
2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸 (CAS No. 81-16-3) のラットにおける
単回経口投与毒性試験

最 終 報 告 書

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

NBR-1

目 次

	頁
要 約	1
緒 言	2
試験材料および試験方法	
1. 被験物質および媒体	2
2. 投与検体	2
3. 使用動物および飼育条件	3
4. 投与経路、投与方法、群構成および投与量	4
5. 観察および検査項目	4
6. 統計学的方法	5
試験実施日	5
試験成績および考察	
1. 一般状態および死亡状況	6
2. 体重推移	6
3. 剖検所見	6
資 料	7
Table (1~5)	9
Fig. (1~2)	14

Table 1	General sign of male rats in single dose toxicity study of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration	9
Table 2	General sign of female rats in single dose toxicity study of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration	10
Table 3	Mortality and LD ₅₀ value of rats in single dose toxicity study of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration	11
Table 4	Body weight of male rats in single dose toxicity study of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration	12
Table 5	Body weight of female rats in single dose toxicity study of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration	13
Fig. 1	Body weight of male rats in single dose toxicity study of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration	14
Fig. 2	Body weight of female rats in single dose toxicity study of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration	15

要 約

2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸 (CAS No. 81-16-3) を雌雄ラットに 1 回経口投与し、その毒性について検討した。投与量は毒性試験 OECD ガイドラインにより限界用量とされている 2000 mg/kg を高用量とし、以下 1000 および 500 mg/kg とした。対照として、媒体の 0.5 % CMC 投与群を設けた。

1. 一般状態：死亡発現はなかった。2000 mg/kg 群の雌雄では、投与後 1 日に軟便が少数例に、肛門周囲の被毛の汚れが約半数例にみられた。

2. 体重推移：各投与群の雌雄とも対照群とほぼ同様の推移を示した。

3. 剖検所見：各投与群および対照群の雌雄とも著変はみられなかった。

以上により、2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸の LD₅₀ 値は、雌雄とも 2000 mg/kg 以上と考えられた。

緒 言

2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸 (CAS No. 81-16-3) が人に摂取された場合の健康への影響を推定するために、OECD 毒性試験ガイドライン¹⁾に従って 2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸を雌雄ラットに1回経口投与し、その毒性について検討した。

試験材料および試験方法

1. 被験物質および媒体

被験物質の 2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸 (CAS No. 81-16-3) は、黄みの白ないしごくうすい赤の固体で、分子量：223.25、直射日光下では急速に着色し、水に難溶であるが、炭酸水素ナトリウム溶液に対する溶解状態は澄明ないしわずかに微濁する性質を有する。当試験には、平成 5 年 8 月 18 日に から 提供されたものを用いた (Lot No. 規格値： 98.0 % 以上、純度：98.7 %)。入手後は少量ずつ分割し、遮光・気密条件下で試験施設の被験物質保管室の保管庫に室温下で保管した。なお、反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験の投与期間が終了後に残余被験物質の一部を製造元に送付して分析した結果、純度は 98.9 % であり、使用期間中の安定性が確認された。

媒体として、0.5 %カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液を用いた。カルボキシメチルセルロースナトリウム (以下 CMC、Lot No. 2407、丸石製薬株式会社、平成 4 年 7 月 16 日購入) は、入手後は試験施設の被験物質保管室の保管庫に室温で保管した。

2. 投与検体

被験物質を秤取し、注射用水 (Lot No. 3E00N、株式会社大塚製薬工場、使用期限：1998 年 4 月) により 0.5 % 溶液とした CMC に懸濁して必要濃度の投与検体液を用時調製した。なお、投与終了後の残余検体液は廃棄した。また、被験物質は純度換算しないで原体重量で表示した。

投与に用いた投与検体液中の被験物質濃度を、試験施設内で液体クロマトグラフィーにより測定した。その結果、被験物質濃度は表示濃度の 95.0~106.0 % であり、設定した適正範囲内 (表示濃度の ± 10 % 以内) を示した (Attached table 1)。

3. 使用動物および飼育条件

1) 動物種、系統

試験には、毒性試験に一般的に用いられている動物種で、その系統維持が明らかであり、集積データも揃っている Sprague-Dawley 系雌雄ラット (SPF) [Crj: :CD (SD)] を用いた。動物は、平成 5 年 10 月 13 日に日本チャールス・リバー株式会社日野飼育センターから 4 週齢で雌雄各 31 匹を購入した。入手後 2 日の体重範囲は、雄が 74~91 g、雌が 77~93 g であった。

2) 検疫および馴化、群分け法ならびに個体識別法

入手した動物は、5 日間の検疫期間およびその後 4 日間の馴化期間を設けた。この間に、4 回の体重測定および毎日一般状態の観察を行って検疫・馴化とし、一般状態および体重推移に異常の認められない動物を群分けして試験に用いた。

群分けは、コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に、無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように投与日に行った。なお、動物の体重変動範囲は、平均体重から ± 20 % を越えないことを確認した。群分け後の残余動物は、投与日にエーテルで麻酔致死させた後に廃棄処分した。

動物は、検疫・馴化期間中は入手日に油性インクおよび色素による染毛法により、群分け後は色素による染毛法および耳パンチ法を併用して識別した。さらに、検疫・馴化期間中の各ケージには試験番号、入手年月日、性別および馴化動物番号を記入したラベルを、群分け後の各ケージには試験番号、投与量、性別および動物番号を記入し、群ごとに色分けしたラベルを取り付けた。

3) 環境条件および飼育管理

動物は、室温 20~24 °C、湿度 40~70 %、明暗各 12 時間 (照明: 午前 6 時~午後 6 時)、換気回数 12 回/時 (フィルターにより除菌した新鮮空気) に設定した飼育室 (E 棟 8 号室) で飼育した。

検疫・馴化期間中および絶食期間中はステンレス製懸垂式ケージ (W: 240 x D: 380 x H: 200 mm) を用いて 1 ケージあたり 5 匹までの群飼育とし、群分け後はステンレス製五連ケージ (W: 755 x D: 210 x H: 170 mm) を用いて個別飼育した。ケージの受け皿および給水瓶の交換は 1 週間に 2 回以上、ケージおよび給餌器の交換は 2 週間に 1 回以上行った。なお、動物飼育室の清掃 (床の掃き掃除) および 500 倍希釈次亜塩素酸ナトリウム水溶液での床のモップ拭きによる消毒は毎日行った。

4) 飼料および飲料水

飼料は、入手後 3 カ月以内の固型飼料 (CRF-1、オリエンタル酵母工業株式会社) を給餌器に入れ、自由に摂取させた。ただし、投与前日の夕刻 (午後 3 時 45 分) から投与までの約 19 時間と投与後約 6 時間まで絶食させ、その後に飼料を与えた。飼料の分析結果は、財団法人日本食品分析センターおよびオリエンタル酵母工業株式会社から入手した。

飲料水は、水道水を給水瓶を用いて自由に摂取させた。ただし、群分け時から投与後約 6 時間までは絶水させ、その後に飲料水を与えた。飲料水の水質検査結果は、ほぼ 3 カ月ごとに財団法人岐阜県公衆衛生検査センターで実施した成績を入手した。

飼料および飲料水の検査の結果、いずれも検査結果は試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

4. 投与経路、投与方法、群構成および投与量

1) 投与経路および投与方法

2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸は、経口的に人に摂取される可能性が考えられたため、投与経路として経口投与を選択した。

投与に際しては、金属製経口胃ゾンデを取り付けたプラスチック製ディスプレイ注射筒を用いて、強制経口投与した。投与液量は、投与直前に測定した体重を基準として 10 ml/kg で算出した。投与時刻は午前 10 時 20 分～10 時 38 分の間で、投与回数は 1 回とした。投与開始時の体重範囲は、雄が 110～121 g、雌が 105～112 g であった。

2) 群構成および投与量

群構成は、以下の如くとした。

群	試験群	投与量 (濃度)	雄 (動物番号)	雌 (動物番号)
第 1 群	対照 (0.5 % CMC)	0 mg/kg (0 %)	5 (001～005)	5 (051～055)
第 2 群	2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸	500 mg/kg (5 %)	5 (101～105)	5 (151～155)
第 3 群	2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸	1000 mg/kg (10 %)	5 (201～205)	5 (251～255)
第 4 群	2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸	2000 mg/kg (20 %)	5 (301～305)	5 (351～355)

投与量設定の理由：予備試験（投与段階：0、20、200 および 2000 mg/kg）の結果、2000 mg/kg 投与においても死亡発現はなく、一般状態、体重推移および剖検にも異常はみられなかった²⁾。そこで、当試験では OECD 毒性試験ガイドラインで限界用量とされている 2000 mg/kg を高用量とし、以下公比 2 で 1000 および 500 mg/kg 群を設けた。なお、対照として被験物質と同一液量の媒体 (0.5 % CMC) を投与する群を設けた。

5. 観察および検査項目

1) 観察期間

観察期間は、投与後 14 日間とした。

2) 一般状態

投与日は投与前および投与後6時間（投与後 30 分まで、投与後 2、4 および 6 時間）まで、投与翌日からの観察期間中は 1 日 1 回、一般状態および死亡の有無を観察した。

3) 体重測定

投与日（投与直前）および投与後 1、3、7、10 ならびに 14 日の午前中に測定した。

4) 剖 検

各動物とも、観察期間終了時にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、所見を記録した。

6. 統計学的方法

1) LD₅₀ 値

観察期間中の死亡率から、概略の LD₅₀ 値を推定した。

2) 体重は、各群で平均値および標準偏差を算出した。

有意差検定は対照群と被験物質投与各群の間で多重比較検定を用いて行い、危険率 5 % 未満を有意とした。すなわち、Bartlett 法による等分散性の検定を行って等分散の場合には一元配置法による分散分析を行い、有意ならば対照群との群間比較を Dunnett 法により行った。一方、等分散と認められなかった場合は順位を利用した一元配置法による分析（Kruskal-Wallis の検定）を行い、有意ならば対照群との群間比較は順位を利用した Dunnett 法を用いて行った。

試験成績および考察

1. 一般状態および死亡状況

一般状態観察成績を Table 1、2 に示した (Appendix 1-1~1-4、2-1~2-4)。

投与日には、投与後 6 時間までは対照群および各投与群の雌雄とも異常症状は観察されなかった。

投与後 1 日には、2000 mg/kg群の雌雄では軟便が各 1 例に、肛門周囲の被毛の汚れが 2~3 例にみられた。しかしながら、投与後 2 日以降にはいずれの群の雌雄とも異常症状は観察されなかった。

各投与群の雌雄とも、死亡発現はなかった (Table 3)。2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸の LD₅₀ 値は、雌雄とも 2000 mg/kg以上であった。

2. 体重推移

体重推移を Table 4、5 および Fig.1、2 に示した (Appendix 3-1~3-4、4-1~4-4)。各投与群の雌雄とも対照群とほぼ同様の推移を示し、有意差は認められなかった。

3. 剖検所見

各投与群および対照群の雌雄とも、剖検で著変はみられなかった。

以上の如く、2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸はガイドラインで限界用量とされている 2000 mg/kgの投与によっても、雌雄ともに死亡発現はなかった。一般状態では、2000 mg/kg群の雌雄で投与後 1 日に軟便が少数例に、さらに軟便に伴った変化と思われる肛門周囲の被毛の汚れが約半数例に観察されたが、投与後 2 日には異常はみられず、軟便症状の消失は早いと考えられた。また、体重推移に異常はなく、剖検でも著変はみられなかった。

以上により、2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸の LD₅₀ 値は、雌雄とも 2000 mg/kg以上と考えられた。

資 料

- 1) OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS, SECTION 4、HEALTH EFFECTS、SHORT TERM TOXICOLOGY、401 Acute Oral Toxicity [(厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修、OECD 毒性試験ガイドライン、薬業時報社、平成 3 年 12 月 25 日) から引用]

- 2) 「2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸 (CAS No. 81-16-3) のラットにおける単回経口投与毒性試験の予備試験」の最終報告書 (試験番号: 4103P) (平成 6 年 9 月 22 日) (株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所)

Table 1. General sign of male rats in single dose toxicity study of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

Group (mg/kg)	Number of males and general sign	Hours after administration						Days after administration											
		0-0.5	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Control	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
500	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1000	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
2000	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Normal	5	5	5	5	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid	Loose stool	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Soiled perineal region	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2. General sign of female rats in single dose toxicity study of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

Group (mg/kg)	Number of females and general sign	Hours after administration						Days after administration																	
		0-0.5	2	4	6	6	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14				
Control	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5			
		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
	500	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid	1000	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
2000	Number of females Normal Loose stool Soiled perineal region	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 3. Mortality and LD50 value of rats in single dose toxicity study of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

Sex	Group (mg/kg)	Number of animals	Days after administration														Total number of deaths	LD50 (mg/kg)							
			Hours after administration						Days after administration																
			0	0.5	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14				
Male	Control	5	0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid 500 mg/kg	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2000<	
	2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid 1000 mg/kg	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid 2000 mg/kg	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Female	Control	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid 500 mg/kg	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2000<
	2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid 1000 mg/kg	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid 2000 mg/kg	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*:Number of deaths.

Table 4. Body weight of male rats in single dose toxicity study of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

Group (mg/kg)	2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid			
	Control	500	1000	2000
Number of males	0 5	5	5	5
Days after admin- istration	0 1 3 7 10 14	3.4 4.2 7.1 8.6 9.9 11.6	3.2 4.8 4.4 8.4 10.1 14.9	4.4 5.9 4.8 4.9 7.3 8.8
	115.0 ± 128.4 ± 152.8 ± 190.0 ± 216.4 ± 246.2 ±	114.6 ± 129.4 ± 149.6 ± 181.8 ± 203.4 ± 234.4 ±	114.4 ± 130.2 ± 149.2 ± 182.0 ± 206.0 ± 232.6 ±	114.4 ± 128.4 ± 152.2 ± 188.0 ± 212.8 ± 246.2 ±

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 5. Body weight of female rats in single dose toxicity study of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

Group (mg/kg)	2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid			
	Control	500	1000	2000
Number of females	0	5	5	5
Days after administration				
0	108.6 ± 2.3	108.4 ± 2.2	108.2 ± 2.2	108.2 ± 1.5
1	125.4 ± 3.3	126.0 ± 2.6	124.6 ± 5.0	122.4 ± 2.9
3	137.4 ± 4.6	138.6 ± 3.3	137.6 ± 6.2	138.2 ± 3.6
7	156.2 ± 6.4	154.8 ± 5.2	153.2 ± 6.4	149.6 ± 14.5
10	165.6 ± 4.0	162.2 ± 6.7	162.6 ± 7.1	160.2 ± 7.9
14	177.6 ± 5.6	176.4 ± 11.5	174.2 ± 6.5	174.0 ± 9.0

Each value shows mean (g) ± S.D.

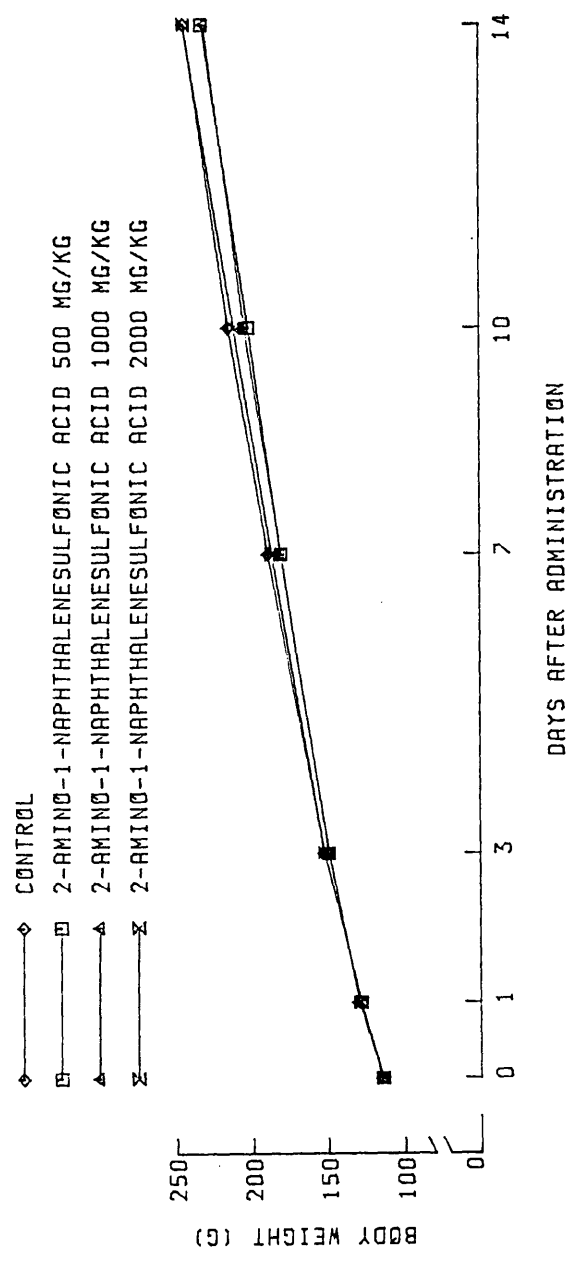


Fig. 1. Body weight of male rats in single dose toxicity study of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration.

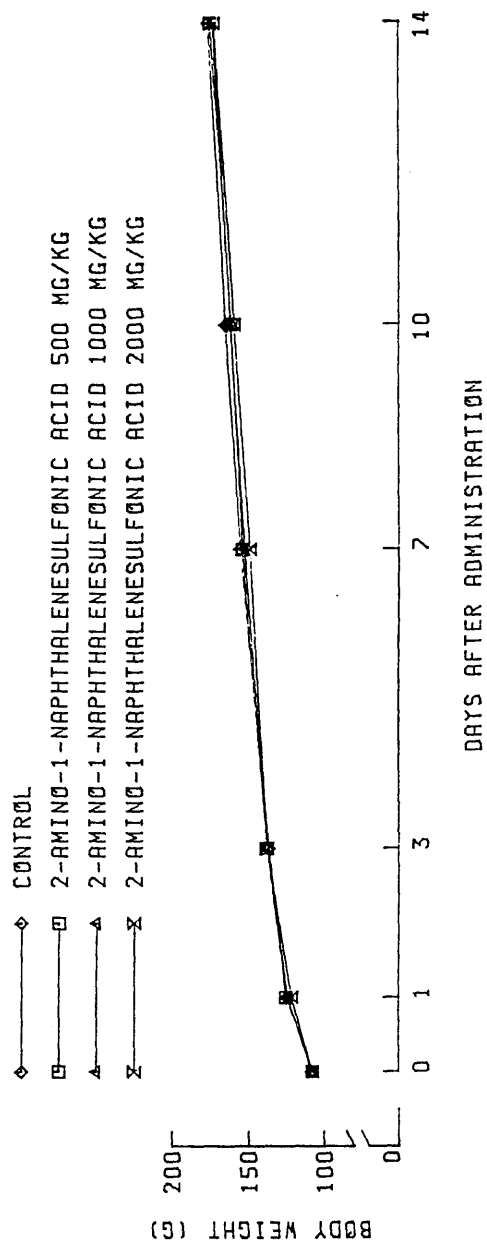


Fig. 2. Body weight of female rats in single dose toxicity study of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration.