

最終報告書

表 題：ディスパーズレッド 206 のラットにおける急性経口投与毒性試験

試験番号：SR-9985

目次

	頁
要約	3
緒言	4
材料および方法	4
成績	8
考察	9
参考文献	9
Figures	添付
1 Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9985)	
2 Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9985)	
Tables	添付
1 Experimental design for acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) in rats (SR-9985)	
2 Mortality and LD ₅₀ of rats in acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9985)	
3 General appearance of rats in acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9985)	
4 Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9985)	
5 Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9985)	
6 Gross findings of rats in acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9985)	

要 約

雌雄のラットに 2000 mg/kg のディスパーズレッド 206 を単回経口投与して 14 日間観察し、その毒性を検討し、以下の成績を得た。

1. 死亡例は、雌雄ともに認められなかった。
2. 一般状態では、雌雄ともに異常は認められなかった。
3. 体重推移では、雌雄の 2000 mg/kg 群で対照群との間に有意差は認められなかった。
4. 剖検では、雌雄の 2000 mg/kg 群に異常所見は認められなかった。

以上のことより、2000 mg/kg のディスパーズレッド 206 をラットに単回経口投与した場合に毒性徴候の発現しないことが確認され、本試験条件下での LD₅₀ 値は 2000 mg/kg 以上であると推定された。

緒 言

雌雄のラットに 2000 mg/kg のディスパーズレッド 206 を単回経口投与して 14 日間観察し、その毒性を検討した。

材料および方法

1. 被験物質

被験物質であるディスパーズレッド 206 (CAS No. : 26630-87-5 および 129710-76-5) は分子式 $C_{28}H_{26}ClN_5O_5S$ 、分子量 579.5、融点 $150^{\circ}C$ 以上、比重 約 0.5 の赤黒褐色で無臭の粉末である。提供者

より受入れたディスパーズレッド 206 (ロット番号 :) には不純物として水 60.9% が含まれていたことから、乾燥させて粉末としたものを被験物質として使用した。乾燥後の被験物質の水分含量は 0.28% であることが提供者により確認されている。被験物質は気密容器に入れ、冷所 (実測範囲 $4\sim 9^{\circ}C$) に保存した。被験物質サンプルとして、上記ロットについて約 1 g を採取し、試験施設の検体保存室に保存した。試験期間中の被験物質の安定性については、残余被験物質を用いて提供者である

が純度の分析を行ない確認した (Appendix 1~4)。

2. 対照物質

対照物質には、0.5%メチルセルロース水溶液を使用した。0.5%メチルセルロース水溶液は、メチルセルロース 400 cP (ロット番号 : ACN3463、和光純薬工業株式会社) を精秤し、日本薬局方精製水 (ロット番号 : 05A1、ヤクハン製薬株式会社) に溶解し、被験物質の溶媒および対照群の投与液として使用した。

3. 投与液の調製および化学分析

(1) 投与液の調製

投与 2 日前に、被験物質を乳鉢で研磨後、精秤し、200 mg/mL の濃度になるように 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁した。調製液は調製後速やかに遮光気密容器に入れ、冷暗所 (実測範囲 $2.3\sim 7.6^{\circ}C$) に保存した。残余被験物質は焼却処分とした。

(2) 投与液の化学分析

投与に先立って 50 および 200 mg/mL の調製液について安定性の分析を行なった結果、室温で 24 時間、冷暗所保存で 7 日間の安定性が確認された (Appendix 5)。また、50 および 200 mg/mL の調製液について均一性が確認された (Appendix 6)。

以下の手順に従って、本試験に用いた濃度 (20 mg/mL) の被験物質調製液について濃度の確

認を行なった。

ディスパーズレッド 206 を N,N-ジメチルホルムアミドに溶解後、0.5%メチルセルロース水溶液を添加し、さらに N,N-ジメチルホルムアミドを加え 1.00 mg/mL の標準溶液を調製した。

200 mg/mL の被験物質調製液に N,N-ジメチルホルムアミドを加え、1 mg/mL の試料溶液を調製した。

HPLC システム（日立製作所）の測定条件は以下のように設定した。

カラム	: 特殊仕様 (HITACHI GEL #3053) 、4 mm × 150 mm
移動相	: アセトニトリル : 蒸留水 : りん酸 (60 : 40 : 0.5)
測定波長	: 528 nm
流量	: 1.5 mL/min
カラム温度	: 30°C
Autosampler 温度	: 約7°C
感度	: 0.4 V
注入量	: 10 μL
分析時間	: 22 分

Autosampler 洗浄液 : アセトニトリル : 蒸留水 (60 : 40)

標準溶液および試料溶液を HPLC に注入し、ディスパーズレッド 206 のピーク面積を測定した。標準溶液のピーク面積と濃度から、調製液濃度および含有率を以下の式により算出した。

$$[\text{調製液濃度 (mg/mL)}] = [\text{標準溶液の濃度 (mg/mL)}] \times [\text{試料溶液のピーク面積/標準溶液のピーク面積平均値}] \times \text{希釈係数}$$

$$[\text{含有率 (\%)}] = [\text{被験物質調製液の濃度}] \div [\text{被験物質調製液の表示濃度}] \times 100$$

濃度確認の結果、含有率は規定範囲内（含有率：90 ~ 110%）であることが確認された (Appendix 7)。

以上の分析は株式会社 化合物安全性研究所において行なった。

4. 試験方法

(1) 試験系

試験には、日本チャールス・リバー株式会社 厚木飼育センター生産の SD 系ラット (SPF、Crj:CD(SD)IGS) を用いた。ラットはこの種の試験で通常用いられている動物種であり、当研究所での使用経験が豊富であることからこの系統を選定した。

雌雄それぞれ 13 匹を 2000 年 7 月 19 日に 4 週齢で購入した。受入時の動物の体重範囲は、雄で 67~85 g、雌で 71~79 g であった。

(2) 検疫および馴化

受入後、全例について検疫および馴化期間を7日間とし、一般状態を1日1回観察するとともに、体重測定を2回行なった。検疫および馴化期間中、動物に異常はみられなかった。

(3) 群分け

検疫および馴化期間終了後、健康な動物を雌雄それぞれ10匹選抜して、5週齢で試験に供した。検疫および馴化期間の終了日（投与前日）の体重に基づいて層化無作為抽出法により各群の平均体重が均一になるように投与前日に群分けを行なった。これらの動物の体重範囲は、雄で131～146 g、雌で119～128 gであり、平均体重（雄138.1 g、雌124.4 g）の±20%以内であった。選抜から外れた動物は試験から除外した。

(4) 動物およびケージの識別

動物は、油性フェルトペンで尾部に印を付け、個体識別を行なった。飼育ケージには、群分け前は性別毎に色分けしたラベルに、試験番号および動物番号を明記し、各ケージの前面に標示した。群分け後は性別毎に色分けしたラベルに、試験番号、試験群および動物番号を明記し、各ケージの前面に標示した。

(5) 動物飼育

1) 飼育環境

動物を温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ （実測範囲 $21 \sim 23^{\circ}\text{C}$ ）、湿度 $55 \pm 10\%$ （実測範囲 $50 \sim 70\%$ ）、換気回数 $10 \sim 15$ 回/時間、照明時間12時間（午前8時点灯、午後8時消灯の人工照明）の動物飼育室（302号室）で飼育した。動物飼育室の温度および湿度を毎日監視したが、動物の健康に影響を及ぼすと考えられるような設定範囲からの逸脱は認められなかった。

2) 飼育器材および飼育方法

雌雄別にブラケット式金属製金網床ケージ（ $260\text{W} \times 380\text{D} \times 180\text{H}$, mm）に、検疫および馴化期間中は1または3匹、群分け後は1匹収容した。ケージおよび給餌器は群分け時に1回、受皿は週2回洗浄滅菌済のものと交換した。自動給水装置の水抜きは週1回実施した。動物飼育室内の清掃および清拭消毒は、1日1回の頻度で実施した。清拭消毒に際しては、塩素系消毒薬およびヨウ素系消毒薬を1週間単位で交互に使用した。

3) 飼料

オリエンタル酵母工業株式会社製γ線照射固型飼料、CRF-1を、金属製給餌器を用いて自由に摂取させた。ただし、投与前の17～18時間と投与後約4時間は給餌しなかった。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質あるいは微生物の有無を、使用したロット（000405、000509）の飼料について分析した。汚染物質の分析は財団法人日本食品分析センターにおいて、微生物検査は飼料製造業者がそれぞれ行なった。分析項目と許容基準値は株式会社 化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも

許容基準値を超える値は認められなかった (Appendix 8-1、8-2、9-1、9-2)。

4) 飲料水

札幌市水道水を、自動給水装置を用いて自由に摂取させた。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質の有無を、2000年4月12日、2000年7月19日および2000年10月18日に試料を採取して分析した。分析は日本衛生株式会社において行なった。分析項目と許容基準値は株式会社 化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容基準値を超える値は認められなかった (Appendix 10-1~10-3)。

(6) 試験群の構成

試験群の構成および各群の動物番号を Table 1 に示す。

ディスパーズレッド 206 の 2000 mg/kg 群ならびに 0.5%メチルセルロース水溶液のみを投与する対照群の全 2 群を設定した。

(7) 被験物質の投与

1) 投与量の設定

投与量はディスパーズレッド 206 のラットにおける急性経口投与毒性試験のための予備試験¹⁾の結果に基づいて設定した。予備試験では 2000 mg/kg のディスパーズレッド 206 を雌雄各 3 匹の Crj:CD(SD) IGS ラットに 1 回経口投与した結果、死亡が認められなかったため、OECD 試験法ガイドライン(401)で定められている限界投与量である 2000 mg/kg を設定し、被験物質の溶媒である 0.5%メチルセルロース水溶液のみを投与する対照群を設けた。

2) 投与

ディスパーズレッド 206 がヒトに経口的に暴露される可能性を考慮し、17~18 時間の絶食後、胃ゾンデを用いて胃内に強制的に 1 回経口投与した。投与後約 4 時間経過した時点で給餌を再開した。

投与容量は 10 mL/kg とし、各個体の投与液量は投与日の体重に基づいて算出した。

(8) 観察、測定および検査項目

1) 一般状態観察

全例について、動物の生死、外観、行動等を投与日 (投与後 0 日) の投与直後から投与後 1 時間までは連続して観察し、投与後 2 時間から 6 時間までは約 1 時間間隔で観察した。投与後 1 日から 14 日の剖検日までは、1 日 1 回観察した。異常が認められる場合は、その症状ならびに症状の発現および消失が観察された時刻を記録した。

2) 体重測定

全例について、動物の体重を 0 (投与日の投与前)、投与後 1、3、5、7、10 および 14 日 (剖検日) に、電子天秤 (ザルトリウス 1401 B MP7-2 および 1407 MP8-1、カールツァイス

株式会社)を用いて測定した。

体重増加量および体重増加率を以下の計算式により算出した。

$$\text{体重増加量} = (\text{投与後 14 日体重}) - (0 \text{ 日体重})$$

$$\text{体重増加率} = [(\text{体重増加量}) / (0 \text{ 日体重})] \times 100$$

3) 剖検

投与後 14 日に、全例の体外表を観察した後、エーテル麻酔下で放血致死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。以下の器官・組織を 10%中性緩衝ホルマリン液に固定・保存した。ただし、精巣および精巣上体の固定にはブアン液を、保存には 70%エタノール液を使用した。

脳(大脳および小脳)、肝臓、腎臓(左右)、脾臓、心臓、肺(気管支含む)、胃(前胃および腺胃)、十二指腸、空腸、回腸(パイエル板を含む)、盲腸、結腸、直腸、精巣(左右)、精巣上体(左右)および卵巣(左右)

4) 病理組織学的検査

剖検でディスパーズレッド 206 投与の影響と考えられる肉眼的異常所見が認められなかったため、病理組織学的検査は実施しなかった。

5. 統計学的方法

体重、体重増加量および体重増加率について Bartlett の検定法を行ない、等分散性を解析した。等分散の場合 ($p > 0.05$) は一元配置分散分析法で解析し、不等分散の場合 ($p \leq 0.05$) は Kruskal-Wallis の検定法で解析した。一元配置分散分析の結果、有意差がみられた場合 ($p \leq 0.10$) は Dunnett の検定法を用いて対照群との比較を行なった。Kruskal-Wallis 法の解析の結果、有意差がみられた場合 ($p \leq 0.10$) は Mann-Whitney の U-検定法を用いて対照群との比較を行なった。なお、対照群との比較検定については、群の平均および標準偏差を使用し、危険率 5%以下を統計学的に有意とした。

成 績

1. 死亡状況および LD₅₀ 値

死亡状況および LD₅₀ 値を Table 2 に示す。

死亡例は、雌雄ともに認められなかった。LD₅₀ 値は、雌雄ともに 2000 mg/kg 以上であると推定された。

2. 一般状態

一般状態の成績を Table 3、INDIVIDUAL DATA 1-1-1~1-2-2 に示す。

雌雄ともに異常は認められなかった。

3. 体重

体重推移を Figure 1 および 2、Table 4 および 5 ならびに INDIVIDUAL DATA 2-1-1~2-2-2 に示す。

雌雄ともに 2000 mg/kg 群と対照群との間に有意差は認められなかった。

4. 剖検

剖検所見を Table 6、INDIVIDUAL DATA 3-1-1~3-2-2 に示す。

雌雄ともに異常所見は認められなかった。

考 察

雌雄のラットに 2000 mg/kg のディスパーズレッド 206 を単回経口投与して 14 日間観察し、その毒性を検討した。

死亡例は雌雄ともに認められず、LD₅₀ 値は 2000 mg/kg 以上であると推定された。

一般状態、体重推移および剖検では、雌雄ともにディスパーズレッド 206 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。

以上のことより、2000 mg/kg のディスパーズレッド 206 をラットに単回経口投与した場合に毒性徴候の発現しないことが確認され、本試験条件下での LD₅₀ 値は 2000 mg/kg 以上であると推定された。

参考文献

- 1) ディスパーズレッド 206 のラットにおける急性経口投与毒性試験のための予備試験 (SR-9985P) : 最終報告書、株式会社 化合物安全性研究所 (2000)

Figures

Figure 1 Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9985)

Figure 2 Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9985)

Tables

Table 1 Experimental design for acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) in rats (SR-9985)

Table 2 Mortality and LD₅₀ of rats in acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9985)

Table 3 General appearance of rats in acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9985)

Table 4 Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9985)

Table 5 Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9985)

Table 6 Gross findings of rats in acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9985)

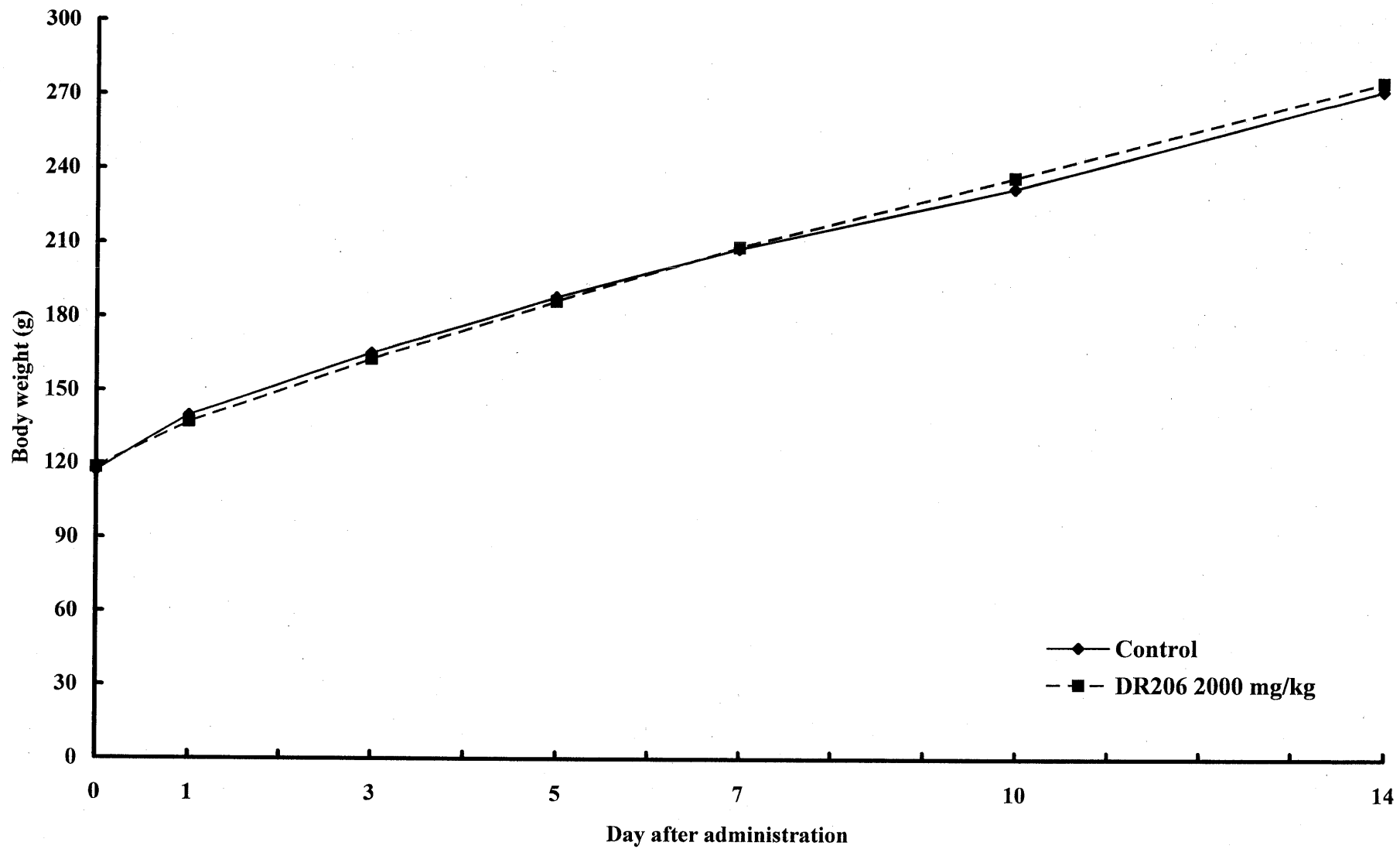


Figure 1 Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9985)

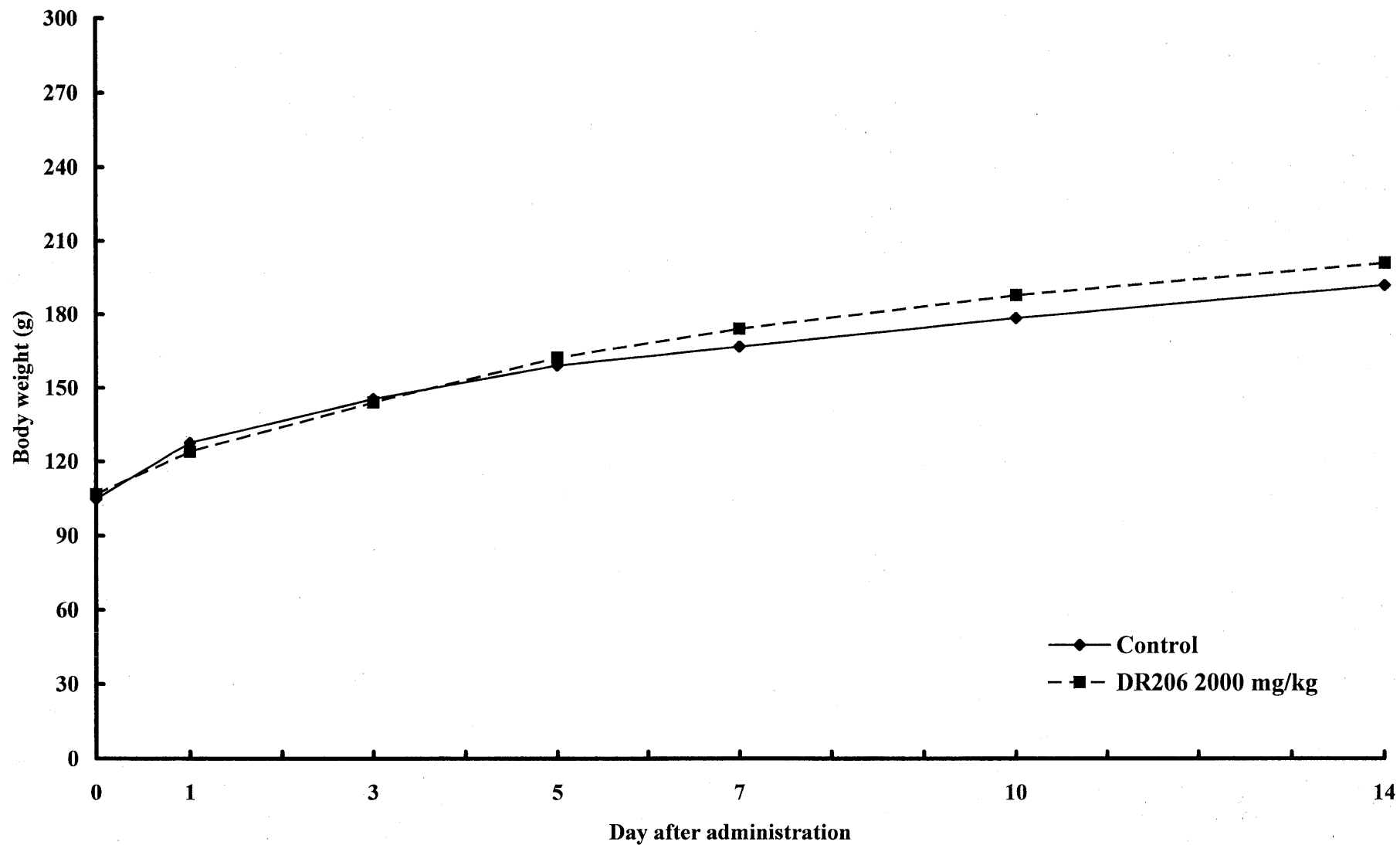


Figure 2 Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9985)

Table 1 Experimental design for acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) in rats (SR-9985)

Group	Concentration of DR206 (mg/mL)	Volume (mL/kg)	No. of animals ^a (Animal No.)	
			Male	Female
Control ^b	0	10	5(101-105)	5(151-155)
DR206 2000 mg/kg ^c	200	10	5(201-205)	5(251-255)

a: Crj:CD(SD)IGS rats were dosed orally at the age of 5 weeks.

b: Rats in the control group were treated with 0.5% methyl cellulose solution.

c: DR206 was suspended in 0.5% methyl cellulose solution.

Table 2 Mortality and LD₅₀ of rats in acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9985)

Sex	Group	Distribution of dead animals		Mortality ^b	LD ₅₀ value
		0 ^a	1-14		
Male	Control	0	0	0/5	>2000 mg/kg
	DR206 2000 mg/kg	0	0	0/5	
Female	Control	0	0	0/5	>2000 mg/kg
	DR206 2000 mg/kg	0	0	0/5	

a: Days after administration

b: No. of dead animals / no. of animals dosed

Table 3 General appearance of rats in acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9985)

Sex	Group	Findings	Days after administration	
			0	1-14
Male	Control	No. of animals examined	5	5
		No abnormal findings	5 ^a	5
	DR206 2000 mg/kg	No. of animals examined	5	5
		No abnormal findings	5	5
Female	Control	No. of animals examined	5	5
		No abnormal findings	5	5
	DR206 2000 mg/kg	No. of animals examined	5	5
		No abnormal findings	5	5

a: Values are no. of animals with findings.

Table 4 Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9985)

Group	No. of animals	Day after administration							Body weight gain	
		0	1	3	5	7	10	14	Day 0-14	^a %
Control	5	^b 117.0	139.8	165.2	188.0	207.8	232.2	271.6	154.6	132.300
		3.7	5.9	5.6	4.8	3.5	5.8	3.2	4.2	6.995
DR206 2000 mg/kg	5	118.2	136.8	162.6	186.4	208.4	236.6	275.0	156.8	132.856
		5.1	5.5	6.3	8.4	7.4	9.3	12.2	11.3	11.198

a: (Body weight gain / body weight on day 0) x 100.

b: Values are means and S.D., and expressed in gram.

Table 5 Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9985)

Group	No. of animals	Day after administration							Body weight gain	
		0	1	3	5	7	10	14	Day 0-14	^a %
Control	5	^b							87.2	83.064
		104.8	127.6	145.4	159.2	167.0	178.6	192.0		
DR206 2000 mg/kg	5	106.6	124.0	144.0	162.4	174.2	187.8	201.0	94.4	88.634
		3.5	2.9	6.4	9.6	13.0	18.9	16.5	16.1	15.268

a: (Body weight gain / body weight on day 0) x 100.

b: Values are means and S.D., and expressed in gram.

Table 6 Gross findings of rats in acute oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9985)

Item	Male		Female	
	Control	DR206	Control	DR206
		2000 mg/kg		2000 mg/kg
No. of animals examined	5	5	5	5
Organ: Findings	^a			
Abnormal findings	0	0	0	0

a: Values are no. of animals with findings.