食薬セ研第１０－１６２１号

２０００年　７月２５日

２－エチルアントラキノンのラットにおけ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
　6．データ解析法 …… 5
結果 …… 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
考察 …… 7
文献 …… 8

Tables 1～2

【要　　約】

2-エチルアントラキノン（以下 EAQ と略記）の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD) IGS, SPF] ラットにおけ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 EAQ 2000 mg/kg をそれぞれ単回経口投与し、観察第1日（投与日）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、雄5匹に 0.1%ポリソルベート80添加 0.5% CMC Na 水溶液を 10 mL/kg 投与して、同様に観察した。

被験物質投与群で、被験物質に由来すると考えられる褐色尿の排泄が投与後約5時間から観察第5日の間に1～4日間観察された以外、一般状態の変化は観察されなかった。

雌雄の 2000 mg/kg 投与群で軽度な体重の増加抑制が、観察第2日にみられた。

観察第15日に実施した剖検所見においては、全例で異常は認められなかった。

これらのことより、本試験条件下における EAQ の LD_{50} は、雌雄ともに 2000 mg/kg を上回ると推定された。

【緒　　言】

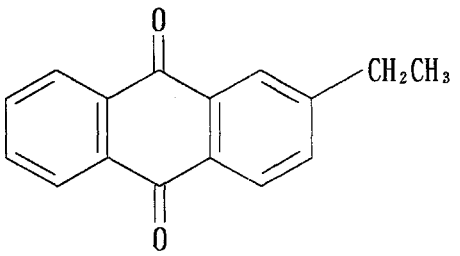
2-エチルアントラキノン（以下 EAQ と略記）のラットにおける単回経口投与時の LD_{50} は 2795 mg/kg であることが報告されている[1]。今回、OECD 既存化学物質安全性点検等に係る毒性調査の一環として、EAQ の安全性確認の資料を得るために、ラットにおける急性経口投与毒性試験を実施したので、その結果を報告する。

【方　　法】

1．被験物質

被験物質として、2-エチルアントラキノン（以下 EAQ と略記）を用いた。本被験物質は、別名を 2-アルキル(C=2)アントラキノンといい、英名は 2-Alkyl(C=2)anthraquinone であり、CAS No. 84-51-5、分子量 236.28、分子式 $C_{16}H_{12}O_2$、融点（凝固点）108.9～110.5 ℃、沸点 245℃(20 mmHg) の淡黄色フレーク状の固体である。EAQ の構造式を以下に示す。

構造式



本試験には、　　より提供された EAQ（ロット番号：　　純度：99.16wt%）を用いた。提供された被験物質は、不純物としてアントラキノン 0.01%、硫黄分 1.4 ppm、塩素分 14.3 ppm を含有していた。受領した提供物質は、使用時まで被験物質保管室において、室温で保管した。

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・リバー株式会社筑波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、雄10匹雌 5 匹を用い、雄は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、雌は入荷番号の若い方から 5 匹を選んで 1 群とした。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：1999年 2 月24日
入荷時匹数：雄12匹、雌 6 匹
入荷時体重：雄 79.8～85.6 g、雌 79.7～81.4 g
投　与　日：1999年 3 月 3 日
投与時体重：雄 120.2～129.5 g、雌 103.3～109.8 g

全飼育期間を通じ、動物を金属製金網床ケージ（220w×270d×190hmm）に1匹ずつ収容し、基準温度24±1℃、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 24.0～25.0℃、54.0～63.5%で基準の範囲内にあった。また、供給した飼料および水に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、各動物の尾に油性フェルトペンで雌雄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

媒体として、0.1%ポリソルベート80添加 0.5% CMC Na 水溶液を用いた。媒体は、0.5w/v%となるように、秤量した CMC Na（カルメロースナトリウム、製造番号：6Z09、丸石製薬株式会社）を注射用水（日局注射用水、製造番号：9707SA、光製薬株式会社）に溶解し、これに 0.1 w/v%の割合でポリソルベート80〔ポリオキシエチレン(20) ソルビタンモノオレエート、ロット番号：TPN3571、和光純薬工業株式会社〕を加えて調製した。

投与検体の調製においては、被験物質を秤量し、所定濃度となるように媒体を加えて懸濁させ、投与時まで遮光して冷蔵保存し、調製2日後に使用した。

本試験に先立ち、被験物質の 0.2 および 20 w/v%の調製検体の、冷蔵、遮光条件下での8日間の安定性を確認した（Appendix A）。また、各濃度の投与検体について、被験物質の含量および均一性を調べて、規定範囲内にあることを確認した（Appendix B、C）。調製検体中の被験物質の濃度は、高速液体クロマトグラフ法により測定した（Appendix D）。

4．投与量の設定および投与方法

本試験における投与量は、投与量設定のための予備試験（試験計画番号：A-98-028）の結果に基づいて決定した。すなわち、予備試験において EAQ 1000 および 2000 mg/kg を投与した結果、被験物質に由来すると考えられる褐色尿の排泄がみられた以外に変化はほとんどみられなかったことから、雌雄に 2000 mg/kg の1用量を設定した。

投与容量は体重1kg当たり 10 mL とし、動物を約18時間絶食させた後、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。投与は午前9時40分～9時56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 (mg/kg)	濃度 (w/v%)	投与容量 (mL/kg)	動物番号	
				雄	雌
媒　体	0	0	10	1～5	
ＥＡＱ	2000	20	10	6～10	11～15

5．観察および検査

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。また、投与日および観察第2日に観察された褐色尿について、尿検査試験紙（マルティスティックス®、バイエル・三共株式会社）を用いて潜血および蛋白反応を調べた。

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。

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、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、生殖器、顎下腺、甲状腺、副腎、大動脈、気管、食道、消化管、膀胱、眼球（ハーダー腺を含む）、皮膚、乳腺、頸部および腸間膜リンパ節、大腿骨骨髄および舌の肉眼観察を行った。これらのうち、 2000 mg/kg 投与群の雄の1例（動物番号：6）について心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓および胃を 0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液で固定した。なお、観察第2日以降、褐色尿の排泄以外に一般状態に異常は観察されず、剖検によっても異常は認められなかったことから、組織学検査は実施しなかった。

6．データ解析法

体重の測定値について、平均値および標準偏差を求めた。

【結　　果】

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）

被験物質投与群で、褐色尿の排泄が、投与後約5～6時間に雌雄各1例で、観察第2日に他の雄4例および雌3例でみられ、同様の褐色尿は雌雄各2例では観察第3日にも、雄1例では観察第5日まで連日観察された。投与日および観察第2日に観察された褐色尿は、潜血反応陰性（－）、蛋白反応陽性（＋）であった。

その他、変化は認められなかった。

3．体重推移（Table 2）

雌雄の 2000 mg/kg 投与群で、観察第2日に軽度の体重増加抑制がみられたが、その後体重は増加した。

4．病理学検査

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

【考　　察】

EAQ 2000 mg/kg を5週齢の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD)IGS,SPF] 雌雄ラットに単回強制経口投与して単回投与時の EAQ の毒性を検討した。

その結果、雌雄の 2000 mg/kg 投与群で投与後約5時間以降に褐色尿の排泄がみられ、長い例では観察第5日まで同様の尿が観察されたが、これらの尿は潜血反応が陰性であった。先に行われた本被験物質の予備試験（試験計画番号：A-98-028）およびラットにおける28日間反復経口投与毒性予備試験（7日間反復投与試験、試験計画番号：C-98-006）でも赤色尿が観察されており、同試験で採取した血液の血漿は赤色調を呈し、吸収スペクトルを調べたところ、326、410、509 nm に吸収がみられた。酸化ヘモグロビンの吸収波長は 540 および 576 nm であるため[2)]、血漿が赤色調を示したのは溶血によるものではなく、被験物質に起因した着色であると考えられた。本試験で観察された褐色尿と反復試験でみられた赤色尿は同様のものであると考えられることから、これらの着色尿は被験物質に起因したものと考えられた。なお、観察第5日まで褐色尿がみられたことから、本被験物質の体内からの排泄は遅いことが推察された。

また、雌雄の 2000 mg/kg 投与群で軽度に体重の増加抑制が、観察第2日にみられたが、その後、雄では対照群と同程度まで体重増加がみられたことから、軽度の変化であると考えられた。

観察第15日に実施した剖検では、雌雄全例の器官・組織に異常は認められなかった。

これらのことより、本試験条件下における EAQ の LD_{50} は、雌雄ともに 2000 mg/kg を上回ると推定された。

【文　　献】

1） National Technical Information Service. OTS0534314. (1978)

2） 厚生省薬務局医療機器開発課監修：「医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン　１９９５　解説」，薬事日報社．東京．（1996）pp. 112-115.

Table 1 Clinical findings in male and female rats after single oral administration of EAQ

Sex	Dose (mg/kg)	Animal No.	Clinical findings	Hours after administration						Days of observation								
				0～1	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6	7	8	9	10～15
Male	0	1	No abnormality															
		2	No abnormality															
		3	No abnormality															
		4	No abnormality															
		5	No abnormality															
	2000	6	Brown urine	−	−	−	−	−	−	+*	+	−	−	−	−	−	−	−
		7	Brown urine	−	−	−	−	−	−	+*	+	+	+	−	−	−	−	−
		8	Brown urine	−	−	−	−	−	−	+*	−	−	−	−	−	−	−	−
		9	Brown urine	−	−	−	−	−	−	+*	−	−	−	−	−	−	−	−
		10	Brown urine	−	−	−	−	−	+*	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Female	2000	11	Brown urine	−	−	−	−	−	−	+*	+	−	−	−	−	−	−	−
		12	Brown urine	−	−	−	−	−	−	+*	+	−	−	−	−	−	−	−
		13	Brown urine	−	−	−	−	−	−	+*	−	−	−	−	−	−	−	−
		14	Brown urine	−	−	−	−	+*	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
		15	No abnormality															

+, positive; −, negative; *, negative in occult blood; The first day, the day of administration.

Table 2 Body weight changes in male and female rats after single oral administration of EAQ

Sex	Dose (mg/kg)	Animal No.	Days of observation period					
			1 *	2	4	8	11	15
Male	0	1	122.7	145.2	165.0	208.0	226.9	267.3
		2	125.2	147.2	168.2	213.9	240.0	282.2
		3	122.1	143.7	162.5	204.4	225.8	261.8
		4	129.5	151.1	168.2	214.9	236.8	286.7
		5	121.8	142.2	152.4	184.3	201.7	231.8
		Mean	124.3	145.9	163.3	205.1	226.2	266.0
		S.D.	3.2	3.5	6.5	12.4	15.0	21.7
	2000	6	124.7	130.8	146.1	190.2	208.8	252.0
		7	120.2	126.0	141.6	177.6	201.1	246.1
		8	122.6	129.4	155.0	199.0	220.5	266.0
		9	128.2	142.8	165.7	214.4	237.5	286.4
		10	128.3	132.0	157.1	197.2	217.8	255.3
		Mean	124.8	132.2	153.1	195.7	217.1	261.2
		S.D.	3.5	6.3	9.5	13.4	13.7	15.9
Female	2000	11	108.1	115.6	128.2	153.0	160.2	179.1
		12	103.3	111.0	121.7	151.1	160.5	171.2
		13	108.6	121.6	143.3	181.7	195.8	216.2
		14	103.3	109.4	125.8	151.1	163.3	183.8
		15	109.8	122.4	140.8	173.5	181.5	204.9
		Mean	106.6	116.0	132.0	162.1	172.3	191.0
		S.D.	3.1	5.9	9.5	14.5	15.8	18.8

*, the day of administration; unit, g