

最終報告書

4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)のラットを用いる 単回経口投与毒性試験

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室 委託

試験施設

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所

〒257-8523 神奈川県秦野市落合 729-5

TEL 0463-82-4751

目次

要約.....	5
材料と方法.....	6
1. 被験物質.....	6
2. 使用動物と飼育方法.....	6
3. 投与検体の調製.....	7
4. 投与方法.....	8
5. 観察と検査.....	9
6. データの解析.....	9
試験成績と結論.....	9
1. 死亡と一般状態.....	9
2. 体重.....	10
3. 病理学検査.....	10
4. 結論.....	10
Tables.....	11

(最終ページ:17 ページ)

要約

4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)の単回経口投与時の概略の致死量を知るために、単回経口投与毒性試験を OECD 化学物質試験法ガイドラインに従って実施した。観察は投与日を観察第 1 日として観察第 15 日まで行った。被験物質を 2000 mg/kg の用量で合計 6 例の雌ラットに投与した結果、観察期間中に死亡は認められなかった。一般状態の観察では、投与日に自発運動量の低下、閉眼、水様性下痢あるいは軟便、下腹部の汚れが観察された。観察第 2 日には軟便、自発運動量の低下が、観察第 3 日には軟便がそれぞれ観察された。観察第 4 日以降、一般状態に異常は認められなかった。また、体重推移にも被験物質投与による影響は認められなかった。観察第 15 日の剖検時には、被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった。

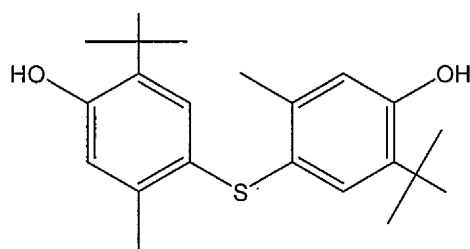
以上の結果から、4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)の単回経口投与時の毒性は、2000 mg/kg の投与により一般状態に異常は認められるものの死に至る変化ではなかったことから、GHS (Globally Harmonised Classification System) の毒性分類はクラス 5 または分類該当せず、LD₅₀ 区切り値(LD₅₀cut-off 値)は∞と判断された。

本試験における動物実験計画は、秦野研究所動物実験委員会の審査を受け、承認されている(動物実験承認番号: 1090275A)。なお、承認された動物実験計画からの変更はなかった。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質である 4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)(別名: 5-tert-butyl-4-hydroxy-2-methylphenyl sulfide、CAS No.: 96-69-5、分子式: $C_{22}H_{30}O_2S$ 、分子量: 358.54、外観: 白色、結晶性粉末、純度: 99.4%、融点: 162.3°C、Annex A)は (被験物質入手: 2009 年 9 月 25 日)、使用時まで室温・遮光下(実測値 16.5~24.4°C)にて保管した。4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)の構造式を以下に示す。



被験物質の安定性については、投与開始前(2009 年 11 月 13 日)および投与終了後(2009 年 12 月 21 日)に、臭化カリウム錠剤を作製後、フーリエ変換赤外分光高度計算(FTIR-8300、島津製作所)を用いて 4000 cm^{-1} ~ 400 cm^{-1} の範囲で赤外吸収スペクトルを測定し、スペクトルに変化がないことを確認した(Annex B)。

2. 使用動物と飼育方法

7 週齢の Sprague-Dawley 系 [CrI:CD(SD)、SPF] 雌ラット(日本チャールス・リバー、厚木飼育センター) 18 匹を購入し、7 号室に搬入した。入荷日も含め 7 日間、検疫と飼育環境への馴化を兼ねて飼育し、その間、毎日 1 回、動物の一般状態を観察し、入荷日および検疫終了時に体重を測定した。検疫期間中は動物の尾に油性フェルトペンで馴化番号を記し、飼育ケージに試験番号および馴化番号を記入した動物カードを掛けて識別した。入荷日および検疫終了日(群分け日)の体重は下記のとおりであった。

動物入荷日	2009 年 11 月 18 日	156.1~175.5 g
検疫終了日	2009 年 11 月 24 日	198.9~230.7 g

検疫・馴化期間中に、試験の実施に影響を及ぼすと判断される異常が認められた動物は存在しなかったため、体重の上位 1 匹および下位 2 匹を除外して、体重別層化無作為抽出法により各群 3 匹からなる 5 群に群分けした。群分けした動物には一連の動物番号を割り当て、フェルトペンで尾に動物番号を標識した。また、動物カードに試験番号、動物番号、投与量および投与年月日を記入し、飼育ケージに掛けた。

なお、試験に使用しなかった動物および投与を行わなかった動物(計 12 匹)は、同じ飼育室で飼育し、動物飼育期間終了時に深麻酔後、放血し安楽死させた。

動物は、全飼育期間を通じて、許容範囲:21.0~25°C、許容湿度:40.0~75.0%、換気設定:約 15 回/時間、明暗サイクル:12 時間(7 時~19 時)点灯、12 時間(19 時~7 時)消灯に設定された飼育室内で、金属製金網床ケージ(220^W × 270^D × 190^H mm)に 1 匹ずつ収容し、固型飼料(CE-2、日本クリア)と水道水(秦野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した。但し、投与前日の 16 時以降、および投与後約 3 時間までは絶食した。飼育期間中、飼育環境に異常は認められず、動物室の温度の実測値は 21.5~24.0°C、湿度の実測値は 44.5~63.5%であった。また、供給した飼料および飲料水の分析結果は、いずれも標準操作手順書に記載の許容範囲内であることを確認した。

3. 投与検体の調製

1) 調製

被験物質を秤量し、媒体である 5%アラビアゴム水溶液[アラビアゴム、和光純薬工業(製造番号 CDP6207)を注射用水(光製薬、製造番号 A89AA1)で溶解]を加えて懸濁させ、20.0 w/v%液を調製した。さらに、20.0 w/v%液を媒体で段階希釈して 3.00 ならびに 0.500 w/v%を調製した。調製した検体は冷蔵・遮光下で保管し(実測値 2~6°C)、調製後 7 日以内に使用した。

2) 安定性試験

投与に先立ち、秦野研究所で濃度 0.0500 および 20.0 w/v%の調製検体の冷蔵・遮光下(実測値 2~4°C)での調製後 3 および 8 日間の安定性試験を実施した(開始日:2009 年 11 月 17 日、3 日目:2009 年 11 月 20 日、8 日目:2009 年 11 月 25 日)。調製直後および各保管期間経過後の平均含量がそれぞれの調製濃度の 88.1~96.6%、また、各測定値のばらつきがそれぞれ平均値の 97.2~103%であり、かつ、調製直後の測定平均値に対する各保管期間後の測定値比の平均が 96.4 であった(Annex C)。これらの値は、試験計画書に記載した判定基準の範囲内(調製直後および各保管期間経過後の平均含量:それぞれの調製濃度の 85.0~115%、各測定値のばらつき:それぞれ平均値の 90.0~110%、調製直後の測定平均値に対する各保管期間後の測定値比の平均:90.0%以上)であった。

3) 含量および均一性試験

初回調製時(2009 年 11 月 24 日)に、0.500、3.00 および 20.0 w/v%の濃度の調製検体の含量および均一性を測定した。その結果、平均含量が調製濃度の 89.2~91.9%、各測定値のばらつきは各測定値が平均値の 97.9~103%であった(Annex D)。これらの値は、試験計画書に記載した判定基準の範囲内(平均含量:調製濃度の 85.0~115%、各測定値のばらつき:平均値の 90.0~110%)であった。

調製検体中の被験物質濃度は以下の方法で測定した。調製検体の 1 mL を採取し、メタノールで希釈し、試料溶液を調製した(1 µg/mL 付近)。別に、被験物質約 10 mg を精密に量り、メタノールに溶解して約 0.5、1 および 4 µg/mL の標準溶液を調製した。試料溶液および標準溶液を、以下に示す高速液体クロマトグラフ(HPLC)法により測定し、得られた 4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)のピーク面積から、標準溶液のピーク面積から作成した検量線を用いて調製検体中の 4,4'-チオビス(6-tert-ブチ

ル-m-クレゾール)濃度を算出した。

HPLC 条件

分析カラム	Inertsil ODS-2 (内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm、ジーエルサイエンス)
移動相	アセトニトリル/水混液(4:1 v/v)
流量	1.0 mL/min
カラム設定温度	40℃
試料設定温度	室温
測定波長	250 nm
試料注入量	10 μL
オートインジェクタ洗浄液	アセトニトリル/水混液(4:1 v/v)

4. 投与方法

投与方法は「OECD 化学物質試験法ガイドライン[423]」に拠り、ラット用胃管による強制経口投与とした。

本試験の投与量は、既報の 4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)のラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験(http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/home/paper/paper96-69-5b.html)の予備試験の結果を参考に設定した。すなわち、5、60、250 および 1000 mg/kg の 4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)を SD 系ラットに 2 週間、反復経口投与した結果、1000 mg/kg 投与群で死亡例が認められ、250 mg/kg 投与群では AST および ALP の上昇、血糖値の低下、盲腸の拡張が認められている。予備試験に使用した動物の性比、死亡動物数および死亡時期は記載されていないが、1000 mg/kg の単回投与により、動物の生体への著しい影響が発現することが示唆される。一方、Registry of Toxic Effects of Chemical Substances® (RTECS, 2009)によると(RTECS Number GP3150000)、ラットの経口投与による LD₅₀ は 2345 mg/kg である。以上のことから、本被験物質の単回投与による致死に至る投与量は高用量であると推定した。そこで、OECD 化学物質試験法ガイドライン[423](急性経口毒性試験—急性毒性クラス法)に従い、2000 mg/kg を投与開始時投与量に選択した。

動物は投与前日の 16 時以降から絶食させた。投与直前に測定した体重を基に個体別に投与液量を算出し、4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)を投与した。投与は第 1 段階(動物番号 F01001～F01003)を 2009 年 11 月 25 日、11 時 12 分～11 時 14 分間に 2000 mg/kg の用量で行った。第 1 段階で死亡動物が認められなかったことより、ガイドラインに従い第 2 段階(動物番号 F02004～F02006)は 2000 mg/kg の用量で、12 月 1 日、9 時 16 分～9 時 18 分間に投与した。いずれの投与段階も給餌は投与後約 3 時間から行った。各投与段階における投与量と投与容量は以下の通りである。なお、第 2 段階の投与においても、動物の死亡は認められなかったことから、第 3 段階以降の投与は行わなかった。

投与段階	投与量 (mg/kg)	濃度 (w/v%)	投与容量 (mL/kg)	動物番号
1	2000	20	10	F01001～F01003
2	2000	20	10	F02004～F02006

また、投与日の体重範囲は、使用した動物の平均体重の 80～120%以内であった。

投与日(第1段階) 2009年11月25日 185.7～192.1 g

投与日(第2段階) 2009年12月1日 205.0～215.4 g

5. 観察と検査

投与日を観察第1日として第15日まで毎日、動物の一般状態の観察をした。投与日の一般状態の観察は投与前に一度、投与後は1時間にわたり継続的に、その後は約1時間毎に投与後6時間まで全例について行った。観察第2日以降は毎日1回の頻度で観察した。体重は、投与日、観察第2、5、8、11および15日に測定した。観察第15日にはペントバルビタール麻酔下でいずれの動物も放血致死させて剖検し、器官・組織の肉眼的観察を実施した。また、各投与段階の動物番号の最も若い1例(動物番号F01001 および F02004)の主要器官・組織〔脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、消化管(胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸および直腸)〕を0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定保存した。これらの動物については、剖検時に異常が認められなかったため組織学検査は実施しなかった。

6. データの解析

体重について、平均値および標準偏差を算出した。

試験成績と結論

1. 死亡と一般状態(Table 1)

14日間の観察期間中に死亡例は認められなかった。

自発運動量の低下が、投与後約1時間にわたる継続的な観察(投与後1時間)および投与後2時間の観察において計5例(各観察時は2～3例)に認められ、このうち2例では閉眼が投与後1時間の観察時に認められた。また、一部白色を呈した水様性下痢便あるいは軟便が、投与後2時間以降に観察された。これらの症状は、投与後2時間から6時間までの各観察時に3～5例の動物に認められた。6例全例がいずれかの観察時期に水様性下痢便あるいは軟便を呈し、さらに下腹部の汚れが投与5時間以降

に計 2 例(各観察時は 1~2 例)の動物で認められた。観察第 2 日には 5 例に軟便が認められ、このうち 3 例に自発運動量の低下が観察された。観察第 3 日には 2 例で軟便がみられたが、観察第 4 日以降には回復し、観察最終日(観察第 15 日)まで一般状態に異常は認められなかった。

2. 体重(Table 2)

1 例(動物番号 F01003)の観察第 8 日の体重が前回の測定時と比較してわずかに減少していたが、一般状態にも異常はなく、観察第 1 日から第 15 日までの体重増加は他の動物と比較して顕著な違いはなかった。その他の 5 例の体重は順調な増加を示した。

3. 病理学検査(Table 3)

被験物質投与の影響と考えられる異常所見は認められなかった。

4. 結論

4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)の 2000 mg/kg の投与により、死亡動物は認められなかった。投与日に、自発運動量の低下、閉眼、水様性下痢あるいは軟便、下腹部の汚れが認められ、自発運動の低下は観察第 2 日まで、軟便は観察第 3 日まで観察された。しかし、観察第 4 日以降は一般状態に異常は観察されず、体重推移にも被験物質投与による影響は認められず順調に増加した。また、剖検の結果にも異常は認められなかった。以上の結果から、2000 mg/kg の 4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)の単回経口投与により、一般状態にも異常は認められたが死亡が認められなかったことから、GHS (Globally Harmonized Classification System) の毒性分類では、クラス 5 または分類該当せず、LD₅₀ 区切り値(LD₅₀cut-off値)は∞と判断された。

Table 1

Single dose toxicity study of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-3-methylphenol) by oral administration in rats

Clinical observation of females

Dose (mg/kg)	Step	Animal Number	Hours after administration						Days of observation															
			1	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
2000	Step 1	F01001	c,e	b	-	a	-	b	b,c	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		F01002	c,e	b*	a	-	a	a,d	b,c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		F01003	c	a	a	-	-	a	b,c	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Step 2	F02004	-	c	b*	b	-	-	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		F02005	-	c	a	a	a,d	a,d	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		F02006	-	a	a	a	a	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	No. of animals observed abnormal signs			3	6	5	4	3	5	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	a : Excretion, Watery diarrhea, partially whitish			0	2	4	3	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	b : Excretion, Loose stool			0	2	1	1	0	1	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
c : Behavior, Decrease in locomotor activity			3	2	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
d : Anorectal region, Soiled perineal region			0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
e : Eye, Eyeball, Bulbi, Globe, Lid closure			2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

*, Partially whitish

-, General appearance, no abnormality

Table 2

Single dose toxicity study of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-3-methylphenol) by oral administration in rats

Body weight changes (g) of females

Dose (mg/kg)	Step	Animal Number	Days of observation					
			1	2	5	8	11	15
2000	Step1	F01001	189.4	196.0	221.6	225.4	240.4	249.1
		F01002	192.1	196.6	226.5	231.8	232.8	248.2
		F01003	185.7	192.8	227.6	216.6	237.9	243.4
	Step2	F02004	205.0	213.5	236.9	241.6	258.1	268.4
		F02005	215.4	223.7	248.5	252.9	265.8	278.7
		F02006	208.0	217.8	235.9	249.6	259.2	270.0
		Mean	199.3	206.7	232.8	236.3	249.0	259.6
		± S.D.	11.9	13.2	9.6	14.2	13.6	14.5
		N	6	6	6	6	6	6

Table 3

Single dose toxicity study of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-3-methylphenol) by oral administration in rats

Macroscopic findings of females

Step 1 (2000 mg/kg)

Female No.	Findings
F01001	All organs No abnormality
F01002	All organs No abnormality
F01003	All organs No abnormality

Step 2 (2000 mg/kg)

Female No.	Findings
F02004	All organs No abnormality
F02005	All organs No abnormality
F02006	All organs No abnormality