最 終 報 告 書

C.I. フルオレセントブライトナー271 のラットを用いる急性経口投与毒性試験

試験番号：7812 (115－177)

平成 17 年 12 月 14 日

試験委託者
厚生労働省　医薬食品局

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

目　次

1.　要約 3

12.　被験物質 6
13.　試験材料および方法 8
14.　試験結果 13
15.　考察および結論 14

Tables

Table 1　Mortality 16
Table 2　Clinical observation 17
Table 3　Body weight 18
Table 4　Gross finding 19
Table 5　Histological finding 20

1. 要約

雌6匹のCrj:CD(SD)IGSラットを用いてC.I. フルオレセントブライトナー271の急性経口毒性試験を実施した.

C.I. フルオレセントブライトナー271は注射用水に溶解し，2000 mg/kgの用量を単回強制経口投与した.

観察期間は14日間とし，一般状態の観察，死亡動物の確認，体重推移および病理学検査を実施した．その結果は次の通り要約される.

死亡例は認められなかった.

一般状態の観察では投与後当日に6例全例に下痢が観察されたが，いずれの動物も投与翌日には回復した.

観察終了時の体重測定において，体重の減少あるいは体重増加抑制が認められた.

観察期間終了時の解剖において，腎臓の淡色，肝臓の白色結節，び漫性の赤色斑，肺の赤色斑点および横隔膜の菲薄が認められた.

肉眼観察で異常のみられた動物のうち1例について病理組織学検査を実施したところ，肺に炎症細胞浸潤，マクロファージの出現，肺胞壁の肥厚および出血が，肝臓に多発性巣状壊死および単細胞壊死，出血，炎症細胞の浸潤ならびに被膜炎等が，腎臓に皮質尿細管壊死，尿細管上皮の変性および空胞化がそれぞれ観察された.

以上の結果から，当該試験条件下においてC.I. フルオレセントブライトナー271の単回投与後14日間観察時におけるLD_{50}値は2000 mg/kgより高用量であり，GHS分類のCategory 5に該当すると判断された.

12. 被験物質

12.1. 被験物質名

C.I. フルオレセントブライトナー271

（英名：1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-,hexasodium salt）

12.2. ロット番号

12.3. 純度／含量

91.0%

12.4. 不純物の名称および濃度

NaCl：0.32%, Na_2SO_4：0.01%, 水：6.3%

残り 2.37%不明（各成分 1%未満）

12.5. 製造元

12.6. 保存条件

室温

12.7. 保存場所

安評センター被験物質保管庫（F-3：実測値 19～23.8℃, 2004 年 10 月 5 日～2004 年 12 月 10 日）

12.8. CAS No.

41267-43-0

12.9. 化学名

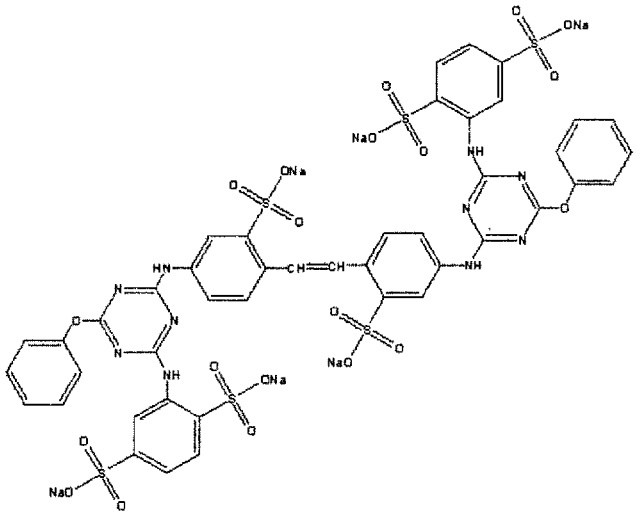
1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-,hexasodium salt

12.10. 一般名

スチルベン系蛍光増白剤

フルオレスセント－271

12.11.　化学構造



12.12.　分子式

$C_{44}H_{28}N_{10}Na_6O_{20}S_6$

12.13.　分子量

1347.08

12.14.　物質の状態

淡黄色結晶

12.15.　溶解性

水に可溶，有機溶媒に不溶～難溶

12.16.　残余被験物質の処理

安定性分析のため，被験物質等管理責任者を介して　　へ返却した．分析の結果（2005 年 10 月 27 日付報告），被験物質が安定であることが確認された．

13. 試験材料および方法

13.1. 試験動物

供試した Crj:CD(SD)IGS ラット[SPF]は，日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センターから 7 週齢で雌 13 匹を搬入した.

動物は検収後，9～10 日間検疫を行い，試験環境に検疫・馴化させ，8 週齢で投与した.

初回絶食日に全例の体重を測定し，最も体重が大きい動物から順に 3 匹選び，これらを初回投与に用いた．2 回目の投与も同様にして順次 3 匹選んだ.

動物の識別は，搬入時に連続番号を耳介に入墨することにより行った．投与時の体重は 191～201 g であった.

13.2. 試験系の選択理由

げっ歯類の種は試験ガイドラインで推奨されている雌ラットを選択した．系統は背景データ，感染性疾患に対する抵抗性および遺伝的安定性などを考慮して選択した.

13.3. 飼育管理

動物は，202 号飼育室（W 3.6 × D 10.0 × H 2.5 m，90 m^3）で飼育し，環境調節の基準値は温度 23±3°C（実測値：23.5～24.2°C），相対湿度 55±20%（実測値：48～78%），換気回数 1 時間 8 回以上，照明 12 時間（午前 7 時点灯，午後 7 時消灯）とした.

株式会社 東京技研サービス製の水洗式飼育機を使用し，ステンレス製網目飼育ケージ（W 21.5 × D 27.5 × H 19.5 cm，飼育ケージ・スペース 11529 cm^3）に動物を 1～3 匹ずつ収容した．飼育ケージは隔週 1 回，給餌器は週 1 回取り換えた.

飼料として，オリエンタル酵母工業株式会社製造の固型飼料 MF（Lot No. 040705, 041102）を自由に摂取させた．使用した飼料中の汚染物質の分析は，ロット番号毎に財団法人 日本食品分析センターで行い，日本実験動物飼料協会案の許容基準値内であることを確認した.

飲水として，水道水を自動給水ノズルから自由に摂取させた．水道水の水質について，水道法に基づいた水道水の検査を 3 ヵ月に 1 回株式会社 エコプロ・リサーチで行い，水質検査を実施しない月に関しては安評センターにて細菌検査（一般細菌および大腸菌検査）を実施した．検査値が SOP に記載されている上水道水質基準（平成 15 年 5 月 30 日厚生労働省令第 101 号）の基準値内であることを確認した.

13.4. 試験群の構成および投与量設定理由

13.4.1. 試験群の構成

用量 (mg/kg)	性	動物数	動物番号
2000 (1回目)	雌	3	2101～2103
2000 (2回目)	雌	3	2104～2106

13.4.2. 投与量設定理由

被験物質の情報から毒性が弱いことが想定されたため 2000 mg/kg を初回投与量とし，2 回目の投与量の選択については Annex 1 のフローチャートに示された手順に従った．

れた時間以内に使用した.

13.6. 投与液中の被験物質の分析

投与液中の被験物質の濃度および安定性は，当センター代謝分析グループにおいて測定した．また，濃度分析までに投与液の分析法について，高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用いたバリデーション(標準溶液の注入再現性および直線性ならびに特異性)および分光光度計を用いたバリデーション（標準溶液の測定再現性および直線性，特異性，標準溶液の安定性）を実施した．その結果，HPLC を用いたバリデーションでは標準溶液の注入再現性および特異性は判定基準を満たしていたが，直線性は判定基準を逸脱した．一方，分光光度計を用いたバリデーションでは各バリデーション項目［標準溶液の測定再現性および直線性，特異性，標準溶液の安定性］の判定基準を満たしていた．したがって，分光光度計による分析法が，注射用水中の被験物質濃度の測定法として適用しうるものと判断し，投与液の安定性分析および濃度分析は分光光度計による分析法を用いて実施した．なお，分析法および結果の詳細を Reference data 1 に示した.

13.6.1. 投与液の安定性分析

投与液（0.5 および 200 mg/mL）を調製した．これらの投与液を遮光条件下で調製直後，室温 2 および 4 時間以上放置後にそれぞれ 3 点ずつ採取し，投与液中の被験物質の濃度を測定した．得られた測定結果から濃度平均値を算出し，調製直後の濃度平均値（初回算出濃度平均値）に対する割合を算出した．調製直後の濃度平均値に対する割合が 90～110%であれば安定と判断した．なお，保存中の温度変化を温度記録計（TempTale, センスティック）を用いて記録した.

被験物質の各濃度における安定性は，各設定濃度（0.5 および 200 mg/mL）において，調製直後の濃度平均値（初回算出濃度平均値）に対して，遮光条件下室温に 2 および 4 時間以上放置した後の 0.5 mg/mL 溶液では 99.8 および 100.4, 200 mg/mL 溶液では 100.3 および 99.7%であった．また放置時の実測温度は 24.4～24.7°C であった．したがって，これらの条件下において投与液中の被験物質は安定であったと考えられる.

13.6.2. 投与液の濃度分析

2004 年 12 月 2 日および 2004 年 12 月 3 日に調製された投与液（200 mg/mL）について濃度分析を実施した．投与液から 1 mL ずつ無作為に 3 回採取して濃度を測定した．得られた測定結果から濃度平均値および濃度平均値の設定濃度に対する割合を算出した．濃度平均値の設定濃度に対する割合が 90～110%であれば投与液は適切に調製されていると判断した.

2004 年 12 月 2 日および 2004 年 12 月 3 日に調製された投与液の濃度平均値は設定濃度（200 mg/mL）に対し，101.2～103.6%であった．したがって，投与液は適切に調製さ

れたと考えられた.

13.7. 投与経路の選択理由および投与方法

投与経路は準拠する試験ガイドラインに従い経口とした.

投与前約 16 時間絶食させた動物に胃ゾンデを用いて単回強制経口投与した. 投与容量は体重 100 g あたり 1 mL とし, 個体別に測定した体重に基づいて投与量を算出した. 投与後約 3 時間に給餌した.

13.8. 投与期間および観察期間

単回投与とし, 観察期間は 14 日間とした.

13.9. 一般状態の観察

中毒症状および生死の観察は, 投与後 6 時間までは 1 時間間隔, 投与翌日からは 1 日 1 回実施した.

13.10. 体重

体重は投与直前, 投与後 7 および 14 日に電子天秤 (PM4800, メトラー・トレド) を用いて測定した.

13.11. 病理学検査

観察終了時に全ての動物をエーテル麻酔後放血死させ解剖し, 主要な器官・組織を肉眼的に観察した. 全ての動物の異常が認められた器官・組織を 10%中性緩衝ホルマリン液に保存した.

13.11.1. 病理組織学検査

病理組織学検査は 2000 mg/kg 群の雌 1 例 (Animal ID No. 2101 (個体識別番号 : 7)) で観察期間終了時の剖検時に観察された肝臓の赤色斑および白色結節, 腎臓の淡色化, 肺の赤色斑について実施した. 切り出しは病変部位について行い, 肝臓の赤色斑については中間葉, 腎臓については左側を対象とした. 組織標本の作製は切り出し部位を常法に従ってパラフィン包埋し, 薄切後, ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色標本を作製した. 鏡検は病変の種類および程度を含む各所見について記録した.

13.12. 統計解析

統計学的解析は行わなかった.

13.13. 余剰動物の処分

余剰動物は炭酸ガスにより安楽死させた.

14. 試験結果

試験結果は，Table 1 に観察期間中の経日死亡状況を，Table 2 に中毒症状およびその発現時期を示した．また，Table 3 に体重推移を，Table 4 に解剖所見を，Table 5 に病理組織学検査所見をそれぞれ示した．

14.1. 死亡率およびLD_{50}値

2000 mg/kgの投与量において死亡動物は認められず死亡率は 0%であった．単回投与後 14 日間観察時のLD_{50}値は 2000 mg/kgより高用量である．

14.2. 一般状態の観察

一般状態の観察では投与当日に下痢が全例に認められたが，いずれの動物も投与翌日には回復した．

14.3. 体重

投与後 7 日までは全ての動物が順調な体重増加を示したが，投与後 14 日の測定では 6 例中 2 例で体重の減少がみられ，その他の動物でも体重増加の抑制傾向が認められた．

14.4. 病理学検査

14.4.1. 肉眼観察

観察期間終了時の解剖において全例に腎臓の淡色がみられ，さらに 6 例中 4 例で肝臓のび漫性の赤色斑が，2 例に肺の赤色斑点が観察された．その他の所見として横隔膜の菲薄および肝臓の白色結節が各 1 例で認められた．

14.4.2. 病理組織学検査

2000 mg/kg 群の 1 例（Animal ID No. 2101）について肺，腎臓および肝臓の病変部の病理組織学検査を実施した結果，肺に炎症細胞浸潤，マクロファージの出現，肺胞壁の肥厚，出血，肝臓に多発性巣状壊死および単細胞壊死，出血，炎症細胞の浸潤，被膜炎等，腎臓に皮質尿細管壊死，尿細管上皮の変性および空胞化が観察された．

15. 考察および結論

C.I. フルオレセントブライトナー271 は淡黄色結晶のスチルベン系蛍光増白剤である．当該試験では，C.I. フルオレセントブライトナー271 を 8 週齢の Crj:CD(SD)IGS ラットの雌に 2000 mg/kg を単回経口投与し，投与後 14 日間観察した．

一般状態の観察では投与当日に下痢が全例に認められたが，いずれの動物も投与翌日には回復し，死亡例は認められなかった．しかしながら，投与後 14 日の体重測定において，投与後 7 日の体重と比較して減少あるいは増加抑制がみられた．

観察期間終了時の解剖において，腎臓の淡色，肝臓の白色結節，び漫性の赤色斑，肺の赤色斑点，横隔膜の菲薄が認められた．

肉眼観察で異常がみられた動物の 1 例について病理組織学検査を実施したところ，肺に炎症細胞浸潤，マクロファージの出現，肺胞壁の肥厚および出血が，肝臓に多発性巣状壊死および単細胞壊死，出血，炎症細胞の浸潤ならびに被膜炎等が，腎臓に皮質尿細管壊死，尿細管上皮の変性および空胞化がそれぞれ観察された．肝臓および腎臓にみられた変化は被験物質投与の直接的な影響であると考えられる．

以上のことから，当該試験条件下においてC.I. フルオレセントブライトナー271 の単回投与後 14 日間観察時におけるLD_{50}値は 2000 mg/kgより高用量であり，GHS分類の Category 5 に該当すると判断された．

Table 1. Mortality

Sex	Dose level (mg/kg, p.o.)	Number of animals	Number of deaths on the day				Mortality (%)
			1	2	3 - 7	8 - 14	
Female	2000	6	0	0	0	0	0

Table 2. Clinical observation

Sex : Female Dose level : 2000 mg/kg, p.o. Number of animals : 6

Signs	Hours							Days													
	0*	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Normal	6	4	1	1	0	0	0	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Excretion																					
diarrhea		2	5	5	6	6	6														

Number of affected animals : 6 Number of recovered animals : 6 Mortality : 0 / 6

* : Just after administration

Table 3. Body weight

Sex : Female (unit : g)

Dose level (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Days after administration 0*	7	14
2000	2101	195	233	232
	2102	191	212	226
	2103	201	240	261
	2104	192	212	214
	2105	195	221	223
	2106	199	224	213
	Mean ± S.D.	196 ± 4	224 ± 11	228 ± 18

* : Just before administration

Table 4. Gross finding

Sex : Female Dose level : 2000 mg/kg, p.o.

Animal ID No.	Classification	Days after administration	Organ	Findings and comments
2101	Sacrificed	14	Lung (left)	Red patch/zone, 1 mm in diameter
			Liver	White nodule, 3 mm in diameter
				Red zone, diffuse
			Kidney	Pale
2102	Sacrificed	14	Kidney	Pale
2103	Sacrificed	14	Kidney	Pale
2104	Sacrificed	14	Liver	Red zone, diffuse
			Kidney	Pale
2105	Sacrificed	14	Lung	Red patch/zone, 5 mm in diameter
			Diaphragma	Thin
			Liver	Red zone, diffuse
			Kidney	Pale
2106	Sacrificed	14	Liver	Red zone, diffuse
			Kidney	Pale

Table 5. Histological finding

Sex : Female Dose level : 2000 mg/kg, p.o.

Animal ID No.	Classification	Days after administration	Organ	Findings and comments
2101	Sacrificed	14	Lung	Inflammatory infiltration
				Appearance of macrophage
				Thickening, alveolar wall
				Hemorrhage with hematoidin crystal
			Kidney	Necrosis, tubular epithelium, cortex
				Vacuolation, tubule, cortex
				Degeneration, tubular epithelium, cortex
			Liver	Necrosis, hepatocyte, multifocal
				Single cell necrosis, sporadic
				Hemorrhage
				Inflammatory infiltration
				Capsulitis
				Extramedullary hematopoiesis