

食薬セ研第11-1739号

2001年 6月18日

1-ナフトール-4-スルホン酸ナトリウムの
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	6
結果および考察	7
1. 死亡動物	7
2. 一般状態	7
3. 体重推移	7
4. 病理学検査	7

Tables 1~5

【要 約】

1-ナフトール-4-スルホン酸ナトリウム（以下 NSS 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。

1群5匹からなる5週齢の雌雄ラットに、NSS 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。また、媒体対照群として、雌雄各5匹に注射用水を 20 mL/kg の容量で投与し、同様に観察した。

その結果、NSS 投与群の雄3例および雌全例では、観察初期に一過性の軟便排泄が観察されたが、その他には全例において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、全例とも順調に増加し、NSS 投与の影響を示唆する明らかな変化は認められず、剖検所見でも全例で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 NSS の LD₅₀ 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、1-ナフトール-4-スルホン酸ナトリウム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。

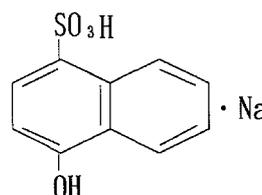
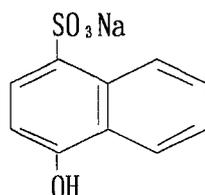
本試験は、OECD 化学物質試験法ガイドライン「[401] 急性経口毒性試験」（1987年2月24日採択）」および「化学物質 GLP」（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和63年11月18日改正、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に準拠して実施した。

【方 法】

1. 被験物質

被験物質として用いた1-ナフトール-4-スルホン酸ナトリウム（以下 NSS と略記）の性状は下記のとおりである。

化学名	1-ナフトール-4-スルホン酸ナトリウム
別名	Nevile-Winther's acid sodium salt
英名	1-Naphthol-4-sulfonic acid sodium salt
CAS No.	6099-57-6
分子量	246.21
分子式	C ₁₀ H ₇ O ₄ SNa
物理化学的性質	性状：白色の粉末
構造式	



本試験には、より提供された NSS〔ロット番号、純度 95.7wt%（カップリング滴定法）、不純物（水：3.2%、塩化ナトリウム：1.0%）〕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。試験終了後に返却した被験物質について、提供者が再度品質試験を実施した結果、試験期間中の安定性は確認された（Appendix A）。

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 7 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 10 匹を用い、検疫終了時の測定体重を基に体重別層化無作為抽出法により 1 群 5 匹からなる 2 群に分けた。投与開始時の週齢は、雌雄ともに 5 週齢であった（注）。

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

（注）動物入荷日：2000年3月22日
入荷時匹数：雄13匹、雌13匹
入荷時体重：雄 77.4～85.9 g、雌 70.8～79.2 g
投与日：2000年3月29日
投与時体重：雄 119.7～127.0 g、雌 97.9～106.9 g

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 23.0~24.0℃、47.5~65.5%であった。湿度については、基準値の範囲をわずかながらはずれる値を示したが、いずれも1時間以内に基準値に復したことが確認され、この逸脱による試験への影響はなかったと判断した。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

NSS を、日本薬局方注射用水（製造番号:9707SA、光製薬株式会社）に溶解して 10 w/v %溶液を調製し、気密容器に入れ、翌日の投与時まで冷蔵、遮光下で保存した。

本試験に先立ち、被験物質の 0.05 および 10 w/v%溶液について、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 B）。また、投与検体中の被験物質の含量を測定し、規定範囲内にあることを確認した（Appendix C）。なお、本投与検体は溶液であることから、均一性試験は実施しなかった。

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 2 mL ずつ採取し、水で一定量とした後、そのままあるいは適宜水で希釈し、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（NSS：5~20 µg/mL）を用いて濃度を求めた。HPLC の条件を以下に示す。

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株）
移動相：10.3 mmol/L tetra-n-butylammonium hydrogen sulfate/
アセトニトリル（75：25）
流量：1.0 mL/min
カラム温度：40℃
検出波長：235 nm
試料注入量：10 µL

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-99-062）を実施した。予備試験では、NSS の500、1000 および 2000 mg/kg 投与群を設定し、雌雄とも1群あたり3匹を用い、

単回経口投与後7日間観察した。その結果、体重増加は全例とも観察期間を通じて順調であり、一般状態の変化としては、最低用量群を含めた各群の雄または雌で、観察初期に一過性の軟便排泄が散見されたのみであった。その他には、NSSの毒性を示唆する変化は認められなかった。従って、雌雄ともNSS 2000 mg/kg 投与群および対照群の2群を設定した。

投与容量は体重1kg当たり20 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9時53分～10時7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。

群	投与物質	投与量 (mg/kg)	被験物質 濃度 (w/v%)	投与容量 (mL/kg)	動物番号	
					雄	雌
対照群	注射用水	0	0	20	1～5	11～15
NSS 投与群	NSS	2000	10	20	6～10	16～20

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、大腿骨骨髓、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、NSS投与群の中で動物番号が最も若い雌雄各1例(動物番号 雄:6、雌:16)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、各群の分散が、F-検定により等分散の場合は Student の t 検定法、不等分散の場合は Aspin-Welch の t 検定法を用いて、対照群に対する NSS 投与群の差について検定した（有意水準：5%）。

【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 (Table 1、2)

投与後2時間および6時間の観察において、NSS投与群の雌各1例(動物番号:各々19および18)で、軟便排泄が認められた。観察第2日では、同群の雄3例(動物番号:7、9、10)および雌全例で、トレイ上に軟便が付着しているのが確認された。その他には、一般状態の変化は認められなかった。

3. 体重推移 (Table 3、4)

雄では、観察第8日以降にNSS投与群が対照群と比較して有意な高値を示した。一方雌では、観察第8および11日にNSS投与群が有意な低値を示した。これらの有意差が認められた時点においては、一般状態に異常はみられなかった。また、NSS投与群の雌においても、いずれの個体も順調な体重増加を示していたことから、これらの有意差は被験物質投与に起因する変化ではないと考えられる。

4. 病理学検査 (Table 5)

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NSS投与との関連を示唆する変化は、観察初期にみられた一過性の軟便排泄のみであった。NSSのLD₅₀は、雌雄ともに2000 mg/kgを上回ると判断された。

Table 1 Clinical findings in male rats after single oral administration of NSS

Dose (mg/kg)	Animal No.	Clinical findings	Hours after administration						Days of observation								
			0~1	2	3	4	5	6	2 ^{a)}	3	4	5	6	7	8	9	10~15
0 (Water for injection)	1	No abnormality															
	2	No abnormality															
	3	No abnormality															
	4	No abnormality															
	5	No abnormality															
2000	6	No abnormality															
	7	Loose feces	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	No abnormality															
	9	Loose feces	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	Loose feces	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

^{a)}, the next day of administration

+, positive; - : negative

Table 2 Clinical findings in female rats after single oral administration of NSS

Dose (mg/kg)	Animal No.	Clinical findings	Hours after administration						Days of observation								
			0~1	2	3	4	5	6	2 ^{a)}	3	4	5	6	7	8	9	10~15
0 (Water for injection)	11	No abnormality															
	12	No abnormality															
	13	No abnormality															
	14	No abnormality															
	15	No abnormality															
2000	16	Loose feces	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	Loose feces	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	18	Loose feces	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	19	Loose feces	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	Loose feces	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

^{a)}, the next day of administration

+, positive; -: negative

Table 3 Body weight changes in male rats after single oral administration of NSS

Dose (mg/kg)	Animal No.	Days of observation					
		1 ^{a)}	2	4	8	11	15
0 (Water for injection)	1	122.0 ^{b)}	139.5	159.6	197.4	226.8	263.7
	2	123.2	145.7	164.7	202.1	233.7	270.9
	3	120.3	148.7	169.9	206.5	231.9	263.0
	4	122.3	144.1	164.3	200.2	224.2	257.3
	5	125.7	141.6	167.9	203.4	233.0	268.7
	Mean	122.7	143.9	165.3	201.9	229.9	264.7
	± S. D.	2.0	3.6	3.9	3.4	4.2	5.3
2000	6	126.2	148.7	171.7	223.5	250.0	295.3
	7	119.7	141.4	166.2	203.5	236.9	276.3
	8	125.1	145.1	167.6	205.8	237.6	271.6
	9	127.0	149.0	178.1	217.9	252.5	295.9
	10	124.3	144.8	168.4	216.1	248.5	291.3
	Mean	124.5	145.8	170.4	213.4 *	245.1 **	286.1 **
	± S. D.	2.9	3.1	4.8	8.4	7.3	11.3

^{a)}, the day of administration, ^{b)}, g

* : p<0.05, Significantly different from water for injection treatment group values

** : p<0.01, Significantly different from water for injection treatment group values

Table 4 Body weight changes in female rats after single oral administration of NSS

Dose (mg/kg)	Animal No.	Days of observation					
		1 ^{a)}	2	4	8	11	15
0 (Water for injection)	11	102.2 ^{b)}	120.8	139.8	168.9	183.8	200.4
	12	102.8	123.9	145.7	169.5	180.7	196.3
	13	103.1	123.6	137.9	156.5	168.0	178.7
	14	104.5	123.2	143.0	168.4	184.1	202.1
	15	103.9	122.5	144.0	169.3	180.8	199.4
	Mean	103.3	122.8	142.1	166.5	179.5	195.4
	± S. D.	0.9	1.2	3.2	5.6	6.6	9.6
2000	16	106.6	124.9	140.8	156.5	171.5	188.2
	17	97.9	119.4	134.0	152.3	162.2	178.3
	18	106.9	127.5	144.8	162.6	176.3	190.9
	19	105.4	123.3	138.1	160.3	170.3	178.1
	20	104.6	121.2	137.3	158.3	170.9	184.2
	Mean	104.3	123.3	139.0	158.0 *	170.2 *	183.9
	± S. D.	3.7	3.2	4.0	3.9	5.1	5.8

^{a)}, the day of administration, ^{b)}, g

* : p<0.05, Significantly different from water for injection treatment group values

Table 5 Macroscopic findings in rats after single oral administration of NSS

Sex	Dose (mg/kg)	Animal No.	Findings
Male	0 (Water for injection)	1	No abnormality
		2	No abnormality
		3	No abnormality
		4	No abnormality
		5	No abnormality
	2000	6	No abnormality
		7	No abnormality
		8	No abnormality
		9	No abnormality
		10	No abnormality
Female	0 (Water for injection)	11	No abnormality
		12	No abnormality
		13	No abnormality
		14	No abnormality
		15	No abnormality
	2000	16	No abnormality
		17	No abnormality
		18	No abnormality
		19	No abnormality
		20	No abnormality