



2007年2月14日

**ソルビタンモノオクタデカノートの  
ラットを用いる急性経口投与毒性試験**

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

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

## 目次

要約 .....	1
試験目的 .....	1
材料と方法 .....	2
1. 被験物質 .....	2
2. 使用動物と飼育方法 .....	2
3. 投与検体の調製 .....	3
4. 投与方法 .....	4
5. 観察と検査 .....	4
6. データの解析 .....	4
試験成績と考察 .....	6
1. 死亡と一般状態 .....	6
2. 体重 .....	6
3. 剖検 .....	6
表 1～4	

## 要約

ソルビタンモノオクタデカノアートの概略の致死量を知るために、単回経口投与による急性毒性試験を、雌性ラット 6 匹を用い、OECD 化学物質試験法ガイドライン 423 に従って実施した。被験物質は 2,000 mg/kg の用量で投与した。その結果、15 日間の観察期間中に一般状態の異常および死亡例は認められず、観察期間中の体重推移も順調であった。また、観察最終日（観察第 15 日）に行なった剖検においても異常は認められなかった。以上の結果から、ラットを用いた単回経口投与毒性試験では、2,000 mg/kg のソルビタンモノオクタデカノアートは毒性を示さないものと判断した。また、Globally Harmonized Classification System (GHS) はクラス 5 以下 (2,000~5,000 mg/kg b.w.) に、LD50 区切り値 (LD<sub>50</sub> cut-off 値) に関してはクラス分け対象外と判断された。

## 試験目的

ソルビタンモノオクタデカノアートは米国、EU 等諸外国にて乳化、分散、可溶化剤として様々な食品に利用されているポリソルベート類の一つである。OECD 既存化学物質安全性点検等に係わる毒性調査の一環として、ラットを用いた経口投与による急性毒性を検討し、安全性評価の資料とする。

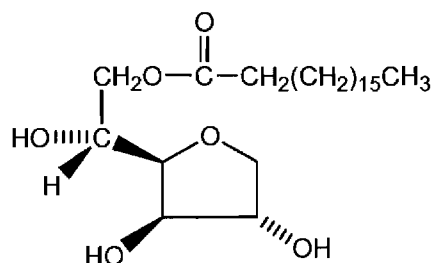
## 材料と方法

### 1. 被験物質

被験物質ソルビタンモノオクタデカノアート は、より購入し(付録 1)、用時まで室温・遮光下に保存した。被験物質の性状については下に記載した。

化学名	ソルビタンモノオクタデカノアート
別名	スパン#60
略称	SMO
英名	Sorbitan, monoctadecanoate
CAS No.	1338-41-6
分子式	$C_{24}H_{46}O_6$
分子量	430.62
物理化学的性質	性状: ごく薄い黄色結晶性小粒 融点: $53.6^{\circ}$ 溶解性: アルコール、四塩化炭素、トルエンに溶解 水、アセトン、軽油に不溶 酸価: 7.3 けん化価: 151.1

#### 構造式



### 2. 使用動物と飼育方法

7 週齢の Sprague-Dawley 系 [CrI;CD(SD), SPF] 雌性ラット(日本チャールス・リバー、厚木飼育センター)8 匹を購入し、105 号室に搬入した。動物は、許容温度  $21.0\sim 25.0^{\circ}\text{C}$ 、許容湿度  $40.0\sim 75.0\%$ 、換気回数約 15 回/時、照明 12 時間(7~19 時点灯)に設定された飼育室で、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。なお、検疫期間を含めた飼育期間中の飼育室の温湿度の実測値はそれぞれ  $23.0\sim 24.0^{\circ}\text{C}$ 、 $49.0\sim 59.0\%$ であった。また、供給した飼料および水道水には試験に支障を来す可能性のある混入物は認められなかった。

検疫と飼育環境への馴化を兼ね、搬入した動物は入荷日も含めて 9 日間飼育した。検疫期間中は個体識別のため、飼育ケージに試験番号、性別、仮動物番号を記入した動物カードを掛けた。検疫・馴化期間中 1 日 1 回、動物の一般状態を観察した結果、いずれの例でも異常は認められなかったため、検疫終了時の測定体重をもとに下位 2 匹を棄却し、残り 6 匹について体重別層化無作為抽出法により 1 群あたり 3 匹の 2 群に群分けを行い、試験に使用した。なお、試験に使用しなかった 2 匹は、同じ動物室内で飼育を続け、2005 年 6 月 8 日に炭酸ガスにより安楽殺した。

群分け後は個体識別のため、尾にフェルトペンで一連の動物番号を標識した。また、投与段階

毎に色彩で識別した動物カードに、試験番号、性別、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。

入荷日 2005年5月16日      入荷時体重 159.4～180.7 g  
投与日 2005年5月25日      投与時体重 188.7～200.5 g

### 3. 投与検体の調製

被験物質 6.000 g を秤量し、乳鉢で磨砕後、媒体(日局注射用水;光製薬、ロット番号; A4ZCT1)を加えて懸濁状態とし、これをメスシリンダーに移した。媒体を加えて全量を 30 mL とし、濃度 20%(w/v)の懸濁液として使用した。投与に先立ち、2005年5月25日に調製した投与検体から検体を 3 回採取し、被験物質の含量を測定して、含量および均一性が規程範囲内(含量については調製指示値の 85.0～115%、均一性については各測定値のバラつきが平均値の 90.0～110%以内)であることを確認した(付録 2 および 3)。

調製検体中の被験物質濃度の測定は以下の手順で行った。調製検体 0.5 mL を採取し、エタノールを加えて 50 mL とした後、さらにその 1 mL にエタノールを加えて 10 mL とした。その溶液 1 mL を採り、窒素気流下 60°C で蒸発乾固後、0.5N 水酸化カリウムメタノール溶液 0.4 mL を加え、60°C で 20 分間加熱して加水分解した。さらに、三フッ化ホウ素メタノール錯体メタノール溶液 0.4 mL を加え、60°C で 5 分間加熱することにより誘導體化した。放冷後、内標準物質 1 mL および飽和塩化ナトリウム水溶液 0.8 mL を加え、3,000 rpm で 5 分間遠心分離して試料溶液とした。

検量線は被験物質 50 mg を秤取、四塩化炭素に溶解して 50 mL とし、これを四塩化炭素で適宜希釈して標準溶液(100、200、300、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を調製、測定して作成した。内標準物質のアジピン酸-n-ブチル(東京化成、ロット番号; AGM01)は、50 mg をヘキサンに溶解、希釈して 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度の溶解液として用いた。

試料溶液および標準溶液は内標準法を用いたガスクロマトグラフ(GC)法により測定した。GC 測定条件を下記に示す。

#### GC 測定条件

分析カラム	TC-FFAP (内径 0.32 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 $\mu\text{m}$ 、ジーエルサイエンス)
キャリアーガス	ヘリウム
カラム入口圧	102 kPa(2.0 mL./min)
注入口温度	250°C
試料気化室温度	250°C
カラム温度	180°C
試料注入量	2 $\mu\text{L}$
試料導入法	スプリット注入法(10:1)
検出器	水素炎イオン化検出器(FID)

なお、本被験物質は UV 法では目的とする感度が得られないことから、GC 分析法について検討し、本被験物質を予め加水分解処理した後、構造特性を保有している脂肪酸側鎖を測定する方法で含量測定を行った。本定量法は被験物質を一旦、加水分解処理するため、被験物質の全

構造についての安定性を確認することはできないが、本被験物質が化学的に著しく不安定な構造は有していないこと、さらに、本試験が比較的短い期間で終了することから安定性試験を実施しなかった。

#### 4. 投与方法

OECD 化学物質試験法ガイドライン 423 に従って投与経路は経口投与とした。被験物質のラット経口投与時の 50% 致死量については 31 g/kg との報告がある (RTECS ; Number : WG2933500)。さらに、本試験に先立って実施した観察期間 3 日間の予備試験において 2,000 mg/kg 投与後に何ら毒性作用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 423 で推奨されている最大投与量である 2,000 mg/kg を選択した。また、本試験では第一段階投与 1 時間後において何ら毒性兆候が認められなかったため、速やかに第二段階の投与を行った。

動物を投与前日の 16 時から絶食させた後、直前に測定した体重を基に個体別に投与液量を算出し、ラット用胃管を用いて単回経口投与した。投与は第一段階(動物番号1~3)を 10 時 03 分~10 時 05 分の間に、第二段階(動物番号 4~6)を 11 時 05 分~11 時 06 分の間に行い、各々投与 3 時間後から給餌を行った。

#### 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、死亡の有無を確認した。一般状態の観察を、投与当日は投与前および投与後 1 時間にわたって継続的に、その後は 1 時間間隔で投与後 6 時間まで実施し、観察第 2 日以降は、毎日 1 回の頻度で行った。体重は、投与直前、観察第 2、4、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放血致死させて剖検し、外表、皮下および主要器官(脳、下垂体、眼球、ハーダー腺、顎下腺、下顎リンパ節、心臓、肺、気管、胸腺、甲状腺、舌、食道、消化管、腸間膜リンパ節、肝臓、膵臓、脾臓、副腎、腎臓、膀胱、大動脈、生殖器、大腿骨骨髓、乳腺および皮膚)を観察し、各投与段階の動物番号の若い 1 例(動物番号 1 および 4)の主要器官・組織(脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、消化管)を 0.1 M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定保存した。

#### 6. データの解析

体重の平均値および標準偏差を算出した。

## 試験成績と考察

### 1. 死亡と一般状態

15 日間の観察期間中に死亡および一般状態の異常は観察されなかった(表 1 および 2)。

### 2. 体重

全動物が投与日から観察終了日まで順調な体重増加を示した(表 3)。

### 3. 剖検

全動物で異常所見は認められなかった(表 4)。

以上の結果から、ソルビタンモノオクタデカノアートはラットにおいて2,000 mg/kgの単回経口投与では何ら毒性を示さないものと判断された。Globally Harmonized Classification System (GHS) はクラス 5 以下(2,000~5,000 mg/kg b.w.)に、LD50 区切り値(LD<sub>50</sub> cut-off 値)に関してはクラス分け対象外と判断された。

表1 ソルビタンモノオクタデカノアート 2,000 mg/kg 単回経口投与を行った雌性ラットの死亡数

投与用量 (mg/kg)	投与 段階	動物数	観察日														死亡率	
			1 <sup>a)</sup>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		15
2,000	第一段階	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3
2,000	第二段階	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3

a) 投与日(2005年5月25日)



表2 ソルビタンモノオクタデカノアート 2,000 mg/kg 単回経口投与を行った雌性ラットの一般状態

投与用量 (mg/kg)	投与 階段	動物 番号	観察された 症状	投与後時間						観察日 2~15(日)	
				1		2	3	4	5		6
				0~30	31~60 (分)						
2,000	第 一 段 階	1	異常	-	-	-	-	-	-	-	
		2	異常	-	-	-	-	-	-	-	
		3	異常	-	-	-	-	-	-	-	
	第 二 段 階	4	異常	-	-	-	-	-	-	-	
		5	異常	-	-	-	-	-	-	-	
		6	異常	-	-	-	-	-	-	-	

-:陰性

表3 ソルビタンモノオクタデカノアート 2,000 mg/kg 単回経口投与を行った雌性ラットの体重推移

投与 段階	動物番号	試 験 期 間 (日)					
		1 <sup>a)</sup>	2	4	8	11	15
第 一 段 階	1	198.5	225.7	236.2	247.3	260.6	276.0
	2	192.1	224.0	228.9	239.9	242.0	251.4
	3	188.7	217.9	220.3	230.2	243.7	252.6
	例数	3	3	3	3	3	3
	平均	193.1	222.5	228.5	239.1	248.8	260.0
	標準偏差	5.0	4.1	8.0	8.6	10.3	13.9
	4	200.5	225.2	234.9	244.0	254.1	260.4
第 二 段 階	5	192.6	219.7	236.5	245.6	260.2	269.4
	6	199.3	217.2	228.8	240.5	254.4	262.9
	例数	3	3	3	3	3	3
	平均	197.5	220.7	233.4	243.4	256.2	264.2
	標準偏差	4.3	4.1	4.1	2.6	3.4	4.6

体重の表示は g

a) 投与日

表 4 ソルビタンモノオクタデカノアート 2,000 mg/kg 単回経口投与  
を行った雌性ラットの生存例の剖検所見

投与段階	動物番号	剖検所見
第 1 段階	1	異常なし
	2	異常なし
	3	異常なし
第 2 段階	4	異常なし
	5	異常なし
	6	異常なし