

食薬セ研第10-1623号

2000年 7月25日

ピグメントオレンジ16のラットに
おける急性経口投与毒性試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

【目 次】

| | |
|------------------|---|
| 要約 | 1 |
| 緒言 | 2 |
| 方法 | 3 |
| 1. 被験物質 | 3 |
| 2. 使用動物および飼育方法 | 3 |
| 3. 投与検体の調製 | 4 |
| 4. 投与量の設定および投与方法 | 4 |
| 5. 観察および検査 | 5 |
| 6. データ解析法 | 5 |
| 結果 | 6 |
| 1. 死亡動物 | 6 |
| 2. 一般状態 | 6 |
| 3. 体重推移 | 6 |
| 4. 病理学検査 | 6 |
| 考察 | 7 |
| 文献 | 8 |

Tables 1～2

【要 約】

ピグメントオレンジ16（以下 P016 と略記）の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD) IGS, SPF] ラットにおける急性経口投与毒性試験を実施した。

1 群 5 匹からなる 5 週齢の雌雄ラットに P016 2000 mg/kg をそれぞれ単回経口投与し、観察第 1 日（投与日）から 14 日間観察を行い、観察第 15 日に屠殺して剖検した。また、媒体対照群として、雌雄各 5 匹にコーン油を 20 mL/kg 投与して、同様に観察した。

被験物質投与群で、被験物質と同様のオレンジ色の便の排泄が、投与後約 5 時間に雄 1 例で、観察第 2 日に雌雄全例で観察された以外、一般状態に特記すべき変化は認められなかった。

体重の推移においては、媒体対照群と被験物質投与群の間に明らかな差は認められなかった。

観察第 15 日に実施した剖検所見においては、全例で異常所見は認められなかった。

これらのことより、本試験条件下における P016 の LD₅₀ は、雌雄ともに 2000 mg/kg を上回ると推定された。

【結 言】

ピグメントオレンジ16（以下 P016 と略記）は有機顔料の一つで、ラットにおける単回経口投与時の LD₅₀ は 5000 mg/kg 以上であることが報告されている¹⁾。今回、OECD 既存化学物質安全性点検等に係る毒性調査の一環として、P016 の安全性確認の資料を得るために、ラットにおける急性経口投与毒性試験を実施したので、その結果を報告する。

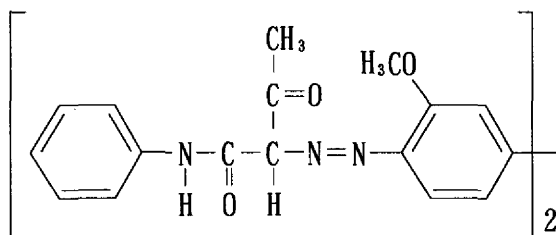
本試験は、OECD 化学物質試験法ガイドライン「[401] 急性経口毒性試験（1987年2月24日採択）」および「化学物質 GLP」（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和63年11月18日改正、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に準拠して実施した。

【方 法】

1. 被験物質

被験物質として、ピグメントオレンジ16（以下 P016 と略記）を用いた。本被験物質は、別名をジスアゾオレンジといい、英名は C. I. Pigment Orange 16 であり、CAS No. 6505-28-8、分子量 620.66、分子式 $C_{34}H_{32}N_6O_6$ の橙色粉末である。P016 の構造式を以下に示す。

構造式



本試験には、より提供された P016（ロット番号：純度：99 wt%以上）を用いた。提供された被験物質は、不純物として水可溶分（NaCl）0.18%を含有していた。受領物質は、使用時まで被験物質受領保管室において、室温で保管した。

2. 使用動物および飼育方法

4週齢の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD)IGS, SPF] 雌雄ラットを、日本チャールス・リバー株式会社筑波飼育センターから購入し、飼育環境への馴化と検疫を兼ねて7日間予備飼育した。予備飼育中、動物の一般状態に異常は認められなかった。試験には、雄雌各10匹を用い、検疫終了時の測定体重を基に体重別層化無作為抽出法により1群5匹からなる2群に分けた。投与開始時の週齢は、雌雄ともに5週齢であった（注）。

（注） 動物入荷日：1999年4月21日
入荷時匹数：雄12匹、雌12匹
入荷時体重：雄 82.5~90.3 g、雌 76.4~86.7 g
投与日：1999年4月28日
投与時体重：雄 119.3~132.8 g、雌 109.4~119.2 g

全飼育期間を通じ、動物を金属製金網床ケージ（220w×270d×190hmm）に1匹ずつ収容し、基準温度 24 ± 1 ℃、基準湿度50～65%、換気回数約15回/時、照明12時間（7時～19時点灯）に制御された飼育室で、固型飼料（CE-2、日本クレア株式会社）および水道水（秦野市水道局給水）を自由に摂取させて飼育した。飼育期間中、飼育室の温湿度の実測値は、それぞれ 23.5～25.0℃、51.0～65.5%で、湿度は基準値をわずかながらはずれる値を示したが、1時間以内の逸脱であり、それ以外は基準の範囲内にあった。また、供給した飼料および水に試験に支障を来す可能性のある混入物はなかった。

動物の個体識別は、各動物の尾にフェルトペンで雌雄に一連の番号を付した。また、各飼育ケージには個体識別の補助として試験計画番号、投与量、性および動物番号を記入した動物カードを掛けた。

3. 投与検体の調製

投与検体の調製においては、被験物質を秤量し、所定濃度となるようにコーン油（英名：Corn oil、商品名：トウモロコシ油、ロット番号：V8P7069、ナカライテスク株式会社）を加えて懸濁し、投与時まで室温で保存し、調製日に使用した。なお、本被験物質はいずれの溶媒にも溶解性を示さないため、投与検体の化学分析は不可能と判断し、安定性、含量測定および均一性試験は実施しなかった。

4. 投与量の設定および投与方法

本試験における投与量は、投与量設定のための予備試験（試験計画番号：A-98-059）の結果に基づいて決定した。すなわち、予備試験において P016 2000 mg/kg を投与した結果、被験物質に由来すると考えられる一般状態の変化が認められなかったことから、OECD 化学物質試験法ガイドラインに従って限度試験とし、雌雄に 2000 mg/kg の1用量を設定した。

また、コーン油の大量投与による下痢およびそれによる一般状態の悪化が懸念されたが、予備試験で 2000 mg/kg を 20 mL/kg の容量で1回投与した場合と 10 mL/kg の容量で3時間の間隔をおいて2回投与した場合のいずれにおいても一過性の軟便が一部の動物にみられたのみで、下痢は観察されなかったため、投与容量は 20 mL/kg とした。動物を投与前日の16時以降絶食させた後、投与直前に測定した体重を基に投与液量を算出し、ラット用胃管を用いて強制的に単回経口投与した。投与は午前10時27分～10時47分の間に行い、

給餌は投与後約 3 時間に行った。

各群の投与物質、投与量、濃度、投与容量および動物番号は次の通りである。

| 投与物質 | 投与量 (mg/kg) | 濃度 (w/v%) | 投与容量 (mL/kg) | 動物番号 | |
|------|----------------|--------------|-----------------|------|-------|
| | | | | 雄 | 雌 |
| コーン油 | 0 | 0 | 20 | 1～5 | 11～15 |
| PO16 | 2000 | 10 | 20 | 6～10 | 16～20 |

5. 観察および検査

観察第 1 日（投与日）から 14 日間にわたって死亡の有無を確認し、各動物の一般状態を観察した。観察は投与日においては投与直後から 1 時間まで連続して行い、その後は投与後 6 時間まで約 1 時間間隔で実施した。

体重は全例について、投与直前、観察第 2、4、8、11 および 15 日に測定した。

剖検は、観察第 15 日に全例をペントバルビタール・ナトリウム麻酔下で放血屠殺して実施した。剖検時に、脳、下垂体、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、生殖器、顎下腺、甲状腺、副腎、大動脈、気管、食道、消化管、膀胱、眼球（ハーダー腺を含む）、皮膚、乳腺、頸部および腸間膜リンパ節、大腿骨骨髓および舌の肉眼観察を行った。これらのうち、2000 mg/kg 投与群の雄の 1 例（動物番号：6）について心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓および胃を 0.1M リン酸緩衝 10% ホルマリン溶液で固定した。なお、観察第 3 日以降、一般状態に異常は観察されず、剖検によっても異常は認められなかったことから、組織学検査は実施しなかった。

6. データ解析法

体重の測定値について、平均値および標準偏差を求めた。

【結 果】

1. 死亡動物

雌雄ともに、死亡例はなかった。

2. 一般状態 (Table 1-1、1-2)

媒体対照群では、雄全例で投与後約 2 ～ 4 時間、雌 2 例で投与後約 1 時間以内に、粘液便の排泄がみられた。

被験物質投与群では、雄 1 例で投与後約 5 時間、雌雄全例で観察第 2 日に、被験物質と同様のオレンジ色の便の排泄が観察された。また、雄 1 例で観察第 4 日に軟便の排泄がみられた。

3. 体重推移 (Table 2)

雌雄の全群で、観察期間中順調な体重増加がみられ、雌雄ともに媒体対照群と被験物質投与群との間に明らかな差は認められなかった。

4. 病理学検査

観察第 15 日に実施した剖検では、雌雄全例の器官・組織に異常所見は認められなかった。

【考 察】

P016 2000 mg/kg を5週齢の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD) IGS, SPF] 雌雄ラットに単回強制経口投与して単回投与時の P016 の毒性を検討した。

その結果、雌雄の 2000 mg/kg 投与群で被験物質と同様のオレンジ色の便の排泄が投与後約5時間あるいは観察第2日にみられた以外、特記すべき一般状態の変化は認められず、観察期間中順調な体重増加がみられたことから、被験物質の毒性は極めて弱いものと考えられた。また、2000 mg/kg 投与群の雄1例で観察第4日に軟便の排泄がみられたが、1例のみの変化であり、投与後3日目の所見であることから、被験物質による変化というよりもむしろ偶発的な変化であると考えられた。

なお、媒体対照群で投与日に粘液便の排泄がみられたが、これは投与した大量のコーン油によるものと考えられた。被験物質投与群では粘液便の排泄はみられなかったが、その原因は明らかではなかった。

観察第15日に実施した剖検では、雌雄全例の器官・組織に異常所見は認められなかった。

これらのことより、本試験条件下における P016 の LD₅₀ は、雌雄ともに 2000 mg/kg を上回ると推定された。

【文 献】

- 1) NPIRI Raw Material Data Handbook. Vol.4 -Pigment (1983)

Table 1-1 Clinical findings in male rats after single oral administration of PO16

| Dose (mg/kg) | Animal No. | Clinical findings | Hours after administration | | | | | | Days of observation | | | | | | | | |
|-----------------|---------------|----------------------------|----------------------------|---|---|---|---|---|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|-------|
| | | | 0~1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10~15 |
| 0 | 1 | Mucous feces | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 2 | Mucous feces | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 3 | Mucous feces | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 4 | Mucous feces | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 5 | Mucous feces | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2000 | 6 | Orange feces | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 7 | Orange feces | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 8 | Orange feces | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 9 | Orange feces Soft feces | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| | 10 | Orange feces | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |

+, positive; -, negative; The first day, the day of administration.

Table 1-2 Clinical findings in female rats after single oral administration of P016

| Dose (mg/kg) | Animal No. | Clinical findings | Hours after administration | | | | | | Days of observation | | | | | | | | |
|-----------------|---------------|-------------------|----------------------------|---|---|---|---|---|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|-------|
| | | | 0~1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10~15 |
| 0 | 11 | Mucous feces | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 12 | No abnormality | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 13 | No abnormality | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 14 | No abnormality | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 15 | Mucous feces | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2000 | 16 | Orange feces | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 17 | Orange feces | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 18 | Orange feces | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 19 | Orange feces | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 20 | Orange feces | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |

+, positive; -, negative; The first day, the day of administration.

Table 2 Body weight changes in male and female rats after single oral administration of P016

| Sex | Dose (mg/kg) | Animal No. | Days of observation period | | | | | | |
|--------|-----------------|---------------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | | 1 * | 2 | 4 | 8 | 11 | 15 | |
| Male | 0 | 1 | 121.4 | 139.6 | 158.1 | 189.9 | 208.0 | 240.2 | |
| | | 2 | 119.3 | 142.5 | 169.1 | 216.7 | 241.8 | 282.4 | |
| | | 3 | 130.8 | 151.8 | 173.5 | 217.1 | 241.9 | 286.1 | |
| | | 4 | 126.4 | 147.6 | 171.1 | 215.6 | 235.6 | 270.2 | |
| | | 5 | 132.4 | 156.6 | 177.4 | 224.9 | 250.9 | 294.8 | |
| | | Mean | 126.1 | 147.6 | 169.8 | 212.8 | 235.6 | 274.7 | |
| | | S. D. | 5.7 | 6.9 | 7.3 | 13.3 | 16.4 | 21.2 | |
| | | 2000 | 6 | 132.8 | 159.6 | 185.1 | 232.0 | 261.4 | 309.1 |
| | | | 7 | 130.0 | 157.6 | 177.9 | 218.6 | 243.1 | 278.7 |
| | | | 8 | 123.5 | 143.7 | 162.1 | 204.8 | 225.5 | 263.4 |
| | 9 | | 120.1 | 144.3 | 158.3 | 203.0 | 225.8 | 267.7 | |
| | 10 | | 126.5 | 149.2 | 168.8 | 206.2 | 230.9 | 273.0 | |
| | Mean | 126.6 | 150.9 | 170.4 | 212.9 | 237.3 | 278.4 | | |
| | S. D. | 5.0 | 7.4 | 11.1 | 12.3 | 15.2 | 18.1 | | |
| Female | 0 | 11 | 119.2 | 139.2 | 159.1 | 187.1 | 201.1 | 225.5 | |
| | | 12 | 109.4 | 127.4 | 143.9 | 173.0 | 173.6 | 190.2 | |
| | | 13 | 113.8 | 134.5 | 148.8 | 166.8 | 174.5 | 193.5 | |
| | | 14 | 114.0 | 136.1 | 154.1 | 174.0 | 176.6 | 188.7 | |
| | | 15 | 111.5 | 133.1 | 151.6 | 174.0 | 187.5 | 208.9 | |
| | | Mean | 113.6 | 134.1 | 151.5 | 175.0 | 182.7 | 201.4 | |
| | | S. D. | 3.7 | 4.4 | 5.7 | 7.4 | 11.7 | 15.7 | |
| | | 2000 | 16 | 111.7 | 136.7 | 152.4 | 176.7 | 179.3 | 199.3 |
| | | | 17 | 115.4 | 136.9 | 156.8 | 183.0 | 187.8 | 205.2 |
| | | | 18 | 115.4 | 133.5 | 151.9 | 176.9 | 181.8 | 207.8 |
| | 19 | | 113.6 | 132.7 | 146.1 | 163.2 | 167.3 | 185.4 | |
| | 20 | | 109.4 | 132.9 | 150.6 | 165.8 | 173.4 | 186.3 | |
| | Mean | 113.1 | 134.5 | 151.6 | 173.1 | 177.9 | 196.8 | | |
| | S. D. | 2.6 | 2.1 | 3.8 | 8.3 | 7.9 | 10.5 | | |

*, the day of administration; unit, g