試験番号 A-09-025

最終報告書

7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム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

要約

7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム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、観察期間中に死亡動物は認められなかった。一般状態の観察では、投与日に軟便が認められたが、観察第2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。

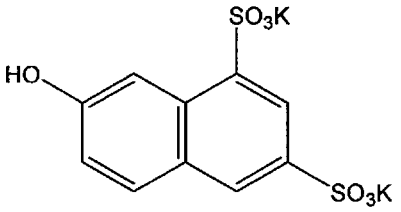
以上の結果から、7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムを2000 mg/kgの用量で単回経口投与した時、毒性は認められず、GHS(Globally Harmonized Classification System)の毒性分類はクラス5または分類該当せず、LD_{50}区切り値(LD_{50}cut－off値)は∞と判断された。

実験承認番号: 1090276A)。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 7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム(別名:dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate、CAS No.:842-18-2、分子式:$C_{10}H_6K_2O_7S_2$、分子量:380.48、外観:微黄白色、粉末、純度(無水物換算):99.9 area%(HPLC)、100.0%(イオン交換法)、水分:13.3%、Annex A)は購入し(被験物質入手:2009 年 9 月 25 日)、使用時まで冷蔵・遮光下(実測値 4～7℃)にて保管した。7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムの構造式を以下に示す。



被験物質の安定性については、本試験の投与開始前(2009 年 11 月 13 日)および投与期間終了後(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光度計(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〔Crl: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 8 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)の動物の体重は下記の通りであった。

動物入荷日	2009 年 11 月 18 日	156.2～173.6 g
検疫終了日	2009 年 11 月 25 日	172.3～219.7 g

検疫・馴化期間中に被毛の汚れおよび削痩が認められた 1 例(馴化番号 11)と、体重の上位および下位の各 1 例を除外して、体重別層化無作為抽出法により各群 3 例からなる 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終了時にペントバルビタールナトリウムによる深麻酔後に放血して、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℃、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($220^{W} \times 270^{D} \times 190^{H}$ mm)に 1 匹ずつ収容し、固型飼料(CE-2、日本クレア)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℃、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 1%カルボキシメチルセルロース・ナトリウム水溶液[CMC Na、丸石製薬(日局カルメロースナトリウム、製造番号 7213)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%液を媒体で希釈して 3.00 w/v%液を調製した。調製した検体は冷蔵・遮光下で保管し(実測値 2～6℃)、調製後 6 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℃)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 89.4～93.6%、また、各測定値のばらつきがそれぞれ平均値の 97.4～102%、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 101～104%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 25 日)に、3.00 および 20.0 w/v%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、平均含量がそれぞれ調製濃度の 86.9 および 90.1%であり、均一性も各測定値が平均値の 97.7～102%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 0.5 mL を採取し、水で希釈して試料溶液を調製した(5 μg/mL 付近)。別に被験物質約 10 mg を精密に量り、水に溶解して適宜希釈し、約 1、5 および 10 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、標準溶液から作成した検量線を用いて調製検体中の 7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム濃度を算出した。

HPLC 条件

分析カラム	Inertsil ODS-3
	(内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒子径 5 μm、ジーエルサイエンス㈱)
移動相	0.1%りん酸/メタノール混液(7:3 v/v)
流量	1.0 mL/min
カラム設定温度	30℃
試料設定温度	室温
測定波長	236 nm
試料注入量	10 μL
オートインジェクタ洗浄液	水

4. 投与方法

投与経路は「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 7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験(http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/home/paper/paper842-18-2b.html)の結果をもとに設定した。すなわち、100、300 および 1000 mg/kg の 7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムを SD 系ラット雌雄各 7 匹あるいは 14 匹(0 および 1000 mg/kg 投与群は 14 日間の回復群が設けられている。)に 28 日間、反復経口投与した結果、雌では 1000 mg/kg の投与により、ヘマトクリット値およびヘモグロビン量の高値、網状赤血球発現率の低値が観察され、300 mg/kg および 1000 mg/kg の投与により、総コレステロールの低値が認められている。雄では、1000 mg/kg の投与により、脾臓重量の低値が認められている。さらに、14 日間の回復期間により、雌に認められた血液生化学変化は回復したが、雄の脾臓重量は低値を示した。しかし、28 日間の反復投与により死亡動物は観察されず、一般状態、体重、摂餌量、尿検査、剖検および病理組織学的検査においても 7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム投与と関連した変化は認められていない。以上のことから、本被験物質を単回投与した時、死に至るには、高濃度の投与量が必要であると推定した。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 を投与開始時の投与量に選択した。

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、7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムを投与した。投与は第 1 段階(動物番号 F01001～F01003)を 2009 年 11 月 26 日、9 時 18 分～9 時 20 分の間に 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 19 分～9 時 21 分の間に投与した。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

なお、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　183.5～192.6 g

投与日(第 2 段階)　2009 年 12 月 1 日　189.7～205.9 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(観察第 1 日)の一般状態の観察は投与前に一度、投与後は 1 時間にわたり断続的に、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ナトリウム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もっとも若い 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。

一般状態では投与後 2 時間以降に計 5 例(各観察時は 1～4 例)で軟便が散見された。軟便は観察第 2 日以降には認められず、その他、最終観察日(観察第 15 日)まで一般状態の異常は認められなかった。

2. 体重(Table 2)

1 例(動物番号 F02006)の観察第 5 日および観察第 15 日の体重は、それぞれの前回の測定値と比較してわずかに減少していたが該当日の一般状態には異常は認められず、また、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

7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムの 2000 mg/kg の投与により、死亡動物は認められなかった。投与日に軟便が認められたが、翌日以降は一般状態に異常は観察されず、体重も被験物質投与による影響と考えられる変化はなく、順調に推移した。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 の単回経口投与による 7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムの毒性は認められず、GHS(Globally Harmonized Classification System)の毒性分類はクラス 5 または分類該当せず、LD_{50} 区切り値(LD_{50}cut－off値)は∞と判断された。

Table 1

Single dose toxicity study of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate 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	Step1	F01001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		F01002	-	-	-	-	-	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		F01003	-	-	-	-	-	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Step 2	F02004	-	a	a	-	a	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		F02005	-	-	-	-	-	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		F02006	-	-	-	a	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	No.of animals observed abnormal signs		0	1	1	1	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	a : Excretion, Loose stool		0	1	1	1	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2

Single dose toxicity study of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate 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	184.2	204.4	224.0	227.0	232.9	239.3
		F01002	192.6	224.3	239.6	243.6	256.1	264.5
		F01003	183.5	211.8	229.4	241.2	245.8	263.8
	Step2	F02004	203.7	228.1	236.9	239.1	246.2	249.6
		F02005	189.7	208.4	216.8	231.6	238.8	244.3
		F02006	205.9	237.0	235.3	252.1	256.8	254.1
		Mean	193.3	219.0	230.3	239.1	246.1	252.6
		±S.D.	9.6	12.7	8.7	8.9	9.4	10.2
		N	6	6	6	6	6	6

Table 3

Single dose toxicity study of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate 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