopathological findings of rats in the acute oral toxicity study of CAS No.95738

Item	Grade[a]	Male				Female			
			CAS No.95738 (mg/kg)				CAS No.95738 (mg/kg)		
		Control	500	1000	2000	Control	500	1000	2000
No. of animals examined		2	2	2	3	2	2	2	2
		[b]			[c]				
Liver : Abnormal findings		0	0	0	0(2)	0	0	0	0
Kidney (right) : Focal regeneration of tubular epithelium	+	0	1	0	0(2)	0	0	0	0
Kidney (left) : Abnormal findings		0	0	0	0(2)	0	0	0	0
Spleen : Focal follicular hyperplasia	+	0	0	0	1	0	0	0	0
Heart : Abnormal findings		0	0	0	0(2)	0	0	0	0
Lung : Abnormal findings		0	0	0	0(2)	0	0	0	0
Cerebrum : Abnormal findings		0	0	0	0(2)	0	0	0	0
Cerebellum : Abnormal findings		0	0	0	0(2)	0	0	0	0
Fore stomach : Abnormal findings		0	0	0	0(2)	0	0	0	0
Glandular stomach : Abnormal findings		0	0	0	0(2)	0	0	0	0
Duodenum : Abnormal findings		0	0	0	0(2)	0	0	0	0
Jejunum : Abnormal findings		0	0	0	0(2)	0	0	0	0
Ileum : Abnormal findings		0	0	0	0(2)	0	0	0	0
Cecum : Abnormal findings		0	0	0	0(2)	0	0	0	0
Colon : Abnormal findings		0	0	0	0(2)	0	0	0	0
Rectum : Abnormal findings		0	0	0	0(2)	0	0	0	0

a: + = slight change.
b: Values are no. of animals with findings.
c: Values in parentheses are no. of animals examined.