食薬セ研第１１－１７３８号

２００１年　６月１３日

ディスパーズイエロー42の
ラットを用いる
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
1) 一般状態の観察 …… 5
2) 体重測定 …… 5
3) 病理学検査 …… 5
6．データ解析法 …… 5
結果および考察 …… 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

Annex 1

Tables 1～3

【要　　約】

ディスパーズイエロー42（以下 DY42 と略記）の Sprague-Dawley 系[Crj:CD(SD)IGS, SPF]ラットを用いる急性経口投与毒性試験を実施した。

5週齢の雌雄各5匹のラットに、DY42 を 2000 mg/kg の用量で単回経口投与し、投与日（観察第1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。

その結果、雌雄全例において観察初期に糞便および尿の黄色化が観察されたが、その他には一般状態の変化はみられなかった。また、体重の推移についても、全例とも順調な増加を示した。剖検所見でも、全例に著変は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下における DY42 の LD_{50} は、雌雄ともに 2000 mg/kg を上回ると判断された。

【緒　　言】

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、ディスパーズイエロー42の安全性確認の資料を得るために、ラットを用い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。

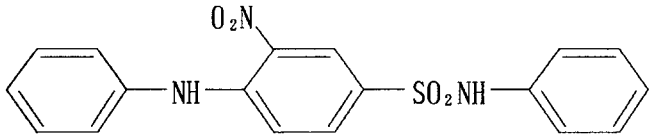
本試験は、OECD 化学物質試験法ガイドライン「[401] 急性経口毒性試験」（1987年2月24日採択）」および「化学物質 GLP」（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和63年11月18日改正、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に準拠して実施した。

【方　　法】

1．被験物質

被験物質として用いたディスパーズイエロー42（以下 DY42 と略記）の性状は下記のとおりである。

化学名	ディスパーズイエロー42
別名	C. I. Disperse Yellow 42
英名	Disperse Yellow 42
CAS No.	5124-25-4
分子量	369.40
分子式	$C_{18}H_{15}O_4N_3S$
物理化学的性質	性状：黄土色の湿潤品 融点：150℃以上
構造式	



本試験には、　　より提供された DY42（ロット番号　　、純度68 wt%、不純物，水分：32wt%）を用いた。被験物質は、受領後、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。使用した被験物質は、　　に返却し、再度品質試験を実施した。その結果、固形分は80.2%であり、乾燥後の純度は 99.63%であった（Annex 1）。固形分の値が試験開始時よりも高値を示したのは、被験物質の自然乾燥によるものと思われ、乾燥後の純度が充分に高い値を示していることから、試験期間中は安定であったと判断された。

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・リバー株式会社厚木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8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、雌雄各々入荷した6匹の中から、入荷動物番号が若い5匹を用いた。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：2000年4月10日
入荷時体重：雄 71.9～77.0g、雌 65.1～72.3g
投　与　日：2000年4月18日
投与時体重：雄 114.2～119.3g、雌 98.8～105.9g

全飼育期間を通じ、動物を金属製金網床ケージ（220w×270d×190h mm）に1匹ずつ収容し、基準温度22～25℃、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。なお、飼育期間中、飼育室の温湿度の実測値は、それぞれ 24.0～24.5℃、53.5～59.5%であった。また、供給した飼料および水には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雄から雌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

DY42 を、0.5 %カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液（日本薬局方カルメロースナトリウム：丸石製薬株式会社，ロット番号 6Z09；日本薬局方注射用水：光製薬株式会社，製造番号 9707SA）に懸濁して 20 w/v%懸濁液を調製し、翌日の投与時まで冷蔵、密封、遮光下で保存した。なお、供給物質中の DY42 濃度が 68 wt%であったため、供給物質濃度を 29.4 w/v %として調製し、所定含量の投与検体を得た。

本試験に先立ち、被験物質の2および 20 w/v%懸濁液について、冷蔵、遮光条件下における調製後8日間の安定性を確認した（Appendix A）。また、投与検体中の被験物質の含量（Appendix B）および均一性（Appendix C）を測定した結果、規定範囲内にあることを確認した。

調製検体中の被験物質濃度の測定は、各濃度の調製検体を2mLずつ採取し、移動相で一定量とした後、適宜移動相で希釈し、高速液体クロマトグラフ（HPLC）により測定した。同時に作成する検量線（DY42：5～20μg/mL）を用いて濃度を求めた。HPLC条件を以下に示す。

分析カラム：Inertsil ODS-2、4.6 mm i.d. × 150 mm、粒子径 5 μm
（ジーエルサイエンス㈱）
移動相　　：水／アセトニトリル（40：60）
流量　　：1.0 mL/min
カラム温度：40℃
検出波長　：280 nm
試料注入量：10μL

4．投与量の設定および投与方法

本試験に先立ち、予備試験（試験計画番号：A-99-060）を実施した。予備試験では、雌

雄各3匹を用いて DY42 を 2000 mg/kg の用量で投与し、投与後7日間観察した。その結果、観察初期に一過性の黄色調排泄物が認められたが、体重は全例とも観察期間を通じて順調に増加し、剖検においても肉眼的著変は見られず、DY42の毒性を示唆する変化は認められなかった。よって、DY42の毒性は極めて低いと考えられ、雌雄とも限度用量群のみを設定した。なお、油性媒体を使用しないため対照群は設けなかった。

投与容量は体重1kg当たり 10 mL とし、動物を投与前日の16時より絶食させた後、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10時19分～10時33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	被験物質濃度	供給物質濃度	投与容量	動物番号	
DY42	2000 mg/kg	20.0 w/v %	29.4 w/v %	10 mL/kg	雄:1～5	雌:6～10

5．観察および検査

1) 一般状態の観察

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。観察第2日から15日までは毎日1回行った。

2) 体重測定

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。

3) 病理学検査

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、眼球、甲状腺、心臓、気管、肺、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、消化管、生殖器、乳腺、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、大腿骨骨髄、膵臓、顎下腺、舌、食道、大動脈、ハーダー腺および皮膚の肉眼的観察を行った。これらのうち、動物番号が最も若い雄1例（動物番号：1）の主要器官・組織（脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、消化管）を 0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液で固定した。なお、剖検所見に特記すべき変化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．データ解析法

体重について、群ごとに平均値と標準偏差を求めた。

【結果および考察】

1．死亡動物

雌雄ともに、死亡例はなかった。

2．一般状態

投与日には、雌雄全例が黄色尿を排泄し、早いものでは投与後3時間の観察より認められた。また、投与後6時間の観察では、雄1例（動物番号：1）および雌3例（同7、9、10）で、黄色調の糞便がみられた。

観察第2日には、尿の色調は全例とも正常に復した。糞便の色調については、全例において正常色と黄色を呈するものとが混在していた。観察第3日以後は、全例において一般状態の変化はまったくみられなかった。

排泄物が一過性の黄色化を示した変化は、投与検体の色調によるものとみなされる。

3．体重推移（Table 1、2）

観察期間中を通じて、いずれの個体も順調な体重増加を示した。

4．病理学検査（Table 3）

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

以上の結果より、本試験条件下では DY42 の投与に起因する明らかな毒性変化は認められず、その LD_{50} は、雌雄ともに 2000 mg/kg を上回ると判断された。

Table 1 Body weight changes in male rats after single oral administration of DY42

Dose (mg/kg)	Animal No.	Days of observation 1 [a]	2	4	8	11	15
2000	1	117.4 [b]	136.3	156.4	192.8	221.3	259.7
	2	114.9	133.5	155.5	194.6	221.4	257.3
	3	114.2	132.3	151.5	186.9	212.6	241.9
	4	118.5	138.1	160.9	198.7	225.4	258.4
	5	119.3	136.3	161.5	196.4	222.5	257.1
	Mean	116.9	135.3	157.2	193.9	220.6	254.9
	±S.D.	2.2	2.3	4.1	4.5	4.8	7.3

[a], the day of administration, [b], unit, g

Table 2 Body weight changes in female rats after single oral administration of DY42

Dose (mg/kg)	Animal No.	Days of observation 1 [a]	2	4	8	11	15
2000	6	103.8 [b]	125.0	141.4	162.3	174.9	185.2
	7	100.2	118.6	134.7	155.3	168.8	184.4
	8	105.9	130.1	148.0	171.4	181.1	195.6
	9	98.8	119.5	138.7	164.8	178.9	193.6
	10	103.0	117.7	132.8	153.2	163.8	177.0
	Mean	102.3	122.2	139.1	161.4	173.5	187.2
	±S.D.	2.8	5.3	6.0	7.4	7.2	7.5

[a], the day of administration, [b], unit, g

Table 3 Macroscopic findings in rats after single oral administration of DY42

Sex	Dose (mg/kg)	Animal No.	Findings
Male	2000	1	No abnormality
		2	No abnormality
		3	No abnormality
		4	No abnormality
		5	No abnormality
Female	2000	6	No abnormality
		7	No abnormality
		8	No abnormality
		9	No abnormality
		10	No abnormality