

《血中濃度測定及び肝薬物代謝酵素活性測定試験》

投与期間中の一般状態及び体重にHDBB投与によると考えられる影響は観察されなかった。投与終了後には、2.5 mg/kg 投与群の雄及び12.5 mg/kg 投与群の雌雄において、絶対及び相対肝重量の増加が認められた。

血漿中HDBB濃度測定

初回投与後の血漿中HDBB濃度は、雄では、投与5～7時間後に最高値(0.5 mg/kg 投与群: 0.145 µg/mL、2.5 mg/kg 投与群: 0.484 µg/mL、12.5 mg/kg 投与群: 2.85 µg/mL)に達したが、投与24時間後には3分の1から12分の1のレベル(それぞれ0.0550 µg/mL、0.0416 µg/mL、0.372 µg/mL)にまで低下した(Fig. 2)。投与28日目においても、初回投与後と同等の血漿中HDBBプロファイルが認められた。

雌においても、雄と同様の血漿中HDBBプロファイルが観察された(Fig. 2)。0.5 mg/kg、2.5 mg/kg および12.5 mg/kg 投与群の初回投与後の最高血漿中HDBB濃度は、それぞれ0.116 µg/mL、0.573 µg/mL および3.84 µg/mL であり、反復投与による影響はみられなかった。

血漿中HDBB代謝物の検索

雌雄ともに、いずれの投与群においても、未変化体の検出限界(0.02 µg/mL)を超える濃度の代謝物は確認できなかった。

肝薬物代謝酵素活性測定 (Table 2)

雄では、2.5 mg/kg 以上の投与群で総P450量の増加、アミノピリン *N*-脱メチル化活性、テストステロン 2 α -及びテストステロン 16 α 水酸化活性の低下がみられた。さらに、すべての投与群でラウリン酸 12-水酸化活性の増加及びEROD活性の低下が認められた。肝ミクロソームの蛋白量、ECOD活性およびテストステロン 6 β 水酸化活性に変化は見られなかった。

雌では、12.5 mg/kg 投与群において、ラウリン酸 12-水酸化活性の増加がみられたが、その他にHDBB投与による影響は認められなかった。

《代謝安定性試験 (Table 3)》

雄ラットの肝ミクロソームを用いてNADPH存在下でHDBBを反応させた後の未変化体のピーク面積は26721(平均値)であった。NADPH非存在下で反応させた時のピーク面積は35572であり、未変化体の残存率は73.4%であった。雌ラットの肝ミクロソームを用いた試験では、NADPH存在下および非存在下で反応させた後の未変化体のピーク面積はそれぞれ26869及び28648であり、未変化体の残存率は76.1%であった。雌雄いずれの肝ミクロソームと反応させた後にも、HDBB以外のピークが検出されたが、検出量に性差は見られなかった。

雄ラットのS-9を用いてNADPH存在下及び非存在下でHDBBを反応させた後の未変化体のピーク面積はそれぞれ33996及び38000であった。未変化体の残存率は98.1%であった。雌ラットのS-9を用いた試験では、NADPH存在下及び非存在下で反応させた後の未変化体のピーク面積はそれぞれ33663及び35364であり、未変化体の残存率は91.4%であった。雌雄いずれのS-9と反応させた後にも、HDBB以外のピークが検出され、雄よりも雌で多く検出された。

《CYP分子種特定試験》

コントロールミクロソームのみとインキュベーションした後のHDBBのピーク面積を基に算出したHDBBの残存率をTable 4に示す。残存率が、85%以下まで減少した分子種は、CYP1A1、CYP1A2、CYP2C6、CYP2C11及びCYP2D2であった。いずれの分子種でも未変化体以外のピークが複数検出された。HDBBの残存率の変化はわずかであったものの、CYP2A2、3A1及び3A2と反応させた際にも、未変化体以外のピークが複数検出された。一方、CYP2A1、2B1、2C12、2C13、2D1及び2E1に関しては未変化体以外にピークが検出されなかった。

D. 考察

昨年度までに、我々は若齢ラットに28日間HDBBを強制経口投与した結果、主として肝臓へ

の影響が観察され、この HDBB の毒性影響に対しては、雄ラットは雌ラットと比較しておよそ 25 倍高い感受性を示すことを明らかにした。本年度は、去勢ラットへの 28 日間投与を行ったところ、雄ではすべての投与群で、雌では 2.5 mg/kg 以上の投与群で肝臓の病理組織学的変化が観察された。雄の 0.5 mg/kg 投与群で観察された病理組織学所見は、雌の 2.5 mg/kg 投与群で観察された所見と比較して軽度であったことから、去勢ラットで認められた性差は 5.0 未満であったとすることができる。この結果は、HDBB の毒性にみられる性差は、去勢により顕著に軽減したことを示しており、HDBB の毒性発現には内分泌学的性差が関与していることが示唆された。昨年度実施した離乳ラットを用いた反復投与試験（出生後 4～21 日に投与）では、性差は認められなかったことを考慮すると、去勢ラットで認められた軽度な性差には、去勢を実施した 4 週齢以前の性ホルモン暴露が関与していると推測される。

若齢ラットを用いた反復投与試験では、肝臓への影響に加え、心臓への影響、貧血、体重増加抑制などいずれの影響に対しても、雄ラットが高い感受性を示したことから、HDBB 毒性の性差の要因として、HDBB もしくはその代謝物の血中濃度の違いが推測された。しかし、若齢ラットに HDBB を投与し、血中 HDBB 濃度を測定した結果、性差は認められなかった。ラット肝ミクロソーム及び S-9 を用いた代謝物安定試験においては、特に肝ミクロソームと反応させた際に、代謝が認められたが、HDBB 代謝能に性差は認められなかった。

HDBB を投与した若齢ラットにおいて、ラウリン酸 12-水酸化活性 (CYP4A) の増加がみられたことから、HDBB の毒性発現にはペルオキシソーム誘導剤応答性受容体 (PPAR) α を介したメカニズムが関与している可能性が示唆された。CYP4A 誘導剤による肝肥大は、雌より雄で顕著であるとの報告がある (Sparatore et al., 2006) ことから、この作用が HDBB 毒性の性差の一つの要因となっているのかもしれない。その他に、雄のみでアミノピリン N-脱メチル化活性 (複数の CYP が関与)、EROD 活性 (CYP1A)、テストステロン 2 α -及び 16 α 水酸

化活性 (CYP2C11) の低下が認められ、特に CYP2C11 活性には顕著な影響が認められている。CYP2C11 は、幼若ラットでは発現が見られず、4～5 週齢から雄ラットのみで急激に発現が増加することが報告されている (Waxman and Chang, 2005)。さらに、性ホルモンによって発現が変化することも知られていることから、CYP2C11 活性の低下が HDBB の毒性に見られる性差の発現に寄与している可能性も考えられる。

E. 結論

HDBB を用いて毒性発現の週齢差および性差のメカニズムについて検討した。HDBB 毒性の性差は去勢により顕著に減少したことから、HDBB の毒性発現には内分泌学的性差が関与していることが示唆された。HDBB を投与した若齢ラットでは、血中 HDBB 濃度に性差はみられなかったが、肝臓のラウリン酸 12-水酸化活性の増加がみられ、顕著な性差が認められた。さらに、成熟雄ラットに特異的な CYP2C11 活性の低下がみられており、HDBB 毒性の週齢差及び性差の発現に何らかの関連性がある可能性が示唆された。

F. 研究発表

論文発表

Ena M, Fukunishi K, Hirose A, Hirata-Koizumi M, Matsumoto M, Kamata E. (in press) Repeated dose and reproductive toxicity of the ultraviolet absorber 2-(3',5'-di-*tert*-butyl-2'-hydroxyphenyl) -5-chlorobenzotriazole in rats. *Drug Chem Toxicol*.

Ena M, Fujii S, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Hirose A, Kamata E (2008) Two-generation reproductive toxicity study of the rubber accelerator N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazol esulfenamide in rats. *Reprod Toxicol*, 25, 21-38.

Ena M, Fujii S, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M (in press) Two-generation reproductive toxicity study of the flame retardant hexabrom

- ocyclododecane in rats. *Reprod Toxicol*, 25 (3)
- Hirata-Koizumi M, Matsuyama T, Imai T, Hirose A, Kamata E, Emma M. (in press) Lack of Gender-related difference in the toxicity of 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl) benzotriazole in preweaning rats. *Drug Chem Toxicol*.
- Hirata-Koizumi M, Noda A, Hirose A, Kamata E, Emma M. (in press) Reproductive and developmental toxicity screening test of tetrahydrofurfuryl alcohol in rats. *Reprod Toxicol*.
- Matsumoto M, Furuhashi T, Poncipe C, Emma M. (in press) Combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test of the nitrophenolic herbicide dinoseb, 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol, in rats. *Environ Toxicol*.
- Emma M, Hara H, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Hirose A, Kamata E. (2008) Evaluation of developmental neurotoxicity of polysorbate 80 in rats. *Reprod Toxicol* 25, 89-99.
- Hirata-Koizumi M, Ogata H, Imai T, Hirose A, Kamata E, Emma M. (2008) A 52-week repeated dose toxicity study of ultraviolet absorber 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl) benzotriazole in rats. *Drug Chem Toxicol*, 31, 81-96.
- Hirata-Koizumi M, Matsuyama T, Imai T, Hirose A, Kamata E, Emma M. (2008) Gonadal influence of 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole in rats. *Drug Chem Toxicol*, 31, 115-126.
- Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Emma M. (2008) Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction. *Regulat Toxicol Pharmacol*, 50, 37-49.
- Emma M, Fujii S, Yabe K, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M. (2007) Evaluation of reproductive and developmental toxicity of the rubber accelerator N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazole sulfenamide in rats. *Congenit Anom Kyoto*, 49, 149-155.
- 江馬 眞 (2007) 有機スズ化合物の生殖発生毒性、国立医薬品食品衛生研究所報告. 125, 35-50.
- 高橋美加、松本真理子、川原和三、菅野誠一郎、菅谷芳雄、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞 (2007) OECD 化学物質対策の動向(第12報) - 第20回、第21回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議(2005年パリ、ワシントンDC)、化学生物総合管理学会雑誌, 3, 43-55.
- 高橋美加、松本真理子、川原和三、菅野誠一郎、菅谷芳雄、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞 (2007) OECD 化学物質対策の動向(第13報) - 第22回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議(2006年パリ)、国立医薬品食品衛生研究所報告. 125, 101-106.
- 松本真理子、大井恒宏、宮地繁樹、菅谷芳雄、江馬 眞 (2007) OECD 高生産量化学物質点検プログラム - 第23回初期評価会議概要、化学生物総合管理学会誌, 3, 56-65.
- 松本真理子、山本展裕、宮地繁樹、菅谷芳雄、江馬 眞 (2007) OECD 高生産量化学物質点検プログラム - 第24回初期評価会議概要、化学生物総合管理学会誌, 3, 180-189.

学会発表

- Emma M, Matsuyama T, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Hirose A. and Kamata E. (2007). Toxicity of ultraviolet absorber 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole (HDBB) in pre-weaning rats. International Congress of Toxicology XI
- Emma M, Fujii S, Hirata-Koizumi M, Matsumoto M, Hirose A. and Kamata E. (2007). Evaluation of two-generation reproductive toxicity of a vulcanization accelerator N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in rats. 2007 EUROTOX
- Emma M, Matsumoto M, Furuhashi T. and Poncipe

- C. (2007). Screening study for repeated dose and reproductive and developmental toxicity of the nitrophenolic herbicide dinoseb in rats. SET AC North America 28th Annual Meeting (11/11-15, Milwaukee)
- Ema M, Fujii S, Hirata-Koizumi M, Matsumoto M. (2008) Evaluation of two-generation reproductive toxicity of flame retardant hexabromocyclodecane (HBCD) in rats. The 47th Annual Meeting of the Society of Toxicology.
- Harada T, Kimura E, Hirose A, Kamata E. and Ema M. (2007). Reproductive/developmental screening toxicity of 4-aminophenol in rats. 2007 EUROTOX
- Hirata-Koizumi M, Hasegawa R, Hirose A, Ema M (2008) Proposal for safety exposure level of nitrobenzene through foods and drinking water. The 47th Annual Meeting of the Society of Toxicology.
- Hirose A, Kato H, Ise R, Oneda S, Hirata-Koizumi M, Ihara T, Ema M. (2008) Early response in gene expression profiles in monkey embryos following maternal exposure to thalidomide during the susceptible period for malformations. The 47th Annual Meeting of the Society of Toxicology.
- Matsuyama T, Hirata-Koizumi M, Imai T, Hirose A, Kamata E. and Ema M. (2007). Toxicity of ultraviolet absorber 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole (HDBB) in castrated rats. International Congress of Toxicology XI
- 江馬 眞 (2007) 神経発生毒性試験、平成19年度後期「化学・生物総合管理の再教育講座」化学物質リスク評価の基礎2、お茶の水女子大学 10月28日
- 江馬 眞 (2007) 生殖発生毒性試験、平成19年度後期「化学・生物総合管理の再教育講座」化学物質リスク評価の基礎2、お茶の水女子大学 10月28日
- 江馬 眞、原 洋明、松本真理子、広瀬明彦、鎌田
- 栄一(2007)ポリソルベート80のラットにおける発生神経毒性、第34回日本トキシコロジー学会学術集会(6月27日、東京)
- 江馬 眞 (2007) OECD Developmental Neurotoxicity Studyガイドライン・ドラフトのその後、第47回日本先天異常学会学術集会(7月7日、名古屋)
- 江馬 眞、伊藤義彦、松本真理子、平田陸子、広瀬明彦、鎌田栄一 (2007) 加硫促進剤N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamideのラットにおける反復/生殖発生毒性併合試験、第47回日本先天異常学会学術集会(7月8日、名古屋)
- 平田陸子、渡 修明、向井大輔、今井俊夫、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞(2007)2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole (HDBB)の28日間反復投与毒性試験、第34回日本トキシコロジー学会学術集会(6月28日、東京)
- 平田陸子、松山隆史、今井俊夫、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞 (2007) 紫外線吸収剤2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole (HDBB)を離乳前ラットに投与したときの影響、第47回日本先天異常学会学術集会(7月8日、名古屋)
- G. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

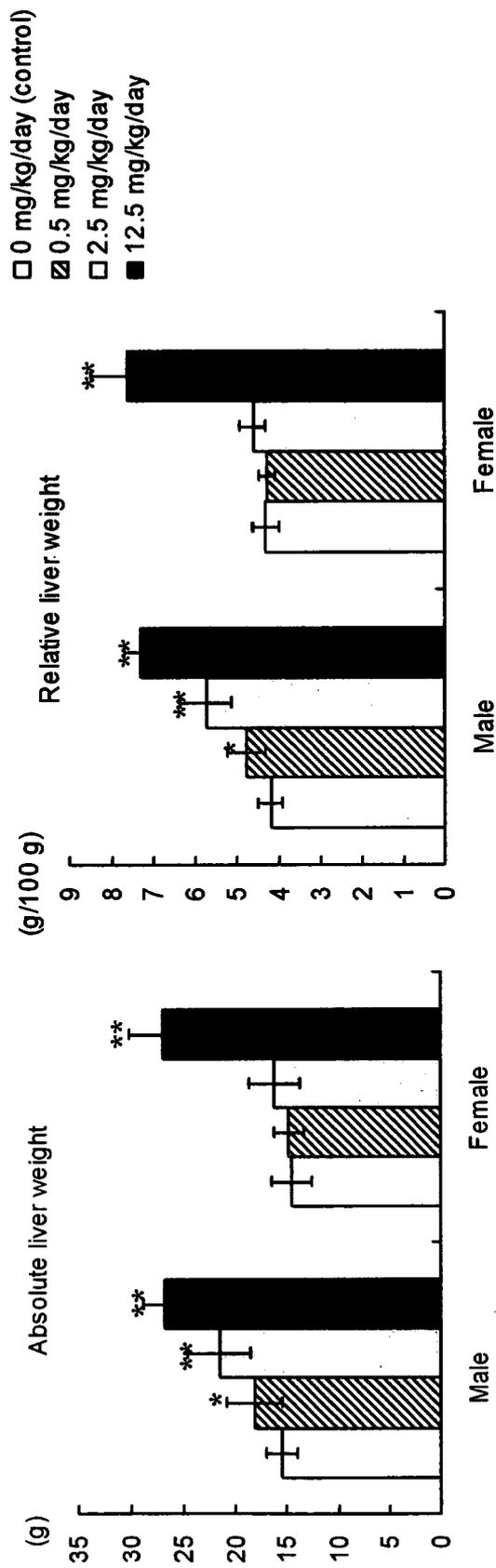


Fig.1 Absolute and relative liver weight in male and female castrated rats given HDBB by gavage for 28 days

Values are expressed as the mean \pm SD.

*: Significantly different from the control, $P < 0.05$.

**: Significantly different from the control, $P < 0.01$.

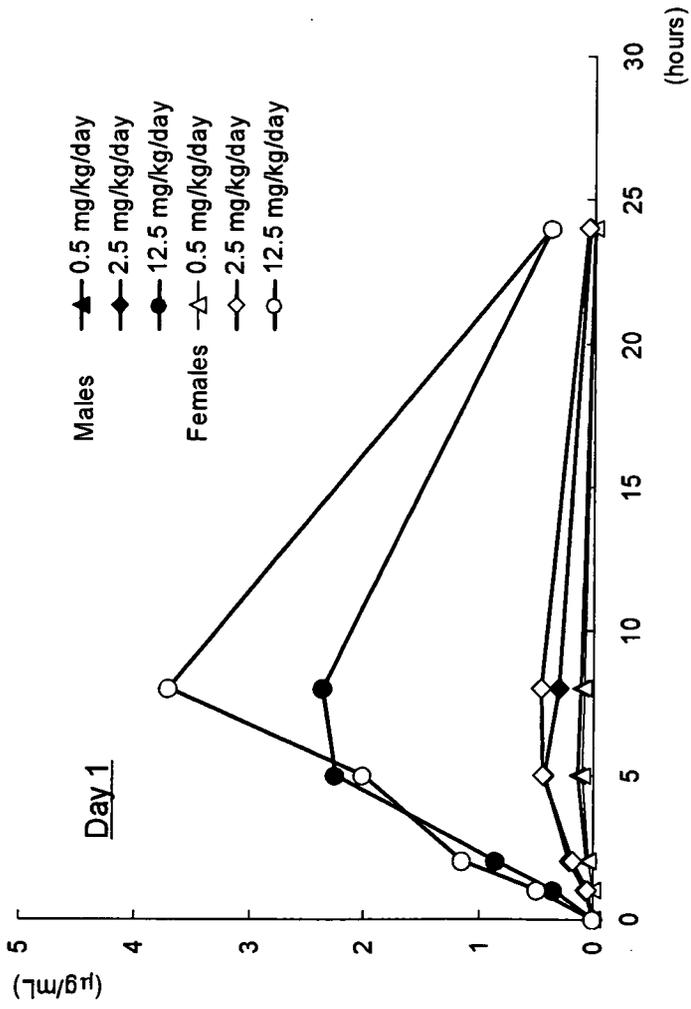


Fig. 2 Plasma HDBB concentration curve after a single oral administration of HDBB in male and female young rats

Table 1: Histopathological findings in the liver of male and female castrated rats given HDBB by gavage for 28 days

Dose (mg/kg/day)					
	Grade	0	0.5	2.5	12.5
Male					
No. of animals		10	10	10	10
Anisokaryosis of hepatocytes	±	0	1	8	3
	+	0	0	0	7
Nucleolar enlargement in hepatocytes	±	0	1	10	5
	+	0	0	0	5
Increased mitosis of hepatocytes	±	0	0	1	4
Hypertrophy of hepatocytes	±	0	4	10	10
Decreased glycogen in hepatocytes	±	0	1	6	8
	+	0	0	0	2
Focal necrosis	±	0	0	0	3
Mononuclear cell infiltration	±	1	0	0	5
Female					
No. of animals		10	10	10	9 ^{a)}
Anisokaryosis of hepatocytes	±	0	0	5	8
Nucleolar enlargement in hepatocytes	±	0	0	5	9
Hypertrophy of hepatocytes	±	0	0	2	9
Decreased glycogen in hepatocytes	±	0	0	2	8
Focal necrosis	±	0	0	3	2
Mononuclear cell infiltration	±	1	1	1	0

Values represent the number of animals with the findings.

±: Very slight.

+: Slight.

a): One female was excluded because left ovary remnants were found at autopsy.

Table 2. Microsomal protein and P450 contents and drug-metabolizing enzyme activities in hepatic microsomes of male and female rats given HDBB by gavage for 28 days

	Dose (mg/kg/day)			
	0 (control)	0.5	2.5	12.5
Males				
Microsomal protein content (mg/g liver)	27.2 ± 5.3	21.6 ± 2.3	22.0 ± 6.0	23.5 ± 4.3
Total P450 content (nmol/mg protein)	0.670 ± 0.119	0.783 ± 0.075	0.885 ± 0.052 #	0.738 ± 0.119 #
Aminopyrine N-demethylase activity (nmol/min/mg protein)	6.700 ± 0.443	6.942 ± 0.812	4.902 ± 0.484 #	4.713 ± 0.743 #
ECOD activity (nmol/min/mg protein)	1.420 ± 0.140	1.713 ± 0.354	1.528 ± 0.253	1.213 ± 0.202
EROD activity (nmol/min/mg protein)	0.0627 ± 0.0083	0.0459 ± 0.0045 #	0.0233 ± 0.0054 #	0.0237 ± 0.0020 #
Testosterone 6 α -hydroxylase activity (nmol/min/mg protein)	2.67 ± 0.44	3.18 ± 0.96	2.89 ± 0.41	2.53 ± 0.36
Testosterone 2 α -hydroxylase activity (nmol/min/mg protein)	1.562 ± 0.170	1.385 ± 0.495	0.179 ± 0.207 #	0.000 ± 0.000 #
Testosterone 16 α -hydroxylase activity (nmol/min/mg protein)	2.165 ± 0.439	1.714 ± 0.451	0.432 ± 0.278 #	0.119 ± 0.137 #
Lauric acid 12-hydroxylase activity (nmol/min/mg protein)	1.60 ± 0.47	7.80 ± 2.14 \$	9.99 ± 0.58 \$	11.09 ± 2.26 \$

Females

Microsomal protein content (mg/g liver)	11.4 ± 3.5	11.7 ± 3.5	16.2 ± 6.7	16.5 ± 3.0
Total P450 content (nmol/mg protein)	0.637 ± 0.132	0.674 ± 0.168	0.646 ± 0.131	0.600 ± 0.076
Aminopyrine N-demethylase activity (nmol/min/mg protein)	4.157 ± 0.534	4.362 ± 0.630	4.403 ± 1.007	5.133 ± 0.680
ECOD activity (nmol/min/mg protein)	0.657 ± 0.105	0.649 ± 0.099	0.647 ± 0.128	0.693 ± 0.095
EROD activity (nmol/min/mg protein)	0.0869 ± 0.0266	0.0882 ± 0.0145	0.0904 ± 0.0144	0.1142 ± 0.0237
Testosterone 6 α -hydroxylase activity (nmol/min/mg protein)	0.121 ± 0.023	0.138 ± 0.019	0.150 ± 0.040	0.159 ± 0.047
Testosterone 2 α -hydroxylase activity (nmol/min/mg protein)	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
Testosterone 16 α -hydroxylase activity (nmol/min/mg protein)	0.066 ± 0.123	0.018 ± 0.025	0.054 ± 0.076	0.083 ± 0.073
Lauric acid 12-hydroxylase activity (nmol/min/mg protein)	1.37 ± 0.15	1.40 ± 0.23	1.51 ± 0.38	3.20 ± 3.01 §

Values are the mean ± S.D. of analytical results from five animals.

Abbreviation used: ECOD, 7-ethoxycoumarin O-deethylase; EROD, 7-ethoxyresorufin O-deethylase

P<0.05 : Significantly different from control by the Williams test,

§ P<0.05 : Significantly different from control by the Shirley-Williams test

Table 3. Residual ratios of HDBB after incubation with rat liver microsomes or S-9 in the presence of NADPH regenerating system

Sample	% of Blank A	% of decrease
Male rat microsomes	73.4	26.6
Female rat microsomes	76.1	23.9
Male rat S-9	98.1	1.9
Female rat S-9	91.4	8.6

Data are expressed as the mean values of two determinations (except Blank A, n = 1).

Protein final concentration in the incubation mixture: 2 mg/mL

Final concentration of HDBB in incubation mixture: 45 μ mol/L

Incubation time: 60 minutes

Blank A (no incubation)

Table 4. Residual rations of HDBB after incubation with recombinant rat CYP isoforms in the presence of NADPH regenerating system

Sample	% of control
CYP1A1	61.8 %
CYP1A2	79.5 %
CYP2A1	96.9 %
CYP2A2	89.9 %
CYP2B1	88.4 %
CYP2C6	84.0 %
CYP2C11	74.6 %
CYP2C12	102.6 %
CYP2C13	105.1 %
CYP2D1	101.7 %
CYP2D2	80.7 %
CYP2E1	102.1 %
CYP3A1	102.8 %
CYP3A2	100.7 %

Data are expressed as the mean values of two determinations.

Final concentration of HDBB in the incubation mixture: 45 $\mu\text{mol/L}$

Incubation time: 60 minutes

目 的

化学物質等の外因性要因に対する出生前及び出生後の児における悪影響は着床阻害、胚死亡、奇形、生殖器の異常、行動異常等の様々な発現様式で観察される。児の発生発育段階により外因性要因に対する感受性が変化し、発現様式にしたがったwindowがあることが認識されている。また児における外因性要因に対する悪影響は成体における反応とも異なり、悪影響発現の感受性も大きく異なる場合のあることが認識されつつある。

本研究においては、化学物質を児の発生発育の種々の段階に投与し、毒性発現、感受性の違いを明らかにし、各発生発育段階の児における毒性発現機序の解析を行う。

年次計画

17年度

各発生発育段階の児における毒性発現様式及び感受性の比較解析を行う

18年度

新生児及び成体比較により、感受性差の原因解明を行う

19年度

新生児及び成体比較により、感受性差の原因解明を行う

17年度

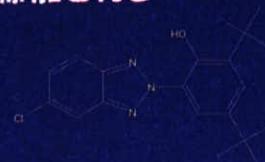
2-(3',5'-Di-tert-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole (DBHCB)

(CAS No. 3864-99-1)

DBHCBは紫外線吸収剤として使われている。

DBHCBは低揮散性で、耐溶抽出性、耐ガス退色性に優れており、ポリオレフィン、ポリ塩化ビニル、ポリカーボネート、ポリウレタン、種々のペンキ等に使われている。

紫外線吸収剤はポリマーの劣化防止、紫外線による食品の品質低下防止のために食品包装材に添加されている。



17年度

DBHCBのラットにおける反復投与毒性／生殖発生毒性併合試験の結果

♂25 mg/Kg bw/day以上

肝増重量及び比重量↑

アルブミン↑

A/G比↑

ALAT↑

総蛋白↑

♀には投与の影響は認められなかった。

生殖発生毒性指標に投与の影響は観察されなかった。

17年度

DBHCBのラット新生児への直接投与試験

DBHCB (純度: 99.9%) を5%アラビアゴム溶液に懸濁した。

生後4日のCrj:CD(SD) IGSラットに

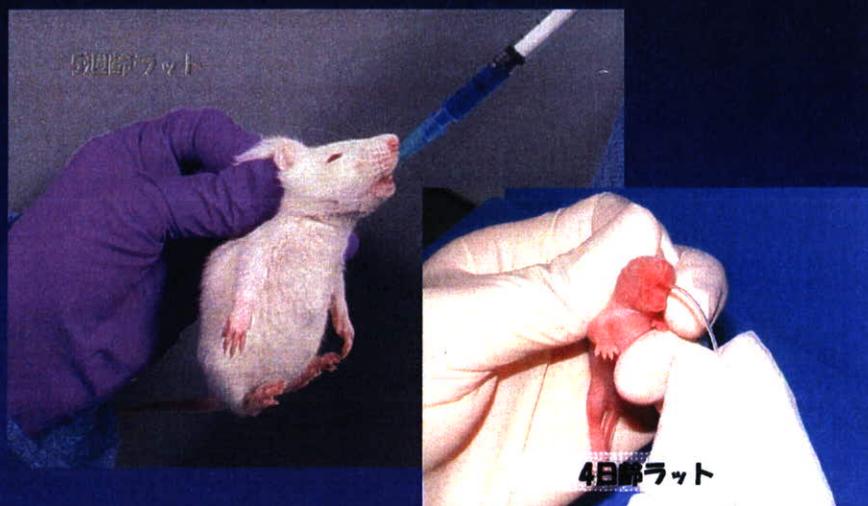
0, 250, 500 mg/kg bw/dayを強制経口投与した。

1母体当たり雌雄各4匹の新生児

♂: 生後4-21日に直接強制経口投与し、生後22日に剖検した

♀: 生後4-21日に直接強制経口投与し、生後22日に剖検した

強制経口投与方法



17年度 DBHCBのラット新生児への直接投与試験の結果

♂ ♀

肝増重量及び比重量↑

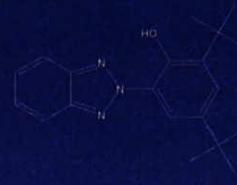
肝細胞肥大、好酸性顆粒状変化、グリコーゲン減少、
単細胞壊死

AST↑、ALAT↑、ALP↑、総ビリルビン↑

6週齢ラットを用いた反復投与試験では、雄にのみ毒性が認められたが、
離乳前のラットを用いた試験では毒性発現の雌雄差は認められなかった

18年度 2-(2'-Hydroxy-3',5'-di-tertbutylphenyl) benzotriazole (HDBB, CAS No. 3846-71-7)

- ・ フラスチックの紫外線吸収剤として用いられている。
- ・ 不飽和ポリエステル、塩化ビニル、ホリアクリル酸、ホリアミド樹脂への練りこみ、工業用塗料およびデジタル印刷用途に使われている。
- ・ H17年11月18日に行われた薬事・食品衛生審議会、化学物質審議会及び中央環境審議会において「継続的に摂取される場合には、人の健康を損なうおそれがある」可能性が示され(第一種特定化学物質)、製造、輸入及び使用が行われるべきではない



18年度
HDBBの5週齢ラットにおける28日反復投与毒性
実験方法

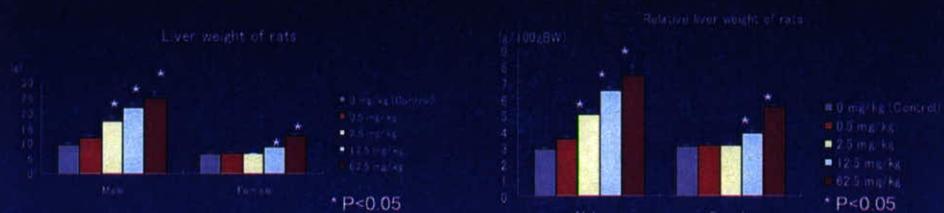
- ・ HDBB (純度: 100%) をコーン油に懸濁した。
- ・ 5週齢のCrj:CD (SD) IGSラットに
 0, 0.5, 2.5, 12.5, 62.5 mg/kg bw/dayを強制経口投与した。
28日間反復投与
回復群: 14日間の回復期間後と殺 (0及び62.5 mg/kg bw/day)

18年度
HDBBの5週齢ラットにおける28日間反復投与毒性試験の結果

	♂	♀
0.5 mg/kg bw/day	肝細胞肥大、胆管増生 A/G比↑	影響なし
2.5 mg/kg bw/day	肝重量↑、肝細胞肥大 胆管増生 空胞変性 A/G比・グルコース↑	影響なし
12.5 mg/kg bw/day	肝重量↑、肝障害 心筋肥大・変性 A/G比・グルコース・ALT・ALP ↑	肝重量↑ 肝障害(胆管増生なし) 心筋肥大・変性
62.5 mg/kg bw/day	肝障害、心筋肥大・変性 甲状腺ろ胞細胞肥大 尿管上皮肥大 肝重量↑ A/G比・グルコース・ALT・ALP・AST ↑	肝障害、心筋肥大・変性 甲状腺ろ胞細胞肥大 尿管上皮肥大 肝重量↑ A/G比・グルコース・TChol・TGL ↑
NOAEL	< 0.5 mg/kg bw/day	2.5 mg/kg bw/day

18年度

HDBBの5週齢ラットにおける28日間反復投与毒性試験の結果 (肝臓重量)



雄：2.5 mg/kg以上で肝臓重量増加
雌：12.5 mg/kg以上で肝臓重量増加

18年度

HDBBの新生児ラットへの直接投与毒性試験

実験方法

HDBB (純度: 100%) をコーン油に懸濁した。

生後4日のCrI:CD (SD) ラットに

0, 0.5, 2.5, 12.5 mg/kg bw/dayを強制経口投与した。

5母体/群、1母体当たり♂♀各4匹の児 (♂♀雄各20匹/群)

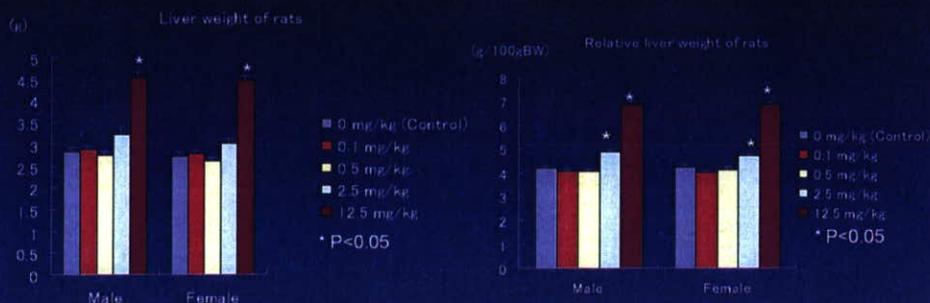
♂：生後4-21日に直接強制経口投与し、生後22日に剖検した

♀：生後4-21日に直接強制経口投与し、生後22日に剖検した

18年度 HDBBの新生児ラットへの直接投与毒性試験の結果

	♂	♀
0.5 mg/kg bw/day	影響なし	影響なし
2.5 mg/kg bw/day	肝相対重量↑ 肝細胞分裂像頻度上昇 肝細胞核の大小不同／核小体肥大	肝相対重量↑ 肝細胞分裂像頻度上昇 肝細胞核の大小不同／核小体肥大
12.5 mg/kg bw/day	肝重量↑ AST/ALP/BUN ↑ アルブミン↑ CPK↓ 肝細胞肥大 好酸球性顆粒状変化 グリコーゲン減少	肝重量↑ AST/ALP/LDH ↑ アルブミン↑ TGL↓ 肝細胞肥大 好酸球性顆粒状変化 グリコーゲン減少
NOAEL	0.5 mg/kg bw/day	0.5 mg/kg bw/day

18年度 HDBBのラットにおける新生児投与毒性試験の結果 (肝臓重量)



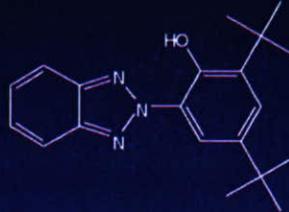
雄：2.5 mg/kg以上で肝臓相対重量増加
雌：2.5 mg/kg以上で肝臓相対重量増加

昨年までの成果

ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤



2-(3',5'-Di-*tert*-butyl-2'-hydroxyphenyl)
-5-chlorobenzotriazole
(DBHCB, CAS No. 3864-99-1)



2-(2'-Hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)
benzotriazole
(HDBB, CAS No. 3846-71-7)

若齢ラットを用いた反復投与試験では顕著な性差が認められた
 新生児ラットを用いた反復投与試験では性差は認められなかった

若齢ラットおよび離乳前ラットを用いた HDBBの反復投与毒性試験



若齢ラットでみられたHDBB毒性の性差は離乳前ラットでは認められなかった。

H19年度

ペンソトリアール系紫外線吸収剤の毒性に見られる過齢差及び性差の発現メカニズムを解明することを目的として、特に強い毒性が認められたHDBBについて以下の検討を行った。

1. 雌雄の去勢ラットを用いた反復投与毒性試験
2. 雌雄の若齢ラットを用いた血中濃度測定試験
3. 雌雄ラットの肝ミクロソームおよびS-9を用いた代謝安定性試験
4. ラットCYP発現系を用いた分子種特定試験
5. 雌雄の若齢ラットを用いた
肝薬物代謝酵素活性測定試験

去勢ラットを用いた反復投与毒性試験

実験方法

HDBB (純度: 100%) をコーン油に懸濁した。

雌雄のCrl:CD(SD) ラット(4週齢)をエーテル麻酔下で去勢した。

2週間の馴化期間の後に 0, 0.5, 2.5, 12.5 mg/kg bw/day を28日間強制経口投与した。