

最終報告書

1,3-Benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt のラットを用いる
単回経口投与毒性試験

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

試験施設

財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所

目次

要約.....	5
材料と方法.....	6
1. 被験物質	6
2. 使用動物と飼育方法	6
3. 投与検体の調製	7
4. 投与方法	8
5. 観察と検査.....	8
6. データの解析	8
試験成績と概論.....	9
1. 死亡と一般状態	9
2. 体重.....	9
3. 病理学検査.....	9
Tables	10

要約

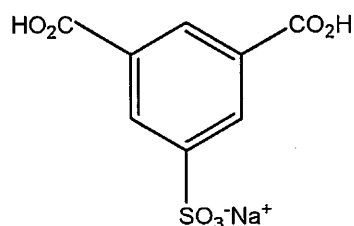
1,3-Benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt の単回経口投与時の概略の致死量を知るために、単回経口投与毒性試験を OECD 化学物質試験法ガイドライン[423]に従って実施した。観察は投与日を観察第 1 日として観察第 15 日まで行った。被験物質を 2000 mg/kg の用量で合計 6 例の雌ラットに投与した結果、一般状態の観察では、投与日に全例で下痢、観察第 2 日に 4 例で軟便がみられたが、いずれの症状も一過性で観察第 3 日には回復し、観察最終日まで死亡は認められなかった。また、観察期間中の体重推移も、1 例で観察第 11 日にわずかな減少が見られたが、その他の例では順調に推移した。

以上の結果 1,3-Benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt の単回経口投与時の毒性は弱く、毒性分類は GHS (Globally Harmonised Classification System) でクラス 5 または分類該当せず、LD₅₀ 区切り値(LD₅₀cut-off値)が∞と判断された。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質 1,3-Benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt (別名: Benzenesulfonic acid, 3,5-dicarboxy-, sodium salt、CAS No.: 6362-79-4、分子式: $C_6H_5O_7-S, Na$ 、分子量: 268.18、純度: 99.7%、色相: ハーゼン 20 ユニット未満、不純物: 水分 0.1%・Fe 分 5 ppm 未満、製造年月日: 2008 年 11 月 7 日、ロット番号: 、以下 SIPA と記す) は図に示す構造の白色結晶性粉末で臭いはない。被験物質は、(被験物質入手: 2008 年 12 月 26 日)、試験責任者が受領するまで被験物質受領保管室に室温で保管した(実測値 17.4~20.3°C、保管期間 2008 年 12 月 26 日から 2009 年 1 月 26 日)。試験責任者受領後から検体調製までは試験責任者が室温で保管した(実測値 16.7~22.3°C、保管期間 2009 年 1 月 26 日から 2009 年 2 月 9 日)。なお、被験物質の安定性は本被験物質を用いる試験(試験番号 A-08-046、R-08-008、R-08-009)の投与終了後、入手元にて品質試験を再度実施して確認した。



2. 使用動物と飼育方法

7 週齢の Sprague-Dawley 系 [CrI:CD(SD)、SPF] 雌ラット(日本チャールス・リバー、厚木飼育センター) 21 匹を購入し、6 号室に搬入した。検疫期間中は動物の尾に油性フェルトペンで馴化番号を附し、飼育ケージに試験番号および馴化番号を記入した動物カードを掛け、検疫と飼育環境への馴化を兼ね、入荷日も含め 8 日間飼育した。検疫・馴化期間中 1 日 1 回、動物の一般状態を観察し、入荷日および検疫終了時に体重を測定した。検疫・馴化の結果、試験の実施に影響を及ぼすと判断される異常が認められた動物は存在しなかったため、試験系の体重範囲を一定にするために、体重の上位 1 匹、下位 2 匹を除外し、18 匹を 3 匹ずつの 6 群に体重別層化無作為抽出法により群分けを行った。群分けした動物には一連の動物番号を割り当て、フェルトペンで尾に動物番号を標識し、動物カードに試験番号、投与量、投与年月日および動物番号を記入し、飼育ケージに掛けた。試験に使用しなかった動物は、同じ飼育室で飼育し、2009 年 2 月 27 日に過麻酔により安楽死させた。

動物は、許容温度 21.0~25.0°C、許容湿度 40.0~75.0%、換気設定約 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、入荷日および投与日の動物の体重は下記の通りであった。

入荷日 2009 年 2 月 2 日 172.7~197.1 g

投与日(第1段階)	2009年2月10日	197.4~216.6 g
投与日(第2段階)	2009年2月12日	194.5~219.1 g

第1段階、第2段階とも投与日の体重範囲は平均体重の80~120%以内であり、第2段階の動物の投与日の体重範囲は、第1段階の動物の投与日の平均体重の94.2~106%で、値の80~120%以内であった。

3. 投与検体の調製

秤量した被験物質に媒体である日局注射用水(製造元、光製薬;ロット番号、A83VH1)を加えて溶解攪拌し、20.0(w/v)%溶液を調製した。さらに、20.0(w/v)%溶液を媒体で希釈して3.00(w/v)%溶液を、3.00(w/v)%溶液を媒体で希釈して0.50(w/v)%溶液を、0.50(w/v)%溶液を媒体で希釈して0.05(w/v)%を調製した。調製した検体は冷蔵・遮光下で保管し(機器番号 X-A-2、実測値 2~6°C、保管期間 2009年2月9日から2月12日)、調製後8日以内に使用した。

投与に先立ち、秦野研究所で濃度 0.30%(w/v) および 20.0%(w/v) の調製検体の冷蔵・遮光下(機器番号 X-TB-10、実測値 3~4°C)での調製後8日間の安定性試験を実施し、調査結果が許容範囲内(調製直後の測定値に対する保管期間後の測定値比の平均が90%以上)であることを確認した(Annex A)。

投与検体調製時に投与検体の 0.05(w/v)%、0.50(w/v)%、3.00(w/v)% および 20.0(w/v)% の濃度における含量を測定し、許容範囲内(平均含量が調製濃度の 90.0~110%、各測定値のばらつきがそれぞれ平均値の 90.0~110%以内)であることを確認した(Annex B)。

調製検体中の被験物質濃度の測定にあたり、まず調製検体の 0.5 または 1 mL を採取し、蒸留水で希釈し、試料溶液を調製した。別に、被験物質約 10 mg を精密に量り、蒸留水に溶解して正確に 20 mL とし、さらにこの溶液 2 mL を採り、蒸留水を加えて正確に 20 mL とし、標準原液とした。この標準原液をそれぞれ 1、2 および 2 mL ずつ採り、蒸留水を加えて正確に 50、20 および 10 mL とし、標準溶液を調製した。試料溶液および標準溶液を、以下に示す高速液体クロマトグラフ(HPLC)法により測定し、標準溶液より作成する検量線を用いて調製検体中の SIPA 濃度を算出した。各試料溶液は n=1 で測定し、標準溶液については n=3 で測定した。

HPLC 条件

HPLC システム構成	LC-10AT <i>vp</i> (ポンプ)、SIL-HTc(システムコントローラ内蔵冷却機能付オートインジェクタ)、CTO-10AC <i>vp</i> (カラムオーブン)、SPD-10AV <i>vp</i> (検出器)、C-R7A plus(データ処理装置)
分析カラム	CAPCELL PAK C18 UG120 (内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm、(株)資生堂)
移動相	リン酸溶液(1→1000)/メタノール混液(100:5 v/v)
流量	1.0 mL/min

カラム設定温度	40℃
試料設定温度	25℃
測定波長	220 nm
試料注入量	10 μ L
オートインジェクタ洗浄液	蒸留水

4. 投与方法

「OECD 化学物質試験法ガイドライン」に拠り、投与経路は経口投与とした。

本被験物質のラット経口投与時の毒性に関する報告は、Marhold らによる単回投与の報告があるのみであるが、それによればラットの経口投与時の半数致死量は 6450 mg/kg であり (RTECS; Number: DB6030000)、本被験物質の毒性は低いものと推定された。そこで、OECD 化学物質試験法ガイドライン [423] (急性経口毒性試験－急性毒性クラス法) に従い、2000 mg/kg を投与開始時投与量に選択した。

動物を投与前日の 16 時から絶食させた後、投与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強制経口投与した。投与は第 1 段階 (動物番号 1～3) を 2009 年 2 月 10 日 10 時 6 分～10 時 8 分間に 2000 mg/kg の用量で行った。第 2 段階 (2000 mg/kg、動物番号 4～6) は第 1 段階で死亡動物が認められなかったことより、ガイドラインに従い 2000 mg/kg の用量で 2 月 12 日 10 時 7 分～10 時 9 分間に投与した。給餌は投与 3 時間後から行った。各投与段階における投与量と投与容量は以下の通りであった。

投与段階	投与物質	投与量 (mg/kg)	濃度 (%(w/v))	投与容量 (mL/kg)
1	SIPA	2000	20	10
2	SIPA	2000	20	10

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、動物の一般状態の観察をした。投与日 (観察第 1 日) の一般状態の観察は投与前に一度、投与後は 1 時間にわたり断続的に、その後は約 1 時間毎に投与後 6 時間まで全例について行った。観察第 2 日以降は毎日 1 回の頻度で観察した。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いずれの動物も放血致死させて剖検し、器官・組織の肉眼的観察を実施した。また、各投与段階の動物番号のもっとも若い 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 (胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸および直腸)) を 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定保存した。これらの動物については、剖検時に異常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。

試験成績と概論

1. 死亡と一般状態 (Table 1)

14 日間の観察期間中に死亡例は認められなかった。

一般状態の観察では、全例で 5~6 時間後に下痢が認められた。また、投与翌日に 4 例 (動物番号 1、2、3 および 4) で軟便が観察された。これらの症状は投与第 3 日までには回復し、最終観察日 (観察第 15 日) まで何の異常も認められなかった。

2. 体重 (Table 2)

1 例 (動物番号 4) の観察第 11 日にわずかな減少が認められたが、それ以外には、投与日から観察終了日まで全例で順調な体重増加を示した。

3. 病理学検査 (Table 3)

被験物質の影響と思われる明らかな異常所見は認められなかった。

1,3-Benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt の 2000 mg/kg の投与により、下痢、軟便等の症状が認められた。しかし、症状は一過性で死亡は 1 例も認められず、1,3-Benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt の毒性は弱いものと考えられた。1,3-Benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt の毒性分類は GHS (Globally Harmonised Classification System) でクラス 5 または分類該当せず、LD₅₀ 区切り値 (LD₅₀ cut-off 値) が ∞ と判断された。

Table 1

Single dose toxicity study of SIPA by oral administration in rats

Clinical observation of females

Dose (mg/kg)	Step	Animal Number	Hours after administration						Days of observation	
			1	2	3	4	5	6	2	3~15
2000	Step 1	1	-	-	-	-	-	D	LS	-
		2	-	-	-	-	-	D	LS	-
		3	-	-	-	-	-	D	LS	-
	Step 2	4	-	-	-	-	D	D	LS	-
		5	-	-	-	-	-	D	-	-
		6	-	-	-	-	D	D	-	-
No. of animals observed abnormal signs										
Diarrhea or loose stool			0	0	0	0	2	6	4	0

D : Diarrhea

LS: Loose stool

Table 2

Single dose toxicity study of SIPA by oral administration in rats

Body weight changes (g) of females

Dose (mg/kg)	Step	Animal Number	Days of observation					
			1 ^{a)}	2	4	8	11	15
2000	Step 1	1	216.6	233.0	251.0	270.7	279.6	297.3
		2	205.5	219.6	243.0	253.6	264.7	281.4
		3	197.4	217.8	234.1	244.6	264.6	276.4
	Step 2	4	219.1	242.2	255.6	275.0	272.3	283.6
		5	209.0	227.6	233.2	247.3	250.8	258.3
		6	194.5	220.5	223.1	235.9	247.3	254.5
		Mean	207.0	226.8	240.0	254.5	263.2	275.3
		±S.D.	9.9	9.5	12.2	15.4	12.3	16.2
		N	6	6	6	6	6	6

a) Day of administration

Table 3

Single dose toxicity study of SIPA by oral administration in rats

Macroscopic findings of female

Dose (mg/kg)	2000					
	Step 1			Step 2		
Animal Number	1	2	3	4	5	6
Fate	L	L	L	L	L	L
(All organs) Abnormality	-	-	-	-	-	-

-: negative, +: positive

L, Lived to the end of the observation period