C.I.ピグメントブルー29のラットを用いる単回経口投与毒性試験

最　終　報　告　書

作成日　２００５年１２月８日

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

目次

要約	·····	8
緒言	·····	9
方法	·····	9
1．被験物質及び媒体	·····	9
2．投与検体及び濃度確認	·····	9
3．使用動物及び飼育条件	·····	10
4．投与経路，投与方法，群構成及び投与量	·····	11
5．観察及び検査項目	·····	11
6．統計解析	·····	12
結果	·····	12
1．死亡状況，LD_{50}値及び一般状態	·····	12
2．体重	·····	12
3．剖検	·····	12
考察	·····	12
文献	·····	13

Attachment, Table 及び Appendix の目次

Table 1	Mortality and LD_{50} value of female rats in single dose oral toxicity test of C.I. Pigment blue 29	····· 16
Table 2	General signs of female rats in single dose oral toxicity test of C.I. Pigment blue 29	····· 17
Table 3	Body weights of female rats in single dose oral toxicity test of C.I. Pigment blue 29	····· 18
Table 4	Necropsy findings of female rats in single dose oral toxicity test of C.I. Pigment blue 29	····· 19

要約

C.I.ピグメントブルー29を雌ラットに1回経口投与し，その毒性について検討した．投与量は，第1回試験及び第2回試験とも2000 mg/kgとした．媒体には1 w/v%メチルセルロース溶液を用いた．使用動物数は各3例とした．

1．死亡状況及び一般状態

死亡例は，第1回試験及び第2回試験とも2000 mg/kg投与で認められなかった．

一般状態において，2000 mg/kg投与で被験物質色に基づく青色便がみられたのみであった．

2．体重

2000 mg/kg投与では，体重推移に異常はみられなかった．

3．剖検

2000 mg/kg投与では，剖検所見に異常はみられなかった．

以上の結果から，C.I.ピグメントブルー29のLD_{50}値は，2000 mg/kgを越えると推定される．

緒言

C.I.ピグメントブルー29(CAS No. 57455-37-5)が人に摂取された場合の健康への影響を推定するために，OECD Guideline for Testing of Chemicals for Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method (Revised Guideline 423)に従って，C.I.ピグメントブルー29 を雌ラットに 1 回経口投与して，その毒性について検討した．

方法

1．被験物質及び媒体

被験物質のC.I.ピグメントブルー29(CAS No. 57455-37-5)は，SiO_2を 39.60%，Al_2O_3を 23.76%，Fe_2O_3を 0.45%，S を 12.08%，Na_2O を 22.59%含む(不明 1.52%，但し，各成分 1%未満)コバルト色の非常に鮮明な群青であり，粒子径は 0.3～2μである．水及び多くの有機溶媒に不溶であり，臭素水に可溶であり，酸と容易に反応し，硫化水素ガスを発生し，分解する．当試験には，　　から入手したものを用いた[製造元:　　，Lot No.　　]．入手後は，試験施設の被験物質保管室の保管庫(使用冷蔵庫:MPR-311D，三洋電機株式会社)に冷蔵(設定:4℃，実測値:2.4～9.4 ℃)の条件下で保管した．なお，当試験の投与終了後に当ロットについて　　で再分析した結果，SiO_2 は 39.60%，Al_2O_3 は 23.68%，Fe_2O_3 は 0.43%，S は 12.10%，Na_2O は 22.69%であり，使用期間中の安定性が確認された．

媒体として，1 w/v%メチルセルロース溶液を用いた．

2．投与検体及び濃度確認

1 w/v%メチルセルロース溶液(以下，1 w/v%MC 溶液)は，メチルセルロース[メトローズ® SM-100，Lot No. 110654，信越化学工業株式会社，使用期限:2007 年 4 月 4 日，保管条件:室温(設定:23℃，実測値:21.0～26.5 ℃)，保管場所:被験物質保管室の保管庫]の必要量を秤量(使用電子天秤:AT250，メトラー・トレド株式会社)後，注射用水[局方，Lot No. 3L77N，株式会社大塚製薬工場，使用期限:2008 年 12 月，保管条件:室温(設定:23℃，実測値:21.0～26.5 ℃)，保管場所:被験物質保管室]に所定濃度となるように溶解し，調製した．1 w/v%MC 溶液は，冷蔵(設定:4℃，実測値:3.2～6.8℃，使用冷蔵庫:RC-M501，株式会社日立製作所)の条件下で保管し，調製後 1 日に使用した．

C.I.ピグメントブルー29 は，必要量を秤量(使用電子天秤:PM2500，メトラー・トレド株式会社)後，1 w/v%MC 溶液で所定濃度となるように懸濁して調製した．なお，被験物質の調製に際して，純度による換算は実施しなかった．

1 及び 100 mg/mL の調製液は，調製後，冷蔵の条件下で 9 日間保管しても安定性に問題のないことが確認されている　　．調製液は，用時調製とし，調製後 6 時間以内に使用した．投与後の残余投与検体は廃棄した．

投与に使用した投与検体中の被験物質濃度を乾燥重量法(使用電子天秤:AT261，メトラー・トレド株式会社，使用乾熱滅菌器:PH-200，エスペック株式会社)で測定した．その結果，被験物

質含量は表示濃度の 93.2 及び 93.9%と目標値の範囲内(100±10%)であった．また，各投与検体の均一性は，いずれも CV 値が 5%以下であった．従って，各投与検体中の含量及び均一性に問題はなかった(Attachment 1-1～1-2)．

3．使用動物及び飼育条件

3.1．動物種及び系統

試験には，毒性試験に一般的に用いられている動物種で，その系統維持が明らかである Crj:CD(SD)IGS 雌ラット(SPF)を用いた．動物は，日本チャールス・リバー株式会社(日野飼育センター)から 7 週齢で 2004 年 6 月 16 日(第 1 回試験用)及び 2004 年 6 月 30 日(第 2 回試験用)に各 5 匹を入手した．入手後 1 日の体重範囲は，178～189 g であった．

3.2．検疫及び馴化，群分け法並びに個体識別法

入手した動物は，第 1 回試験及び第 2 回試験とも 5 日間の検疫期間及びその後 2 日間の馴化期間を設けた．この間に，体重測定(使用電子天秤:PM2000 及び PG2002-S，メトラー・トレド株式会社)を 4 回と一般状態の観察を毎日行って検疫・馴化とし，一般状態及び体重推移に異常の認められなかった動物を群分け後，試験に用いた．

群分けは，第 1 回試験及び第 2 回試験とも投与日にコンピュータを用いて無作為抽出法により試験に用いる各 3 例に動物番号を割り当てた．群分け後の残余動物は，投与日にジエチルエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に廃棄処分した．

動物の個体識別は，検疫・馴化期間中は入手日に油性インクによる記入法及び油性インクによる色素塗布法を，群分け後は油性インクによる色素塗布法及び耳パンチ法を併用して行った．さらに，検疫・馴化期間中の各ケージには試験番号，入手年月日及び検疫・馴化動物番号を記入したラベルを，群分け後の各ケージには試験番号，投与量及び動物番号を記入し，色分けしたラベルを取り付けた．

3.3．環境条件及び飼育管理

動物は，設定温度 23 ℃(実測値:20～24 ℃)，設定湿度 55%(実測値:42～62%)，明暗各 12 時間(照明:午前 6 時～午後 6 時)，換気回数 12 回／時(フィルターにより除菌した新鮮空気)に維持された飼育室(E 棟 8 号室，ただし，検疫期間中は E 棟 7 号室)で飼育した．

検疫・馴化期間中及び群分け後とも，ステンレス製五連ケージ(W：755×D：210×H：170 mm)を用いて個別飼育した．ケージの受け皿及び給水瓶の交換は 1 週間に 2 回以上，ケージ及び給餌器の交換は 2 週間に 1 回以上行った．なお，動物飼育室の清掃（床の掃き掃除）及び 0.02%次亜塩素酸ナトリウム水溶液での床のモップ拭きによる消毒は毎日行った．

3.4．飼料及び飲料水

飼料は，製造後 5 カ月以内の固型飼料（CRF-1，オリエンタル酵母工業株式会社）を給餌器に入れ，自由に摂取させた．ただし，投与前日の夕刻(午後 4 時 00 分)から投与までの約 18 時間 30 分と投与後約 6 時間まで絶食させ，その後に飼料を与えた．使用した飼料と同一ロットの飼

料の分析結果は，財団法人日本食品分析センター及びオリエンタル酵母工業株式会社で実施した成績を入手した．

飲料水は，水道水を給水瓶を用いて自由に摂取させた．ただし，群分け時から投与後約6時間までは絶水させ，その後に飲料水を与えた．飲料水の水質検査結果は，ほぼ6ヵ月ごとに東西化学産業株式会社　東日本分析センターで実施した成績を入手した．

飼料及び飲料水の分析結果は，いずれも試験施設で定めた基準値の範囲内であった．

4．投与経路，投与方法，群構成及び投与量

4.1．投与経路及び投与方法

C.I.ピグメントブルー29は，経口的に人に摂取される可能性が考えられるため，投与経路として経口投与を選択した．

投与に際しては，金属製経口胃ゾンデ(有限会社フチガミ器械)を取り付けたポリプロピレン製ディスポーザブル注射筒(テルモ株式会社)を用いて，強制経口投与した．投与液量は，投与直前に測定した体重を基準として20 mL/kgで算出した．投与時刻は午前10時30分～10時40分の間で，投与回数は1回とした．

投与日の週齢は8週齢であり，体重範囲は183～190 gであった．

4.2．群構成及び投与量

群構成は，下記のように設定し，各試験の動物数は，3例とした．

＜第1回試験＞

試験群	投与量(濃度)	動物数(動物番号)
C.I.ピグメントブルー29	2000 mg/kg(100 mg/mL)	3(F01151～F01153)

C.I.ピグメントブルー29のラット経口投与によるLD_{50}値は10000 mg/kg以上との情報がある[1]．従って，OECD Guideline for Testing of Chemicals for Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method (Revised Guideline 423)で最高用量とされている2000 mg/kgを第1回試験の投与量とした．

＜第2回試験＞

試験群	投与量(濃度)	動物数(動物番号)
C.I.ピグメントブルー29	2000 mg/kg(100 mg/mL)	3(F01251～F01253)

第1回試験の2000 mg/kg投与で死亡例が認められなかったため，2000 mg/kgを第2回試験の投与量とした．

5．観察及び検査項目

5.1．観察期間

投与後14日間とした．

5.2. 一般状態

投与日は投与後6時間(投与直後～投与後30分，投与後2，4及び6時間)まで，投与翌日からの観察期間中は1日1回，一般状態及び死亡の有無を観察した．

5.3. 体重測定

投与日(投与直前)並びに投与後1，3，7，10及び14日に測定した(使用電子天秤:PM2000，PB3002及びPG2002-S，メトラー・トレド株式会社)．

5.4. 剖検

動物は，観察期間終了時にジエチルエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した．

6. 統計解析

LD_{50}値は概略の範囲を推定した．

体重は，各群で平均値及び標準偏差を算出した．

結果

1. 死亡状況，LD_{50}値及び一般状態(Table 1～2, Appendix 1-1～1-2)

死亡例は，第1回試験及び第2回試験の2000 mg/kg投与とも認められなかった．以上の結果から，C.I.ピグメントブルー29のLD_{50}値は，2000 mg/kgを越えると推定される．

一般状態において，第1回試験及び第2回試験の2000 mg/kg投与で投与後1日に青色便が各3例にみられた．

2. 体重(Table 3, Appendix 2-1～2-2)

第1回試験及び第2回試験の2000 mg/kg投与とも，体重は順調に推移した．

3. 剖検(Table 4, Appendix 3-1～3-2)

第1回試験及び第2回試験の2000 mg/kg投与とも，剖検所見に異常はみられなかった．

考察

C.I.ピグメントブルー29のLD_{50}値は，2000 mg/kgを越えると推定される．

C.I.ピグメントブルー29の2000 mg/kg投与により，青色便が認められたが，これは被験物質色に基づくものであり，毒性変化ではないと考えられる．また，2000 mg/kgを投与しても，体重及び剖検所見にも異常はみられなかった．

文献

1) , MSDS

Table 1 Mortality and LD_{50} value of female rats in single dose oral toxicity test of C.I. pigment blue 29

Group	mg/kg	Number of females	Number of deaths																		Total number of deaths	LD_{50} (mg/kg)
			Hours after administration				Days after administration															
			0～0.5	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
Test group 1 C.I. pigment blue 29	2000	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	>2000
Test group 2 C.I. pigment blue 29	2000	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 2 General signs of female rats in single dose oral toxicity test of C.I. pigment blue 29

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Hours after administration				Days after administration													
			0～0.5	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Test group 1	2000	Number of females	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
C.I. pigment blue 29		Normal	3	3	3	3	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
		Bluish feces	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Test group 2	2000	Number of females	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
C.I. pigment blue 29		Normal	3	3	3	3	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
		Bluish feces	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 3 Body weights of female rats in single dose oral toxicity test of C.I. pigment blue 29

Group	Test group 1 C.I. pigment blue 29	Test group 2 C.I. pigment blue 29
mg/kg	2000	2000
Number of females	3	3
Days after administration		
0	185 ± 2	187 ± 4
1	199 ± 3	205 ± 7
3	204 ± 6	216 ± 6
7	212 ± 5	227 ± 3
10	217 ± 5	234 ± 5
14	229 ± 2	240 ± 2

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 4 Necropsy findings of female rats in single dose oral toxicity test of C.I. pigment blue 29

Group	Test group 1 C.I. pigment blue 29	Test group 2 C.I. pigment blue 29
mg/kg	2000	2000
Number of females	3	3
Findings		
Normal	3	3